

# Investigación en plantas de importancia médica

Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas,  
María Julia Verde-Star (editoras)



 OmniaScience

  
open access

Monographs

# Investigación en plantas de importancia médica

---

Editores:

Catalina Rivas-Morales

María Azucena Oranday-Cárdenas

María Julia Verde-Star

## Investigación en plantas de importancia médica

Editores:

Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México



ISBN: 978-84-944673-7-0

DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>

© OmniaScience (Omnia Publisher SL) 2016

© Diseño de cubierta: OmniaScience

© Imágenes de cubierta: Pilule rouge plante, © DaMonk – Fotolia.com;

Molecule background, © Belkin & Co - Fotolia.com

OmniaScience no se hace responsable de la información contenida en este libro y no aceptará ninguna responsabilidad legal por los errores u omisiones que puedan existir.

## AGRADECIMIENTOS

---

Los trabajos presentados en este libro fueron posibles gracias al financiamiento de los siguientes proyectos y becas:

- Nanotecnología Aplicada al Tratamiento de la Tuberculosis/Red Tuberculosis PROMEP 2008-2015.
- Aislamiento, purificación e identificación de péptidos, proteínas, glicoproteínas de *Aloe vera* con actividad antimicrobiana. Fundación Educación Superior-Empresa (FESE) 2012.
- Nanotechnologie: Vectorisation des molécules actives pour le traitement de la tuberculose (NANOBIOSA), L'Institut de Recherche pour le Développement (Francia), Programme Jeunes équipes AIRD-2011. 2012-2015.
- Red Multidisciplinaria para el Tratamiento y Control de Enfermedades Infecciosas. PRODEP/103.5/15/14156
- Estudio de la muerte celular en cáncer y el sistema inmune. Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. 2014-2016.
- Desarrollo de Coadyuvantes, Fitomedicamentos y Nanomedicinas para el Tratamiento y Control de Enfermedades Infecciosas. Red Multidisciplinaria para el Tratamiento y Control de Enfermedades Infecciosas. REDES PRODEP 2015-2016.
- Estudio del efecto de nanopartículas de oro recubiertas de quitosano sobre células tumorales. PAICYT-UANL 2015-2016.

- Actividad antiurolítica, antimicrobiana, antioxidante y tóxica del extracto metanólico de *Berberis trifoliata* PAICYT-UANL 2015-2016.
- Actividad antidiabética *in vivo* e *in vitro* de plantas de la medicina tradicional. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Aislamiento biodirigido de compuesto(s) con actividad hipocolesterolémica a partir de plantas de la familia *Asteraceae* del Noreste de México. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Influencia de la posición del explante y la concentración de citocininas en la respuesta morfogénica de *Stenocereus gummosus*. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Actividad antidiabética *in vivo* e *in vitro* de plantas de la medicina tradicional. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Obtención de un sistema nanoparticulado con aceite esencial de *Schinus molle* como potencial bioinsecticida. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Formulación de extractos vegetales y principios activos en nanomedicinas para el tratamiento de la Tuberculosis. PAICYT-UANL 2015-2016.
- Actividad antibacteriana y antiparasitaria de extractos de *Euphorbia tirucalli*. PAICYT-UANL 2015-2016.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas No. 350009, 377431, 393911, 472592, 486227, 487127, 557089, 592739 otorgadas a estudiantes de Doctorado en Ciencias Biológicas con Acentuación en Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

## Presentación

Investigación en plantas de importancia médica .....	XIII
--	------

## Capítulo 1

<b>Metodología científica para el estudio de plantas medicinales .....</b>	<b>1</b>
Resumen .....	2
1.1. Introducción .....	3
1.2. Metodología .....	6
1.2.1. Preparación de extractos .....	6
1.2.1.1. Extracción por Maceración .....	6
1.2.1.2. Extracción por Lixiviación .....	6
1.2.1.3. Extracción por Soxhlet .....	7
1.2.1.4. Arrastre por vapor .....	10
1.2.2. Separación e identificación de metabolitos secundarios .....	12
1.2.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF) .....	12
1.2.2.1.1. Reveladores .....	15
1.2.2.2. Cromatografía en Columna .....	18
1.2.3. Técnicas dirigidas para la obtención de compuestos .....	21
1.2.3.1. Alcaloides .....	21
1.2.3.2. Sesquiterpenlactonas .....	22
1.2.3.3. Saponinas .....	23
1.2.3.4. Lignanós .....	24
1.2.4. Métodos de identificación .....	25
1.2.4.1. Pruebas coloridas .....	26
1.2.4.1.1. Insaturaciones .....	26

1.2.4.1.2.	Grupo carboxilo . . . . .	27
1.2.4.1.3.	Grupo carbonilo . . . . .	27
1.2.4.1.4.	Oxhidrilos fenólicos (Taninos) . . . . .	27
1.2.4.1.5.	Esteroles y triterpenos . . . . .	27
1.2.4.1.6.	Saponinas . . . . .	27
1.2.4.1.7.	Carbohidratos . . . . .	28
1.2.4.1.8.	Cumarinas . . . . .	28
1.2.4.1.9.	Sesquiterpenlactonas . . . . .	28
1.2.4.1.10.	Furanocumarinas . . . . .	29
1.2.4.1.11.	Aromaticidad . . . . .	29
1.2.4.1.12.	Nitritos (NO <sub>2</sub> ) . . . . .	29
1.2.4.1.13.	Cloruros . . . . .	30
1.2.4.1.14.	Halógenos . . . . .	30
1.2.4.1.15.	Cianuros . . . . .	30
1.2.4.1.16.	Sal de cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl) . . . . .	30
1.2.4.1.17.	Alcaloides . . . . .	30
1.2.4.1.18.	Flavonoides . . . . .	31
1.2.4.1.19.	Iridoides . . . . .	32
1.2.4.1.20.	Quinonas . . . . .	32
1.2.4.1.21.	Glicósidos cardiotónicos y azúcares . . . . .	33
1.2.4.2.	Algunos datos espectroscópicos característicos de compuestos . . . . .	34
1.3.	Conclusión . . . . .	36
	Referencias . . . . .	37

## Capítulo 2

<b>Actividad antioxidante y toxicidad.</b> . . . . .	41
Resumen . . . . .	42
2.1. Actividad antioxidante . . . . .	43
2.2. Métodos para evaluar la actividad antioxidante . . . . .	46
2.2.1. DPPH . . . . .	46
2.2.2. Método de captación del radical ABTS* <sup>+</sup> . . . . .	48
2.2.3. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) . . . . .	49
2.2.4. Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power). . . . .	51
2.2.5. Contenido de Fenoles totales método de Folin-Ciocalteu. . . . .	53
2.2.5.1. Determinación del contenido de fenoles totales . . . . .	54
2.3. Toxicidad . . . . .	55
2.3.1. Métodos para evaluar la toxicidad . . . . .	56

2.3.1.1. Ensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i> . . . . .	56
2.3.1.2. Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> . . . . .	58
2.3.1.3. Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla <i>Allium cepa</i> L. . . . .	59
2.3.1.4. Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario <i>Hydra attenuata</i> . . . . .	60
2.3.1.5. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga <i>Lactuca sativa</i> L. . . . .	62
2.3.1.6. Ensayo de toxicidad con el nematodo <i>Panagrellus redivivus</i> . . . . .	64
2.3.1.7. Otros métodos para evaluar la toxicidad . . . . .	70
2.4. Conclusión . . . . .	70
Referencias . . . . .	71

**Capítulo 3**

<b>Actividad antimicrobiana.</b> . . . . .	77
Resumen . . . . .	78
3.1. Introducción . . . . .	79
3.2. Metodología . . . . .	81
3.2.1. Técnica de difusión en placa. . . . .	81
3.2.1.1. Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer) . . . . .	82
3.2.1.2. Método modificado de pozos de agar . . . . .	83
3.2.2. Métodos de dilución . . . . .	83
3.2.2.1. Dilución en agar . . . . .	84
3.2.2.1.1. Dilución en medio líquido . . . . .	84
3.2.3. Bioautografía . . . . .	87
3.2.3.1. Bioautografía por contacto . . . . .	88
3.2.3.2. Bioautografía directa . . . . .	88
3.2.3.3. Bioautografía por inmersión o por superposición de agar . . . . .	89
3.2.4. Cromatografía en columna . . . . .	91
3.3. Conclusión . . . . .	95
Referencias . . . . .	96

**Capítulo 4**

<b>Actividad antifúngica</b> . . . . .	101
Resumen . . . . .	102
4.1. Introducción . . . . .	103

4.2. Actividad biológica . . . . .	105
4.3. Plantas con actividad antifúngica . . . . .	106
4.4. Determinación de la actividad antifúngica . . . . .	106
4.4.1. Método para dermatofitos . . . . .	106
4.4.2. Método para levaduras . . . . .	114
4.4.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) para dermatofitos . . . . .	114
4.4.4. Principales grupos funcionales con actividad antifúngica . . . . .	115
4.4.4.1. Compuestos fenólicos . . . . .	115
4.4.4.2. Flavonoides . . . . .	116
4.4.4.3. Cumarinas . . . . .	117
4.4.4.4. Quinonas . . . . .	118
4.4.4.5. Xantonas . . . . .	118
4.4.4.6. Alcaloides . . . . .	119
4.4.4.7. Saponinas . . . . .	120
4.5. Conclusión . . . . .	121
Referencias . . . . .	121

## Capítulo 5

<b>Actividad antihipercolesterolemica</b> . . . . .	129
Resumen . . . . .	130
5.1. Introducción . . . . .	131
5.2. Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol . . . . .	134
5.3. Plantas con actividad hipocolesterolemica . . . . .	134
5.4. Conclusión . . . . .	149
Referencias . . . . .	149

## Capítulo 6

<b>Actividad antiurolítica</b> . . . . .	161
Resumen . . . . .	162
6.1. Introducción . . . . .	163
6.2. Urolitiasis . . . . .	164
6.3. Plantas con actividad antiurolítica . . . . .	165
6.4. Modelos <i>in vitro</i> para la evaluación de la actividad antiurolítica . . . . .	168
6.5. Modelos <i>in vivo</i> para la evaluación de la actividad antiurolítica . . . . .	168
6.6. Conclusión . . . . .	169
Referencias . . . . .	170

**Capítulo 7**

<b>Actividad nefroprotectora</b> .....	177
Resumen .....	178
7.1. Introducción .....	180
7.2. Enfermedad renal en México .....	180
7.3. Plantas estudiadas con actividad nefroprotectora .....	181
7.4. Conclusión .....	205
Referencias .....	205

**Capítulo 8**

<b>Actividad antidiabética</b> .....	215
Resumen .....	216
8.1. Introducción .....	217
8.2. Ensayos para evaluar la actividad antidiabética .....	218
8.2.1. Ensayos <i>in vivo</i> .....	218
8.2.1.1. Inducción de diabetes en modelos animales .....	218
8.2.1.2. Determinación del efecto anti-hiperglucémico .....	219
8.2.1.3. Evaluación del efecto hipoglucémico .....	220
8.2.1.3.1. Estudio en fase aguda .....	220
8.2.1.3.2. Estudio en fase sub-aguda .....	221
8.2.1.4. Estudio de regeneración pancreática .....	221
8.2.1.4.1. Estudio en fase aguda .....	222
8.2.1.4.2. Estudio en fase sub-crónica .....	222
8.3. Ensayos <i>in vitro</i> .....	223
8.3.1. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -amilasa .....	223
8.3.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....	225
8.3.3. Otros ensayos .....	226
8.4. Conclusión .....	254
Referencias .....	254

**Capítulo 9**

<b>Actividad citotóxica <i>in vitro</i> frente a células tumorales</b> .....	269
Resumen .....	270
9.1. Introducción .....	271
9.2. Extractos de plantas con actividad citotóxica .....	272
9.3. Derivados de plantas: fármacos con actividad antitumoral .....	274
9.4. Muerte celular: Un objetivo clave de extractos de plantas con actividad antitumoral .....	278

9.5. Métodos para el estudio de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> . . . . .	281
9.5.1. Análisis mediante técnicas de microscopía . . . . .	283
9.5.1.1. Observación de las células tratadas con los extractos empleando el microscopio invertido . . . . .	283
9.5.1.2. Uso del colorante de exclusión Azul tripán . . . . .	284
9.5.2. Ensayo clonogénico . . . . .	286
9.5.3. Microscopía de fluorescencia . . . . .	288
9.5.4. Determinación de la condensación nuclear por medio de la tinción de Hoechst . . . . .	289
9.5.5. Métodos colorimétricos: Técnicas espectrofotométricas . . . . .	292
9.5.5.1. Ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH) . . . . .	292
9.5.5.2. Ensayos basados en la reducción de sales de Tetrazolio . . . . .	294
9.5.6. Métodos utilizando la Citometría de Flujo . . . . .	298
9.5.6.1. Determinación de muerte celular usando Anexina-V y Yoduro de propodio . . . . .	298
9.5.7. Determinación de la activación de caspasas efectoras. . . . .	300
9.5.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial: tinción con TMRE . . . . .	302
9.6. Conclusión . . . . .	304
Referencias . . . . .	305

## Capítulo 10

<b>Actividad biológica de proteínas y péptidos.</b> . . . . .	313
Resumen . . . . .	314
10.1. Introducción. . . . .	315
10.2. Proteínas . . . . .	316
10.3. Péptidos . . . . .	318
10.4. Proteómica: un nuevo enfoque de estudio . . . . .	324
10.5. Conclusión . . . . .	337
Referencias . . . . .	338

## Capítulo 11

<b>Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales .</b>	351
Resumen . . . . .	352
11.1. Introducción . . . . .	353
11.2. Generalidades del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales . . . . .	354
11.3. Aplicación del cultivo <i>in vitro</i> para la producción de metabolitos de importancia biotecnológica. . . . .	357

11.4. Cultivo de tejidos vegetales en el Laboratorio de Micropropagación .....	358
11.5. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> , tamizaje fitoquímico y actividad biológica de diversas familias .....	359
11.5.1. Boraginaceae .....	359
11.5.2. Cactaceae .....	361
11.5.3. Crassulaceae .....	391
11.5.4. Cucurbitaceae .....	393
11.5.5. Fabaceae .....	395
11.5.6. Meliaceae .....	397
11.5.7. Rosaceae .....	398
11.5.8. Scrophulariaceae .....	400
11.5.9. Fouquieriaceae .....	402
11.6. Conclusión .....	404
Referencias .....	405

## Capítulo 12

### Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados .....

411	411
Resumen .....	412
12.1. Introducción .....	413
12.2. Micropartículas .....	413
12.3. Liposomas .....	417
12.4. Nanopartículas poliméricas .....	420
12.5. Nanopartículas sólidas lipídicas .....	425
12.6. $\beta$ -Ciclodextrinas .....	426
12.7. Otros Sistemas de Liberación Nanoparticulados .....	428
12.7.1. Nanoemulsiones .....	428
12.7.2. Micro/nanocomplejos .....	428
12.7.3. Nanogeles .....	428
12.7.4. Niosomas .....	429
12.8. Conclusión .....	429
Referencias .....	430



# PRESENTACIÓN

---

## **Investigación en plantas de importancia médica**

Las plantas han constituido desde la antigüedad un recurso inapreciable para cuidar y preservar la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para su atención primaria de salud y con frecuencia subestimada. El consumo de plantas como un recurso para proveer salud, ha aumentado a nivel mundial en las últimas 2 décadas. La publicidad que se ha dado a los productos a base de plantas, ha introducido la falsa idea de que ser naturales es sinónimo de inocuos, sin embargo, los estudios científicos de plantas, nos muestran desde hace más de 50 años, que los extractos vegetales contienen una gran variedad de compuestos químicos, entre los que pueden encontrarse algunos tóxicos.

En la investigación de plantas medicinales es necesario considerar los siguientes aspectos: la documentación del conocimiento tradicional; la taxonomía de las plantas, a fin de una correcta identificación; las características ecológicas de las especies útiles, la evaluación fitoquímica, farmacológica y toxicológica de las especies medicinales identificadas; de tal manera que la etnobotánica podrá transformarse realmente en un factor de desarrollo sostenible para las comunidades depositarias del conocimiento tradicional, en particular en los países en desarrollo. Las plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna como son: fuente directa de agentes terapéuticos, materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se puedan utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos.

En la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, se señala el rumbo de la medicina tradicional y complementaria (MTC) para el próximo decenio; la estrategia tiene dos objetivos principales, a saber: prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MTC a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales.

Por lo antes mencionado este libro pretende divulgar las diversas actividades de las plantas medicinales y como evaluarlas. Esto nos proporciona las bases para la investigación científica multidisciplinaria de las plantas, para la extracción, aislamiento, purificación, identificación, evaluación de la actividad biológica de los principios bioactivos, micropropagación, hasta un formulado de un fitofármaco para el control o coadyuvante de múltiples enfermedades que aquejan a la humanidad.

CATALINA RIVAS-MORALES, MARÍA AZUCENA ORANDAY-CARDENAS,  
MARÍA JULIA VERDE-STAR.

*Universidad Autónoma de Nuevo León México, Facultad de Ciencias Biológica,  
Cuerpo Académico Química-Biológica CA-180.*

# METODOLOGÍA CIENTÍFICA PARA EL ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES

---

**María Julia Verde-Star, Sergio García-González,  
Catalina Rivas-Morales**

Laboratorio Química Analítica y Productos Naturales, Facultad de Ciencias  
Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.  
[maria.verdest@uanl.edu.mx](mailto:maria.verdest@uanl.edu.mx), [sergio\\_uanl@hotmail.com](mailto:sergio_uanl@hotmail.com),  
[catalina.rivasmr@uanl.edu.mx](mailto:catalina.rivasmr@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.335>

Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.

## Resumen

El estudio científico de las plantas tóxicas, medicinales y aún las que hasta ahora no han sido utilizadas con fines terapéuticos, buscando encontrar actividad biológica en sus extractos, aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes y mas aún encontrar el o los principios activos, es el objetivo principal de la Fitoquímica.

Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin et al., 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos.

Se resalta la importancia de la quimiotaxonomía y se describen las técnicas de colecta, identificación y preparación del material vegetal, las técnicas de extracción así como los análisis preliminares de los extractos, determinar su actividad biológica: antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiurolítica, antihipercolesterémica, antidiabética, nefroprotectora y la actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales; encontrar la concentración mínima del extracto activo y determinar la estructura del o de los compuestos activos, mediante pruebas químicas y espectroscopía.

Una información muy importante es la que proporciona la herbolaria tradicional, pues describe los usos terapéuticos que a nivel empírico se atribuye a las plantas.

El estudio de las plantas en las últimas décadas, ha permitido encontrar nuevas moléculas con posibilidad de actuar como nuevos fármacos.

## Palabras clave

Técnicas fitoquímicas, manejo de extractos vegetales, extractos de plantas medicinales.

## 1.1. Introducción

Desde hace miles de años, cuando el hombre fue encontrando curas o paliativos para las enfermedades que le aquejan en hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de plantas silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como herbolaria o medicina tradicional herbolaria, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una planta de otra solo por las características externas más notorias y por su aroma, ya que aún no se establecía lo que hoy se conoce como taxonomía vegetal.

Del conocimiento empírico de los beneficios del uso de plantas para fines terapéuticos, surgen los primeros fármacos sintéticos, como ejemplo: la aspirina, su estructura y síntesis fue inspirada en los componentes de la corteza del sauce blanco *Salix alba*, de la misma manera se ha procedido para copiar estructuras de origen natural en laboratorios farmacéuticos y aplicar estos productos a fines terapéuticos (Butler, 2004; Lambert, Srivastava & Vietmeyer, 1997; Mishra & Tiwari, 2011).

A partir del conocimiento etnobotánico y herbolario se iniciaron las investigaciones para conocer los principios activos presentes en las plantas más conocidas y esto dio origen a la rama de la Ciencia que es la Fitoquímica.

Una diferencia importante entre el reino vegetal y el animal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no le son esenciales para sobrevivir, la determinación de la presencia de estas sustancias, su análisis y la búsqueda de su actividad biológica constituyen el objetivo de la Fitoquímica (Sarker, Latif & Gray, 2005; Valencia-Ortiz, 1995).

A medida que crece el conocimiento y número de plantas conocidas como medicinales se ha sistematizado la relación planta-actividad pues el conocimiento taxonómico permitió distinguir algas, bacterias, hongos, briofitas, pteridofitas, gimnospermas, angiospermas y clasificar familias, géneros y especies. Todo este conocimiento permite el surgimiento de la quimiotaxonomía, es decir la relación entre la familia de plantas y el tipo de componentes químicos presentes en estas; o en algunos casos género-tipo de compuestos, pudiendo servir como una guía en el estudio fitoquímico de las plantas.

Metabolitos primarios y secundarios. En principio, los metabolitos primarios y los secundarios no se pueden diferenciar en base a su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia de una distinción válida entre ambos tipos de metabolitos en base a su estructura o bioquímica, se tiene en cuenta su función, de modo que se dice que son metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que metabolitos secundarios son los que permitan interacciones ecológicas de la planta con su entorno (Dewick, 2002; Maplestone, Stone & Williams, 1992).

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminas, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, los que a su vez producen metabolitos secundarios, que son sustancias que no participan de forma directa en el crecimiento o desarrollo, es decir, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra predadores o como materia de almacenamiento. (DerMarderosian & Beutler, 2002; Dias, Urban & Roessner, 2012)

Los animales superiores raramente producen metabolitos secundarios y salvo algunas excepciones solo se les encuentra en insectos y algunos otros invertebrados.

Es decir, algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competencia entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbiotes (Colegate & Molyneux, 2007).

Quimiotaxonomía: Se llama así a la relación que guarda una planta, en cuanto a su clasificación taxonómica y los metabolitos secundarios que contiene. Por ejemplo la relación: Papaveráceas: alcaloides, permite establecer la hipótesis que las plantas pertenecientes a la familia Papaveraceae contienen alcaloides.

Familias de metabolitos secundarios.- Aunque hay alguna discrepancia en la clasificación de estas familias, la más general contiene a los Terpenoides, Esteroles, Compuestos fenólicos- Flavonoides, Cumarinas, Quinonas, Lignanos, Glicósidos cianógenicos, Glicósidos cardiotónicos, Iridoides, Alcaloides, Saponinas. Sesquiterpenlactonas, principalmente (Valencia-Ortiz, 1995).

A través de la existencia de la humanidad sobre la Tierra, una de sus preocupaciones ha sido mantener la salud, la aparición de nuevas enfermedades ha motivado al hombre, a lo largo de siglos, a buscar una solución o un paliativo para estos males y ha sido a través del ensayo con plantas. Sin embargo hasta hace relativamente pocos años empezó el estudio científico de las plantas y sus componentes químicos con propiedades medicinales o sus actividades biológicas, que es el objetivo de este capítulo.

Para el estudio de las plantas medicinales, la metodología a seguir, comprende las siguientes etapas:

- Estudios Etnobotánico y Etnofarmacológico basados en investigación bibliográfica exhaustiva, para conocimiento del uso tradicional y los efectos de las plantas dotadas con propiedades medicinales.
- Estudio de Actividad Biológica: Comprobación científica del uso terapéutico por ensayos que involucran evaluación *in vitro* o *in vivo*.
- Estudio Fitoquímico: por medio de un ensayo biodirigido, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos.
- Estudios de Toxicidad y Citotoxicidad: evaluación sobre organismos ó células del posible efecto tóxico de los extractos de plantas.
- Desarrollo de un producto fitoterapéutico: Formular con los extractos o compuestos activos un fitofármaco para su evaluación clínica.

Después del estudio etnofarmacológico de la planta a estudiar y considerando la quimitaxonomía de la misma, se lleva a cabo el estudio de la actividad biológica, este comprende las siguientes etapas: 1) Ubicar geográficamente la planta y colectarla, 2) Clasificarla botánicamente por expertos obteniendo

su número de registro, 3) Limpiar las impurezas visibles (tierra insectos, etc) y secar a la sombra, para su molienda y obtención de los extractos (Domínguez, 1988).

## 1.2. Metodología

### 1.2.1. *Preparación de extractos*

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. Los métodos extractivos más empleados son: A) Maceración: frío o en calor, B) Lixiviación, C) Soxhlet y D) Arrastre por vapor de agua.

#### 1.2.1.1. *Extracción por Maceración*

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 d cada extracción, Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (Bonatti, 1991).

#### 1.2.1.2. *Extracción por Lixiviación*

En este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a



*Figura 1. Rotavapor*

temperatura ambiente, durante 3 d, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (Figura 1), (se puede emplear otro solvente o agua) (Walton & Brown, 1999).

### *1.2.1.3. Extracción por Soxhlet*

Este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel fil-

tro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet (Figura 2), donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días.

Para la extracción del material vegetal se puede dividir en: Parte aérea (flores, fruto, semillas, hojas, tallo) y raíz, el estudio fitoquímico puede ser de la planta completa ó una de sus partes para un análisis específico.

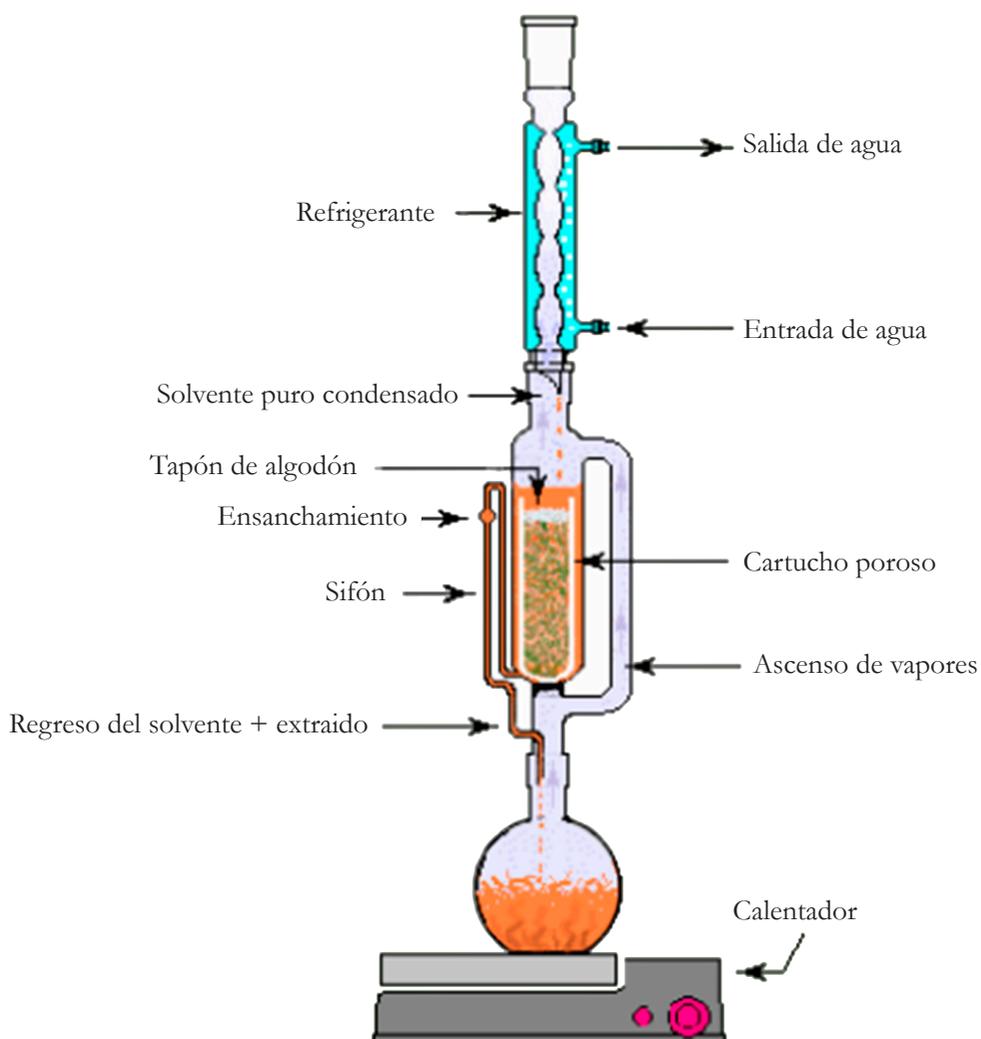


Figura 2. Equipo Soxhlet

La planta seca y molida se coloca en un Soxhlet (Figura 2) con éter de petróleo o hexano durante 7 d a una temperatura de 20°- 30° C. Al término de éste tiempo, observar si hay un precipitado, en caso de tenerlo, filtrar inmediatamente, evaporar el filtrado y con el mismo solvente recuperado seguir lavando el precipitado, evaporando nuevamente los filtrados para recuperar y guardar el solvente.

Los extractos que se obtienen respectivamente se recomienda concentrarlos en un rotavapor (Figura 1) para la recuperación del solvente que puede volver a ser utilizado.

Se puede llevar a cabo una extracción directa con metanol donde se coloca el material vegetal seco y molido en un soxhlet y directamente se le añade el metanol refluendo durante 7 d, al término de este tiempo, dejar enfriar el extracto y observar si se forma algún precipitado para filtrar o decantar según sea el caso.

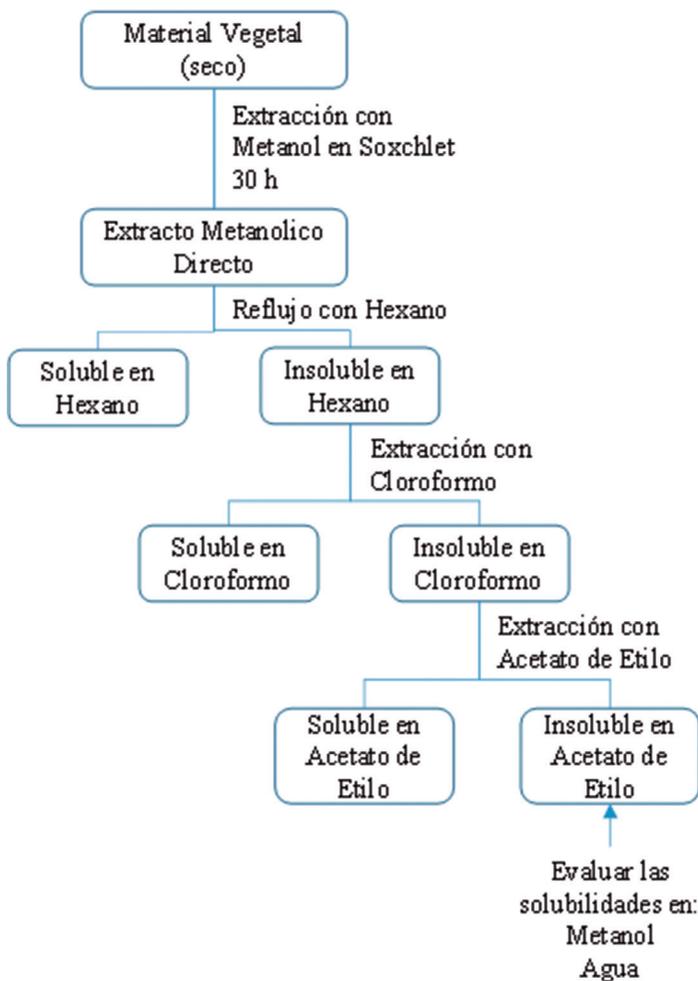
El extracto metanólico sin precipitado, se evapora en el rotavapor a sequedad para reflujo con hexano, (15 a 20 mL de hexano por gramo de extracto), durante 2 h y dejar enfriar para separar lo soluble e insoluble en hexano; lo insoluble en hexano se refluja con cloroformo (15 a 20 mL de cloroformo por gramo de extracto), durante 2 h, dejar enfriar y separar lo soluble e insoluble en cloroformo.

La parte insoluble en cloroformo se refluja con acetato de etilo (15 a 20 mL de acetato de etilo por gramo de extracto), durante 2 h, se deja enfriar y se separa lo soluble e insoluble en acetato de etilo.

En los extractos solubles en Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo así también como el insoluble después de la extracción con acetato de etilo, se pueden realizar bioensayos para evaluar alguna actividad biológica en las muestras e iniciar la separación de los principios activos. (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

En resumen el diagrama de la extracción con metanol en forma directa sería la siguiente:

## Diagrama de Flujo: Extracción del material vegetal con metanol en forma directa



## 1.2.1.4. Arrastre por vapor

Se utiliza principalmente para aceites esenciales (Figuras 3, 4 y 5). Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor (Figura 5) mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica.

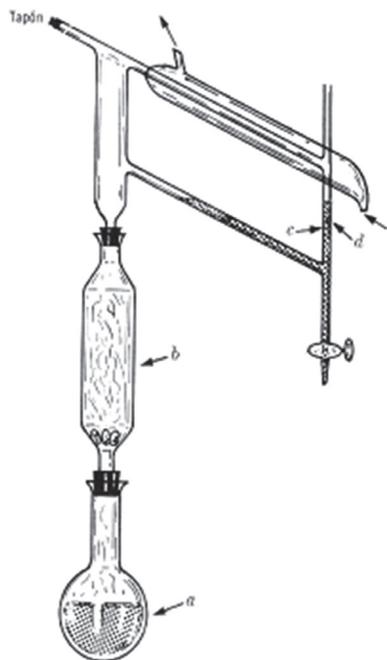


Figura 3. Aparato de destilación continua por arrastre con vapor



Figura 4. Extractor líquido-líquido

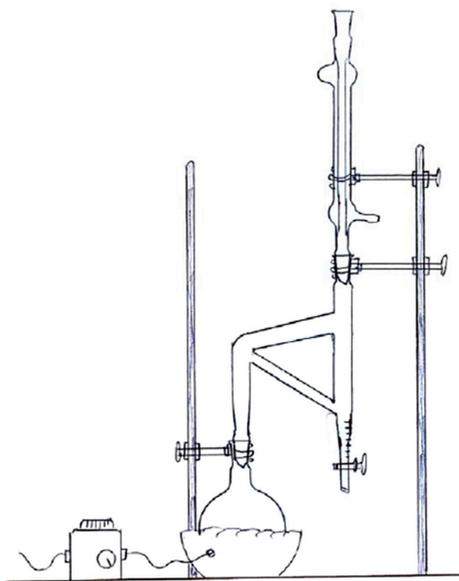


Figura 5. Hidrodestilación con trampa de Clevenger

Los aceites esenciales poseen propiedades medicinales muy diversas tales como: sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes. Dado que son compuestos volátiles, son asimilados por las vías respiratorias y actúan como expectorantes. Las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las Labiadas y las Umbelíferas.

Al líquido acuoso que quedó del arrastre por vapor se le hace la extracción con cloroformo en un aparato líquido-líquido (Figura 4), durante 5 d a una temperatura de 30°- 40°C, al término de éste tiempo, el extracto clorofórmico se evapora en el rotavapor y se monta en una columna para separación cromatográfica.

Otro modelo de aparato de arrastre por vapor aparece en la Figura 5.

En cada uno de los extractos obtenidos: hexánicos, etéreos, cloroformicos, metanólicos, etanólicos, de acetato de etilo, acuosos etc, se deben realizar las diferentes pruebas de actividad biológica para realizar un estudio biodirigido y efectuar el aislamiento e identificación del compuesto bioactivo o bien desde otro punto de vista, trabajar cada uno de los extractos para el aislamiento de estructuras químicas nuevas.

## **1.2.2. Separación e identificación de metabolitos secundarios**

### **1.2.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)**

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite separar una mezcla de compuestos, determinar el grado de pureza y realizar el seguimiento de una reacción química.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de vidrio o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente de 0.1 mm de espesor (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente ( $\text{SiO}_2$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como frente de retención (Rf), y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Para calcular el Rf, la distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha y se aplica la siguiente ecuación:

$$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)} \quad (1)$$

*Ecuación 1. Cálculo del frente de retención (Rf)*

Eluentes: Para elegir los eluentes que se utilizaran en la cromatografía, es necesario conocer la polaridad de los disolventes, en fitoquímica se utilizan los eluentes de menor a mayor polaridad, como se indica en la Tabla 1.

Por ejemplo: Si queremos eluir una cromatografía en capa fina (Figura 5 A, B y C) de una muestra de extracto o fracción diluida de una columna cromatográfica o un insoluble o precipitado del material vegetal en estudio, etc. Primero se solubiliza una pequeña cantidad de muestra en el disolvente adecuado y con un capilar aplicar la muestra aproximadamente a 1 cm de distancia del inicio en la placa cromatográfica, dejar secar y colocarla en un recipiente de

	<b>Disolvente</b>	<b>Punto de Ebullición (°C)</b>	<b>Densidad (g/mL)</b>
P	Eter de Petroleo	35- 60	0.640
O	Hexano	69	0.659
L	Benceno	80	0.874
A	Cloroformo	61	1.492
R	Acetato de etilo	77	0.902
I	Acetona	56	0.791
D	Etanol	78	0.785
A	Metanol	65	0.791
D	Agua	100	1.000

*Tabla 1. Propiedades de disolventes más utilizados en fitoquímica*

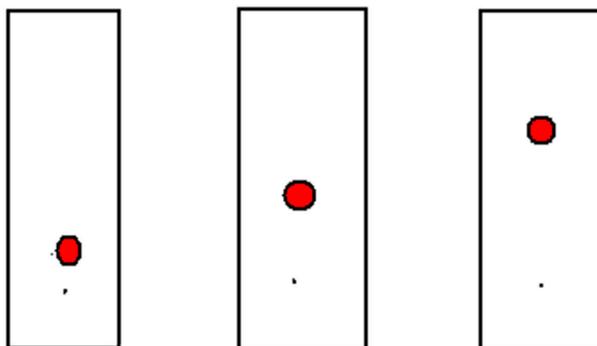


Figura 6. Corrimiento en una cromatografía en capa fina con diferentes sistemas de elusión

vidrio donde se tenga el eluyente: benceno:acetona 9:1 por ejemplo si la placa cromatográfica es de  $5 \times 10$  cm utilizar un recipiente de vidrio de 250 mL con una tapa (caja de petri o vidrio de reloj) y agregar un volumen de 10 mL del eluyente, en este caso sería: 9 mL de benceno (B) y 1 mL de acetona (A), (a medio cm por terminar de eluir se sacar la placa y se seca) observar a la luz ultravioleta y revelar con cloruro de cobalto (posteriormente se describen los diferentes reveladores) si la muestra se desplazó como en la Figura 6A y se quiere desplazar más como la Figura 6 B se utilizará otra mezcla de eluyente por ejemplo benceno 8 mL–acetona 2 mL es decir B:A 8:2 y para desplazarse más, como en la Figura 6 C utilizar el sistema de eluentes B:A 7:3 y así sucesivamente hasta llegar a 5:5.

Si observamos que la muestra en la CCF no se desplazó, entonces se utiliza otro sistema de disolventes: cloroformo-metanol 9:1 y para desplazar más la muestra, utilizaríamos la misma relación de disolventes mencionados anteriormente. En caso de que la muestra no se desplace del punto de aplicación en la cromatoplaque, se utilizará un tercer sistema de eluentes, se propone Butanol-ácido acético-agua, primero en la proporción 7:2:1 si se requiere mayor polaridad se aumentaría el volumen de agua y se disminuye la proporción del ácido acético: 7:1:2 y así sucesivamente.

A continuación se muestra en la Tabla 2 otras mezclas de disolventes pero es muy importante «ensayar con diferentes proporciones» con los tres tipos de sistemas anteriores. En la Tabla 2 se muestran las relaciones indicadas que son volumen/volumen (V/V). (Paech & Tracey, 2012).

Relación de disolventes	V/V	Relación de disolventes	V/V
1 Eter de petróleo	10	18 Benceno-metanol	9:1
2 Ciclohexano	10	19 Cloroformo-acetona	85:15
3 Benceno	10	20 Benceno-éter etílico	4:6
4 Diclorometano	10	21 Benceno-acetato de etilo	1:1
5 Benceno-cloroformo	1:1	22 Cloroformo-éter etílico	6:4
6 Cloroformo	10	23 Ciclohexano-acetato de etilo	2:8
7 Ciclohexano-acetato de etilo	8:2	24 Cloroformo-metanol	95:5
8 Cloroformo-acetona	95:5	25 Cloroformo-acetona	7:3
9 Benceno-acetona	9:1	26 Benceno-acetato de etilo	3:7
10 Benceno-acetato de etilo	8:2	27 Acetato de etilo	10
11 Cloroformo-éter etílico	9:1	28 Acetato de etilo-metanol	99:1
12 Benceno –metanol	9:1	29 Benceno-acetona	1:1
13 Benceno-éter etílico	6:4	30 Cloroformo-metanol	9:1
14 Ciclohexano-acetato de etilo	1:1	31 Acetona	10
15 Cloroformo-éter etílico	8:2	32 Etanol	10
16 Benceno-acetona	8:2	33 Metanol	10
17 Cloroformo-metanol	9:1	34 H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> -COOH + HCL	30:10:3

*Tabla 2. Relación de disolventes (V/V) utilizados en cromatografía en capa fina*

#### 1.2.2.1.1. Reveladores

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. En el caso de compuestos que no absorben luz UV, para la visualización del cromatograma se requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos produciendo compuestos coloridos.

- CLORURO DE COBALTO (Revelador general): A 800 mL de agua destilada se le agrega 20 g de CoCl<sub>2</sub> y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado, añadiéndolo por las paredes del matraz poco a poco, aforando a 1 L con agua destilada.

- DRAGENDORFF MODIFICADO, (alcaloides): Solución A; se disuelven 0.85 g de subnitrato de bismuto (o nitrato de bismuto), en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B; se disuelve 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada.

Cuando se va a usar, se mezclan: 5 mL de solución A y 5 mL de solución B, se le añade 20 mL de ácido acético glacial, aforando la solución con agua destilada a 100 mL.

- EHRLICH (compuestos con anillo furánico): 30 mg de paradimetilamino-benzaldehído se disuelven en 20 mL de etanol, Con este reactivo se revela la cromatografía y se coloca en una camarita con cloruro de hidrógeno unos minutos y los componentes que contengan el anillo furánico, las manchas se pueden colorear de morado, azul o violeta.
- POLIOLES: 200 mg de vainillina se disuelven en 50 mL de etanol y al momento en que se vaya a usar se mezcla con una solución al 3% de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) en agua, con esto se rocía la placa cromatográfica y a los 3 o 4 min que se deja secar aparecen las manchas de color azul pálido cambia a rosa y de color lila cambia a azul gris. En la Rhamnosa cambia de rojo a amarillo; en la Fructosa cambia de verde a gris.

Pueden interferir compuestos endóxicos, también pueden dar coloración el ácido malónico y otros compuestos.

- MARQUIS (alcaloides): se hace una mezcla de ácido sulfúrico–formaldehído en una proporción de 10:1.
- QUINONAS: 100 mg de azul de metileno se disuelven en 20 mL de etanol, medio mililitro de ácido acético y 100 mg de Zinc en polvo.

Sacudir en frasco cerrado y rociar la cromatografía con esa solución, en los primeros minutos aparecen manchas coloridas que indican la presencia de quinonas.

- SESQUITERPENLACTONAS: A una solución metanólica saturada con hidroxilamina, se le añade ácido clorhídrico mezclado con hidróxido de sodio

2 N (1:1), con esto se rocía la cromatoplaca y luego con un segundo reactivo, el cual se prepara, mezclando una solución de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 1% en metanol con ácido clorhídrico 2 N en una proporción (1:1).

- **AZÚCARES:** Se mezcla 0.93 g de anilina con 1.66 g de ácido o-ftálico ó anhídrido ftálico en 100 mL de butanol saturado con agua.

El cromatograma rociado se calienta a 110° C, los eluentes recomendados para la cromatografía, son; Isopropanol–acético–agua, en una proporción de 3:1:1 ó bien butanol–acético-agua 7:2:1.

- **ACEITES ESCENCIALES:** Se disuelve 30 mg de vainillina en 3 mL de etanol agregando 3 mL de agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- **FLAVONOIDES (sales de diazonio):** 100 mg de para nitro anilina se disuelven en 15 mL de agua destilada añadiendo 3 mL de ácido clorhídrico y al momento que se vaya a emplear se le añade 80 mg de nitrito de sodio (para el ácido norhidroguayarático, NADG, la mancha aparece roja ó naranja rojizo)
- **GRUPO CARBONILO:** Se disuelven 3 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en 30 mL de ácido fosfórico al 85%, calentar para acelerar la disolución, diluir la mezcla con 19.8 mL de etanol al 95%, finalmente filtrar la solución.

Otra preparación es la siguiente: 100 mg de 2, 4- dinitrofenilhidracina se le añade 10 mL de etanol más 3 mL de ácido clorhídrico, aforando a 100 mL con agua destilada.

- **REACTIVO DE KELLER – KILLIANI (glicósidos cardiotónicos):** Se prepara la solución A; 0.1 g de ácido 3, 5 – dinitrobenzoico se disuelven en 10 mL de metanol, solución B; 0.5 g de hidróxido de potasio se disuelve con 10 mL de metanol.

Primero sé rocía la cromatografía con la solución A y luego con la solución B

En un tubo de ensaye colocamos un poco de digoxina disuelta en un ml de metanol y añadimos 3 gotas de solución A y luego 3 gotas de solución B observaremos una coloración rojiza (García-González, 1992).

### 1.2.2.2. *Cromatografía en Columna*

La cromatografía en columna es un método utilizado para la separación y purificación, de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido. La fase estacionaria utilizada, es decir, el absorbente, se coloca en el interior de una columna de vidrio, con terminación en una llave de paso (Figura 7). La fase estacionaria se impregna con el eluyente o fase móvil; en seguida la muestra que nos interesa separar, la colocamos en la parte superior de la fase estacionaria y se hace pasar la fase móvil, se empieza a eluir la columna con hexano o éter de petróleo.

Los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil, poco a poco saldrán de la columna cromatográfica, y se recogen en fracciones. Las fracciones menos polares serán las primeras en salir de la columna, las sustancias más polares, quedan retenidas por más tiempo en el absorbente, y a menudo es necesario el uso de diferentes disolventes con la finalidad de incrementar su polaridad para que sean arrastradas por estos.

El tiempo que se necesita para hacer fluir un compuesto por la columna, se conoce con el nombre de tiempo de retención; éste es característico de cada compuesto (absorbente, disolvente, presión, diámetro de la columna utilizada, etc).

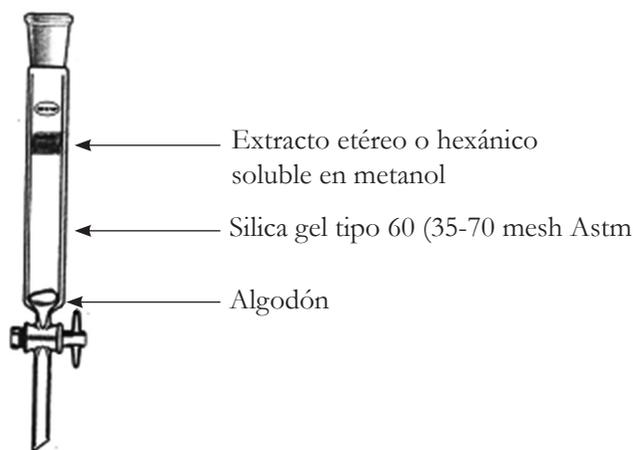


Figura 7. Montaje de una columna cromatográfica

Dependiendo del solvente que se utilizó en la extracción de la muestra se continuará en el proceso de separación de los compuestos, por ejemplo si fué realizada con:

- Hexano: Primero evaporar y luego reflujar con metanol durante 2 h, separar el insoluble y el soluble, el cual se evapora para montarlo en la columna cromatográfica.
- Cloroformo: Primero evaporar el solvente y el extracto obtenido se puede montar directamente en la columna.
- Acetona: Primero evaporar el solvente y el extracto obtenido, se puede montar directamente en la columna.
- Metanol: Primero evaporar el disolvente, se refluja con cloroformo, durante 2 h, el soluble en cloroformo se montará en columna eluyendo primero con hexano después con hexano-cloroformo 9:1 después 8:2, así sucesivamente hasta llegar a 5:5 para cambiar a cloroformo–metanol 9:1 después 8:2 hasta llegar a 5:5 para eluir finalmente con metanol.

La parte insoluble en cloroformo se puede montar directamente en la columna cromatográfica y empezar a eluir con cloroformo-metanol 9:1 después con 8:2 y así sucesivamente hasta llegar a solo metanol.

Nota: Los eluentes a utilizar en cromatografía en columna se seleccionaran de aquellos con mejor resolución en cromatografía en capa fina.

El extracto hexánico o etéreo una vez concentrado en el rotavapor sé refluja con metanol una hora (15 mL de metanol por cada gramo de extracto), se deja enfriar, se separa el insoluble, se pesa, si es posible determinar el punto de fusión y correr una cromatografía en capa fina, muy probablemente en el insoluble sé obtendrán las grasas e hidrocarburos, después de secar el insoluble y lavarlo con acetona para tratar de purificarlo, medir de nuevo el punto de fusión, por lo general los hidrocarburos tienen un punto de fusión menor de 70°C.

Para correr una cromatografía en capa delgada, de éste precipitado o insoluble en metanol, se empieza a usar como eluyente, benceno ó bien benceno-hexano 9.5:0.5,...9:1,..., 8.5:1.5,..., 8:2,... hasta llegar a usar solamente hexano.

De la partición soluble en metanol se evapora a sequedad, se pesa y se corre una cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente benceno, benceno-acetona 9.5:0.5,..., 9:1..., aumentando la polaridad para incrementar la relación de frentes (Rf) de los componentes del extracto.

De la partición soluble en metanol se toman 4 ó 5 g mezclando con un poco de la misma sílica gel (35-70 mesh Astm), que se usará para la columna cromatográfica.

Se empieza a eluir la columna con hexano o éter de petróleo y recolectar fracciones de 125 mL; después evaporar cada una de las fracciones en el rotavapor y guardar el solvente

Por lo general el metanol y la acetona se utilizan para precipitar las fracciones de hexano o éter de petróleo y conforme se eluye la columna, se utilizarán disolventes de precipitación cada vez de menor polaridad y en ocasiones mezcla de ellos.

Cuando la fracción que se está recogiendo de la columna tenga color muy claro y transparente, evaporar y pesar el residuo, si es menor de 5 mg se sugiere obtener otras 4 fracciones y observar de nuevo, si ahora queda menor cantidad en el vaso, cambiar de eluyente en la columna, pero si en la cromatoplaça se observa solo una mancha con algo de impurezas, obtener mas fracciones con el mismo eluyente, hasta que deje de aparecer la mancha en la cromatografía.

Se puede seguir el progreso de separación de una cromatografía en columna, obteniendo secuencialmente volúmenes pequeños de eluatos en tubos o frascos etiquetándolos e indicar la composición de cada fracción, estas se analizan por cromatografía en capa fina (observar con luz UV y reveladas con  $\text{CoCl}_2$ ). Las fracciones, con cromatografías en placa semejantes, se reúnen, se elimina el disolvente y se identifican los componentes por métodos espectroscópicos

Las primeras fracciones obtenidas, generalmente precipitan con metanol o acetona, otros disolventes que pueden utilizarse para la precipitación y cristalización de sus fracciones son, en orden de polaridad creciente: éter de petróleo o hexano, éter isopropílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, metanol, usando éstos disolventes en forma individual o combinada (Walton & Brown, 1999).

Nota: Al terminar de eluir la columna con metanol, se deja secar y en la misma se puede volver a montar el extracto soluble en metanol de la misma planta, esto se puede realizar de 3 a 4 veces con el mismo rendimiento.

Para la purificación de los compuestos obtenidos se utiliza la cristalización y los criterios a seguir considerando que puede realizarse con disolventes puros o mezclas de ellos siempre y cuando se cumpla con lo siguiente requisitos:

- Muy soluble a alta temperatura
- Impurezas mas solubles en frío que el soluto
- Disolvente volátil, para eliminarse fácilmente de los cristales
- No reaccione con el soluto

### ***1.2.3. Técnicas dirigidas para la obtención de compuestos***

Establecido por Domínguez (1988), con modificaciones de García-González (1992) en el aislamiento de metabolitos secundarios específicos.

#### ***1.2.3.1. Alcaloides***

Estos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas. Aunque estrictamente se considera que los alcaloides deben tener al menos un átomo de nitrógeno heterocíclico, el nitrógeno puede formar parte de una amina primaria ( $\text{RNH}_2$ ), de una amina secundaria ( $\text{R}_2\text{NH}$ ) o de una amina terciaria ( $\text{R}_3\text{N}$ ), excepcionalmente pueden encontrarse formando parte de una amina cuaternaria. La mayoría de los alcaloides se encuentran en forma de sales de ácidos orgánicos; en otros puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; y otros se encuentran en forma de glucósidos o de ésteres de ácidos orgánicos. Se disuelven con dificultad en agua, pero reaccionan con los ácidos para formar sales muy solubles. Son producidos y almacenados por cualquier parte de la planta. Los alcaloides ejercen una importante estimulación del sistema nervioso central y autónomo. Algunos actúan como estimulantes otros como inhibidores. También pueden modificar la contractilidad de las paredes de los vasos sanguíneos.

Si el extracto etanólico donde se encuentran los alcaloides contiene clorofila, ésta se puede eliminar por el siguiente método:

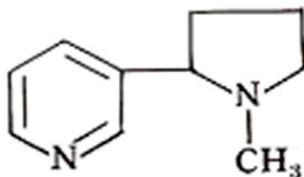


Figura 8. Nicotina

El extracto se acidula con HCl al 10% y después neutralizar con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , posteriormente se hace una extracción con cloroformo y finalmente lavar con agua destilada, la extracción clorofórmica se concentra e inmediatamente se corre una cromatografía en capa fina y se cristaliza.

Otra técnica para separar alcaloides, en donde interfiere la clorofila es: reflujar el extracto con 20 mL de  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sodio) al 5%, después se extrae con éter isopropílico para obtener una parte soluble y una insoluble que es una suspensión, se filtra y el residuo se recrystaliza, se filtra con 10 mg de carbón activado y correr una cromatografía en capa fina, evaporar y recrystalizar con metanol.

Por ejemplo para la obtención de nicotina (Figura 8), a 20 g de Picadura de troja, (tabaco), se le añade 50 mL de NaOH al 10% más 400 mL de agua destilada, por arrastre con vapor, para obtener el aceite de la nicotina.

#### 1.2.3.2. Sesquiterpenlactonas

Estas poseen un esqueleto de 15 átomos de carbono (3 fragmentos de isopreno). Para la obtención de sesquiterpenlactonas (partenina Figura 9) a partir de *Parthenium hysterophorus*, se deja macerar con acetona, en un recipiente, durante 3 días, concentrar el extracto, extraer con cloroformo para eliminar el agua de la planta fresca, por último concentrar, no a sequedad, colocando el extracto en un vaso de precipitado y observar la formación de agujas de la partenina con un punto de fusión de  $160^\circ\text{C}$ , se corre una en cromatografía en capa fina y se revela con cloruro de cobalto, se observa el color amarillo, con el eluyente benceno-acetona 8:2.

Si la recolección de la planta se realiza en Septiembre e inicio de Octubre se obtiene mayor cantidad de partenina.

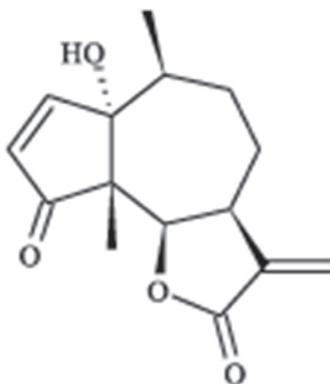


Figura 9. Parteninina

Se evalúa el efecto herbicida que puede tener la partenina y su derivado, el epóxido, el cual se prepara de la siguiente forma:

A 100 mg de partenina se le añaden 2 mL de ácido acético más 3 mL de  $H_2O_2$  al 30%, si llega a precipitar, añadirle ácido acético hasta disolver, después se vierte en agua destilada para después hacer la extracción con cloroformo.

El material que se extrajo con cloroformo, se lava con bicarbonato de sodio, se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el cloroformo, apareciendo los cristales del epóxido.

La mancha obtenida en cromatografía en capa fina en benceno-acetona 9:1 del epóxido y revelada con cloruro de cobalto es de color amarilla (después de calentar) con un  $R_f$  de 0.38.

### 1.2.3.3. Saponinas

#### • MÉTODO INDIRECTO

A partir de *Agave lechuguilla* (Guiche), se hace una extracción en soxhlet con metanol a una temperatura de 30-40°C, se evapora el extracto metanólico y se agrega  $H_2SO_4$  2 N, se refluxa durante 3 h a una temperatura de 50°C, se filtra el precipitado y se lava con agua destilada.

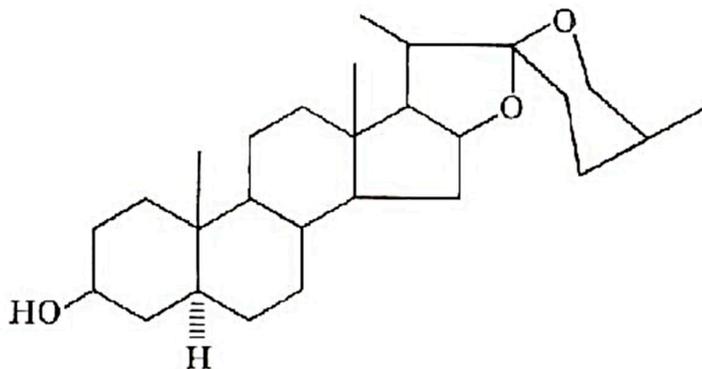


Figura 10. Esmilagenina

El precipitado se monta en el extractor soxhlet con hexano, el extracto se evapora, quedando un sólido que será esmilagenina (Figura 10), el cual se purifica al lavarlo con éter isopropílico.

- MÉTODO DIRECTO

A partir de *Agave lechuguilla* (Guiche), extraer en soxhlet, con agua destilada, durante 3 d. El líquido acuoso, se le agrega  $H_2SO_4$  hasta convertirlo en 2 N, se refluxa por 3 h y dejar reposar, filtrar y repetir los pasos del método indirecto, a partir del lavado y filtrado.

Nota: Al filtrado acidulado se le puede añadir  $CaCO_3$  para neutralizar y filtrar, liofilizando el filtrado se obtiene el azúcar

#### 1.2.3.4. Lignanos

Estos compuestos son dímeros oxigenados del fenilpropano, se pueden obtener a partir de 80 g de hojas de *Larrea divaricata* (gobernadora) se colocan en un soxhlet y se refluxa con agua destilada durante 3 días, al término de éste tiempo se liofiliza el extracto acuoso el cual se extrae en un soxhlet con metanol durante otros 3 días.

El extracto metanólico se refluxa con hexano durante 3 h y lo insoluble en hexano se monta en una columna empacada con sílica gel tipo 60 (35–70 mesh Astm).

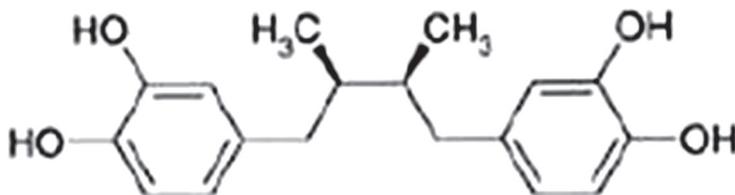


Figura 11. Ácido nordihidroguayarético

Otra técnica es macerar la planta en metanol-ácido clorhídrico en proporción 3:1 durante 5 d, al término de este tiempo filtrar y evaporar el filtrado casi a sequedad, añadir agua destilada para hacer una precipitación, se filtra y se lava con agua destilada para quitar el exceso de ácido, el filtrado se guarda o se descarta y al precipitado realizarle una cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil cloroformo-metanol 8:2 o 7:3 y se compara con ácido nordihidroguayarético (NDGA) Figura 11, revelando con sales de diazonio (mancha color rojiza) posteriormente se monta una columna con dicho extracto.

La columna se empieza a eluir con cloroformo, después con cloroformo-metanol 9:1,....8:2,....7/3,...etc. hasta solo metanol, el NDGA se obtiene entre las fracciones de cloroformo-metanol 8:2 y 7:3 éste compuesto se cristaliza, según el Merck Index, con ácido acético.

#### 1.2.4. Métodos de identificación

Los compuestos puros se someten a diversas pruebas para elucidar su estructura (Lewis, Bernstein, Duncan & Sleigh, 2005; Schroeder & Gronquist, 2006; Urban & Separovic, s. f.; Wolfender, Ndjoko & Hostettmann, 2003), a partir de la siguiente metodología:

#### Métodos Físicos

- Punto de fusión
- Rotación Óptica
- Difracción de Rayos X

## Métodos Espectroscópicos

- Ultravioleta
- Resonancia Magnética Nuclear
- Infrarrojo
- Espectro de Masas

## Métodos químicos

- Pruebas coloridas

Prueba de Ignición.- Se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de uno inorgánico; se coloca una pequeña cantidad de muestra (1-2 mg) en un aza de platino y se lleva directamente a la flama de un mechero, si arde dejando cenizas como residuo, el compuesto es inorgánico.

### 1.2.4.1. Pruebas coloridas (García-González, 1992; Harborne, 1998)

#### 1.2.4.1.1. Insaturaciones

- Prueba de tetranitrometano (TNM). Se disuelve 1 mg de la muestra en cloroformo y se agregan 2 mL de disolución de tetranitrometano en cloroformo, la aparición de un color amarillo indica la presencia de un doble enlace no terminal; ciclopropanos y compuestos aromáticos dan positiva ésta prueba.
- Prueba de bromo en cloroformo.- Se disuelve 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se agrega gota a gota esta solución al 2%; la prueba es positiva, si se observa una decoloración de la solución.
- Prueba de permanganato de potasio.- Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añade gota a gota una solución de permanganato de potasio al 2% en agua; la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café de dióxido de manganeso.

#### 1.2.4.1.2. Grupo carboxilo

Prueba de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Se agregan unas gotas de la solución de bicarbonato de sodio al 10% en agua a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua o etanol. La prueba es positiva si se observa el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

#### 1.2.4.1.3. Grupo carbonilo

Prueba de la 2, 4-dinitrofenilhidrazina (100 mg de 2,4, DFNH + 10 mL de ETOH + 3 mL de HCl aforar a 100 mL con agua destilada) y se añaden unas gotas de este reactivo a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

#### 1.2.4.1.4. Oxhidrilos fenólicos (Taninos)

Prueba de cloruro férrico. Se disuelve la muestra (1-2 mg) en 1 ml de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5% en etanol; la coloración verde oscura o negra es prueba positiva.

#### 1.2.4.1.5. Esteroles y triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard. El reactivo se prepara mezclando un mL de anhídrido acético más un mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añade a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, la aparición de un color azul o morado, es prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpenos, en el lapso de una hora, particularmente los insaturados.

#### 1.2.4.1.6. Saponinas

En un tubo de ensaye se coloca la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, se sacude y se forma una espuma abundante, si ésta permanece por 1 h, la prueba se considera positiva.

#### 1.2.4.1.7. Carbohidratos

Prueba de la Antrona. En un tubo de ensaye se colocan 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, después se deja resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interface aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

#### 1.2.4.1.8. Cumarinas

Como las Cumarinas son lactonas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular.

La presencia de un grupo furano se puede determinar mediante la prueba de Ehrlich. (Reveladores)

La mayoría de las Cumarinas, en cromatografía en capa delgada, tienen fluorescencia azul cuando se observa a la luz UV y cuando se revelan con cloruro de cobalto, después de calentar la placa, se colorea de amarillo o verde.

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10% en agua; si aparece una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba es positiva.

#### 1.2.4.1.9. Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet.- Se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se prepara pesando 1 g de ácido pícrico y disolviéndolo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesan 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 100 mL de agua. Para la prueba se ponen 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

Una gota de solución etanólica o etérea del compuesto se coloca en un tubo de 4 × 50 mm o en un micro crisol, se añade una gota de una solución

metanólica 2 N de hidróxido de potasio. La mezcla se calienta con un micro mechero durante 1-2 minutos. Enseguida se enfría, se acidula con ácido clorhídrico 0.5 N y se añade una gota de cloruro férrico al 1%; se observa la coloración violácea, si el resultado es negativo, conviene diluir un poco y repetir la observación. La santonina da un color rosa violeta y la alantolactona violeta obscuro. Las Cumarinas, otras lactonas y en general los ésteres, dan positiva esta prueba.

Los simarubolidanos y Limonoides también pueden dar positivas las pruebas anteriores porque son lactonas

#### 1.2.4.1.10. Furanocumarinas

Reactivo de Ehrlich.- Se utiliza una solución al 1.5% de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol. Esta solución se utiliza como agente revelador sobre las placas cromatográficas con la muestra. Esta placa se introduce en una cámara conteniendo atmósfera de cloruro de hidrógeno. Una coloración violeta es indicativa para el anillo furánico.

#### 1.2.4.1.11. Aromaticidad

El reactivo se prepara en forma reciente, añadiendo una gota de formalina (37-40% de formaldehído) a 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, colocándolo en un tubo de ensaye y por las paredes del tubo se agrega la muestra disuelta en un disolvente no aromático.

La formación de un anillo coloreado en la interfase que va de un color rojo carmín, hasta el negro, indica que la prueba es positiva.

#### 1.2.4.1.12. Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )

Se disuelve en agua, un poco de sulfato ferroso y el compuesto, pasando por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, la prueba es positiva cuando se forma un anillo de color café obscuro.

## 1.2.4.1.13. Cloruros

Se disuelve 1 mg de nitrato de plata en agua bidestilada y añadir una gota de ésta solución a la muestra disuelta en agua bidestilada, la prueba para cloruros es positiva, cuando aparece un precipitado blanco lechoso.

## 1.2.4.1.14. Halógenos

Belstein. Se moja el alambre de cobre en ácido nítrico o ácido sulfúrico, se pasa por la flama de un mechero, después se toma la muestra y la dirigimos a la flama; el cloro da una coloración verde y el bromo de color azul

## 1.2.4.1.15. Cianuros

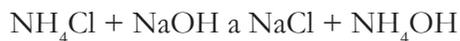
Primero se hace la solución para impregnar el papel filtro para la determinación de cianuros.

Solución: 200 mg de ácido pícrico, más 5 mL de etanol se le añade 5 mL de hidróxido de sodio 1 N (5 gr de NaOH en 125 mL de agua destilada), con ésta solución se impregna el papel filtro, dejando secar, el cual quedará con una coloración amarilla.

En un recipiente cerrado y transparente se pone un poco de material vegetal a analizar con un poco de agua y se deja el papel filtro adentro sin que se moje, el cambio de color de amarillo a rojo, es indicativo para cianuros.

1.2.4.1.16. Sal de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

Agregar hidróxido de sodio y tapar con papel pH idrión y observar los cambios;



## 1.2.4.1.17. Alcaloides

- Reactivo de Mayer. Se disuelven 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y 5 g. de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y sé afora

a 100 mL. El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o  $H_2SO_4$  diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

- Reactivo de Scheibler. (Ácido Fosfotúngstico). Se disuelven en 50 mL de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico. El reactivo forma precipitados amorfos al mezclarse con soluciones de alcaloides en  $H_2SO_4$  diluido. El precipitado es soluble en exceso de reactivo o en etanol.
- Reactivo de Marquis. Se agregan 5 gotas de formol al 40% a la muestra que se va analizar añadir 5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, la heroína y la morfina dan en forma inmediata una coloración rojo púrpura y luego pasa a coloración violeta y finalmente a coloración azul

#### 1.2.4.1.18. Flavonoides

Prueba de Shinoda. Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color naranja, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

Cuando no hay interferencia de pigmentos no flavonoides, el material vegetal se puede ensayar directamente; por ejemplo, Si los pétalos blancos de una flor se ponen amarillos en presencia de vapores de amoniaco, deben contener flavonas y/o flavonoles. Las chalconas y las auronas viran de amarillo a rojo. Los pétalos que contienen antocianinas viran a rojo intenso en presencia de amoniaco.

El pentacloruro de antimonio en tetracloruro de carbono, produce colores característicos con los flavonoides (prueba de Marini-Bettolo). Las chalconas forman precipitados rojo obscuro o violeta y las flavonas, precipitados amarillo o naranja.

Las flavonas y flavonoles se disuelven en ácido sulfúrico concentrado y originan soluciones fuertemente amarillas. Las flavanonas dan colores anaranjados o guinda a rojo azulado.

Los flavonoides-3, 4 (leucoantocianidinas) y catequinas se han localizado al hervir el material vegetal con ácido clorhídrico 2 N. Las primeras dan un color rojo y las últimas un color café-amarillento. La presencia de las antocianidinas formadas se confirma extrayéndolas con alcohol amílico, y se pueden identificar por cromatografía en papel.

Los flavonoides con dos hidroxilos orto o para entre sí, forman espejo de plata cuando se mezclan (5-10 mg) en solución etanólica (1-2 mL) con tres gotas de nitrato de plata al 12% en agua. Si después de agitar 15 min no se forma el espejo, se puede calentar 1 min y observar.

#### 1.2.4.1.19. Iridoides

Trocitos de material se colocan en un tubo con 5 mL de HCl/H<sub>2</sub>O al 1%, después de 3 a 6 h se decanta 0.1 mL del macerado a otro tubo que contenga 1 mL de reactivo de Trim-Hill, luego se calienta el tubo por muy corto tiempo, muchos iridoides dan colores azul, rojo o violáceo.

Preparación del reactivo de Trim-Hill; consiste en mezclar 10 mL de ácido acético más 1 mL de CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O al 2% en agua y 0.5 mL de HCl concentrado.

#### 1.2.4.1.20. Quinonas

Las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas.

La presencia de naftaquinonas y antraquinonas se puede identificar con la reacción de Bornträger, en la cual se hierve durante 10 min, un poco de material con hidróxido de potasio al 2-5%. Se enfría la solución, se acidula y se extrae con benceno. La capa de benceno se separa y se sacude con un poco de la solución de hidróxido de potasio. Si la fase del benceno se decolora y la alcalina se pone roja, hay quinonas.

Una solución de quinona se decolora al agregar una solución al 5% de hidrosulfito de sodio y se regenera el color al añadir unas gotas de agua oxigenada al 30%.

Muchas p-benzoquinonas y algunas 1, 4 naftaquinonas dan coloraciones azules o violeta con cianoacetato de etilo, amoniaco y también con una gota de una solución etanólica al 0.2% de p-nitro fenil acetonitrilo y una gota de NaOH 0.1 N.

Las soluciones bencénicas de las 1, 4-naftaquinonas son amarillas, coloreando de rojo las soluciones alcalinas.

Las soluciones bencénicas de las 1, 2-naftaquinonas son rojas y pasan a la solución alcalina con un color azul violáceo.

Las naftaquinonas que carecen del grupo  $(OH)^-$  en el carbón 2, dan colores azules a rojo con el o-aminotiofenol en metanol seguido por una gota de ácido clorhídrico concentrado. Si hay  $(OH)^-$  no reaccionan con éste reactivo pero dan colores similares al tratarse con o-fenilendiamina.

Las hidroxiantraquinonas dan colores diferentes al calentarse 5 min con una solución metanólica al 0.5% de acetato de magnesio.

La presencia de naftaquinonas y antraquinonas se puede determinar hirviendo 10 min un poco del material con KOH al 2-5%. Se enfría la solución; se acidula y se extrae con benceno. La capa de benceno se separa y se sacude con un poco de la solución de KOH, si la fase de benceno se decolora y la alcalina se pone roja, es prueba positiva para quinonas.

Cuando hay derivados de Antrona, la fase alcalina puede quedar amarillenta con una fluorescencia verde, para que cambie a tono rojizo se le añade un poco de peróxido de hidrógeno al 3-6%

#### 1.2.4.1.21. Glicósidos cardiotónicos y azúcares

Glucósidos: Los glucósidos o heterósidos son compuestos que están formados por 2 partes: una es un carbohidrato (ejem: glucosa) y la otra de no-azúcar o aglucona o genina. El enlace entre ambas es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta. Los glucósidos son clasificados de acuerdo a las características estructurales de la aglicona:

- Raymond.- Se disuelven 1-2 mg de glucósido en 5-8 gotas de etanol al 50%. Después se agregan 1-2 gotas de una solución al 1% de *m*-dinitrobenceno en etanol y enseguida se añaden 2-3 gotas de una solución al 20% de NaOH en agua. Se forma un color violeta o azul.
- Legal 1-2 mg de cardenólidos o aglicona se disuelven en 2-3 gotas de piridina. Después se añaden, una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua 1-3 gotas de NaOH 2N, es positiva se aparece un color rojo intenso.
- Tollens.- En un tubo de ensayo pequeño y bien limpio se disuelven 5-10 mg de glucósido en 5-8 gotas de piridina y se le añaden 4-6 gotas de reactivo de Tollens muy reciente. (Se mezclan 0.5 mL de AgNO<sub>3</sub> al 10% y 0.5 mL de NaOH al 10%; después se añade gota a gota hidróxido de amonio hasta redisolución del precipitado.) Este reactivo debe descomponerse antes de una hora, pues se forman nitruros explosivos. Si hay reductores precipita o forma un espejo sobre el tubo.
- Keller-Kiliani- Para glucósidos con 2-desoxiazúcares o para estos azúcares. Se disuelven 0.1-0.2 mg del glucósido en 1 mL de una mezcla reciente de 1 mL de sulfato-férrico al 5% y 99 mL de ácido acético glacial. Después se agregan 1-2 gotas de ácido sulfúrico. Si la prueba es positiva en 1-2 min aparece un color azul.

#### 1.2.4.2. *Algunos datos espectroscópicos característicos de compuestos*

En la Tabla 3 se muestran algunas señales características de compuestos presentes en las plantas. (Domínguez, 1988; Silverstein M, Webster X & Kiemle J, 2005; Wade Jr, 2004).

Metabolitos	Ultravioleta (nm)	Infrarrojo (cm <sup>-1</sup> )	Resonancia magnética nuclear (ppm)
Flavonoides	200–270	3,300- 3.140	
Flavanonas	250–300	1,660-1650	
Flavonas y Flavonoles	330–335	1,660-1,650	
Leuconantocinidinas y Catequinas	280		
Chalconas y auronas	370–410		
Isoflavonas	250–290	1,660-1,650	
Antocianinas	500–530	3,200-3,100	
Sesquiterpenlactonas			
saturadas	< 200	1770	CH <sub>3</sub> (13) 1.14 (d)
$\alpha, \beta$ insaturadas	205–225	1750	CH <sub>2</sub> (13) 6.29(d) y 5.57 (d)
eudesmanolidos	214-230		
Cumarinas	278 y 310	1,715-1,745 1,130-	C- 3 y 4 dobles
benzo- $\alpha$ - pirona	278	1,160	5.93-6.46 y 7.65-8.03
cromonas	240–250	1,625-1,640	C-5, singulete 7.30
pirano	266 y 348		C-5 y C-8 singulete
furano	240-290 y 342		7.26-7.30 y 6.65 -6.70
Lignanos	230-240 y 230-240	3,600-3400 (OH) 2,950-2,800 (CH) 1,775 (Lactona) 1,738 (Ester)	6.20-6.80 (Aro) 6.5 (OH fenólicos) 5.90-5.94 (metilendioxi)
Esteroles	283 (dieno homoanular)	3,650-3,590 y 1,055 (OH) 2,960-2850 y 1,485- 1,445 (CH)	3.0-1.0 (CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub> )
Saponinas y sapogeninas	205-210 insaturados	3,600-3,300 (OH) 2,980-2850 (C-H)	3.3-3.8 (CHO) 5.2-5.6 (insaturaciones)
Quinonas		1,695 a 1,650,	6.40-6.50
benzoquinonas	240-290 (fuerte) 380-400 (debil)	1,640 a 1,595 (dicarbonilo insaturado)	
naftaquinonas	240-290 y 400-500		
antraquinonas	240-300, 300-350 y 400-500		

*Continúa*

*Continuación*

Metabolitos	Ultravioleta (nm)	Infrarrojo (cm <sup>-1</sup> )	Resonancia magnético nuclear (ppm)
Limonoides, meliacinas y simaroubalidanos	207-210 230-240 214 ( $\alpha$ , $\beta$ insaturadas)	1688-1690 (CO) 3,470-3,530 (OH)	
Glucósidos cardiotónicos	217 y 260-290 (butenólidos) 300 (pentenolidos)	3460-3200 y 1050- 980 (OH) 2980-2850 (CH) 1760-1740 (butenolidos) 1725-1715 (cardenolidos)	0.70-0.90 ( C 18 y C 19) 4.80-5.05 y 4.70-4.78 (C21) 5.80-6.10 (C22) 6.20-6.50, 4.60- 4.80 y 5.70-5.90 (cardenolidos)
Alcaloides		3700-3200 y 1780- 1620 (OH e imino) 1600,1550 y 1500 (Aro) 900-800 (metoxilos, metilendioxi o furano	7.0-8.0 (aro) 7.2-9.2 (heteroero) 6.0 y 4 (metilendioxi y metoxilo)

*Tabla 3. Señales espectroscópicas características de algunos compuestos*

### 1.3. Conclusión

Los métodos que se han mencionado en este capítulo, extracción, separación e identificación de los diferentes metabolitos secundarios contenidos en las plantas nos sirven para tener una base científica de los compuestos químicos y su posible actividad biológica. En la extracción es importante establecer el método a seguir tomando en cuenta la forma de extracción (frio, caliente), la polaridad de los solventes utilizados; en la separación de las fracciones de los extractos contribuye el sistema de eluyentes utilizado tanto en cromatografía en capa fina como en columna para asegurar la pureza de los compuestos obtenidos; el tamizaje fito-

químico es una herramienta que nos orienta para la separación y purificación de los compuestos y por medio de un estudio biodirigido determinar la actividad biológica e identificar por métodos espectroscópicos el compuesto bioactivo, validando científicamente su uso en la medicina tradicional; esta información aportaría conocimiento para la biosíntesis o precursores de los principios activos encontrados, para su posterior uso como un fitomedicamento.

## Referencias

- Bonatti, A. (1991). Formulation of plant extracts into dosage form. En R. O. B. Wijesekera (Ed.), *The Medicinal Plant Industry* (pp. 106-107). London: CRC Press.
- Butler, M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. En *Journal of Natural Products* (Vol. 67, pp. 2141-2153). <http://doi.org/10.1021/np040106y>
- Colegate, S. M., & Molyneux, R.J. (2007). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination, Second Edition*. CRC Press.
- DerMarderosian, A., & Beutler, J.A. (2002). *The review of natural products: the most complete source of natural product information*. Facts and Comparisons.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dias, D.A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. <http://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Domínguez, X.A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa.
- García-González, S. (1992). *Estudio Químico de Cnidocolus urens*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
- Harborne, A.J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.

- Lambert, J., Srivastava, J., & Vietmeyer, N. (1997). *Medicinal Plants: Rescuing a Global Heritage*. World Bank. <http://dx.doi.org/10.1596/0-8213-3856-0>
- Lewis, R.J., Bernstein, M.A., Duncan, S.J., & Sleigh, C.J. (2005). A comparison of capillary-scale LC-NMR with alternative techniques: spectroscopic and practical considerations. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 783-789. <http://doi.org/10.1002/mrc.1614>
- Luque de Castro, M.D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography, A*, 1217(16), 2383-2389. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Maplestone, R.A., Stone, M.J., & Williams, D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites--a review. *Gene*, 115(1-2), 151-157. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90553-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(92)90553-2)
- Mishra, B.B., & Tiwari, V.K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769-4807. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>
- Paech, K., & Tracey, M.V. (2012). *Modern Methods of Plant Analysis/Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Springer Berlin Heidelberg.
- Sarker, S.D., Latif, Z., & Gray, A.I. (2005). *Natural Products Isolation*. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1592599559>
- Schroeder, F.C., & Gronquist, M. (2006). Extending the scope of NMR spectroscopy with microcoil probes. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(43), 7122-7131. <http://doi.org/10.1002/anie.200601789>
- Silverstein M.R., Webster X.F., & Kiemle J.D. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds. *Organic Chemistry*. [http://doi.org/10.1016/0022-2860\(76\)87024-X](http://doi.org/10.1016/0022-2860(76)87024-X)
- Urban, S., & Separovic, F. (s. f.). Developments in Hyphenated Spectroscopic Methods in Natural Product Profiling. *Frontiers in Drug Design & Discovery*.
- Valencia-Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. México DF.: Trillas.

- Wade Jr, L. (2004). Espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas. En Pearson Educacion (Ed.), *Química Orgánica* (5.<sup>a</sup> ed., p. 490 ss). Madrid.
- Walton, N.J., & Brown, D.E. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Imperial College Press. <http://dx.doi.org/10.1142/3203>
- Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2003). Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 437-455. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00303-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00303-0)



## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD

---

**Catalina Leos-Rivas, Catalina Rivas-Morales,  
David Gilberto García-Hernández**

Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[catalina.leosrs@uanl.edu.mx](mailto:catalina.leosrs@uanl.edu.mx), [catalina.rivasmr@uanl.edu.mx](mailto:catalina.rivasmr@uanl.edu.mx),  
[david.garciahn@uanl.edu.mx](mailto:david.garciahn@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.333>

Leos-Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.

## Resumen

Los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno. Éstos pueden producir daño oxidativo en macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros. Por esto es necesario contar con una batería de ensayos que nos permitan obtener información complementaria sobre ellos. El uso de radicales estables coloreados se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstos, de acuerdo a su poder antioxidante. En este capítulo abordaremos algunas técnicas de rutina para la determinación de la capacidad antiradicalaria. Por otro lado es importante el estudio de la toxicidad de extractos, fracciones o moléculas aisladas de las plantas; si se determina esta se puede calcular el índice terapéutico del extracto o compuesto para utilizarlo con dosis subtóxicas. El Índice Terapéutico refleja la seguridad relativa de un medicamento o compuesto en su selectividad de acción. También se presentan protocolos para la determinación de la toxicidad en varios niveles debido a que es de vital importancia que los profesionales en esta área estén familiarizados con los métodos abreviados que existen para evaluar la toxicidad aguda de un producto, los cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 «R» (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), y de esta forma utilizar una menor cantidad de animales en sus investigaciones.

## Palabras clave

Actividad antioxidante de plantas, radicales libres, toxicidad crónica, toxicidad aguda.

## 2.1. Actividad antioxidante

El estudio de la capacidad antioxidante de las plantas medicinales y alimenticias ha crecido en las últimas décadas ya que un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* asociadas a cada uno de ellos. Por su elevado consumo a través de la dieta y la presencia ubicua en muchas especies vegetales, el potencial de los polifenoles como agentes antioxidantes ha sido el más estudiado. Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Podemos distinguir dos categorías: sintéticos y naturales. Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides (Pastene, 2009)

Por otra parte los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno, (ROS y RNS, respectivamente por sus siglas en inglés). A bajas concentraciones son necesarios para el buen funcionamiento celular pueden actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células, sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo primario, que pueden producir daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros.

Mecanismo de acción de los antioxidantes:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.

- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS. (Agudo, 2002)

La importancia de los polifenoles en salud humana ha sido ampliamente revisada. No obstante, uno de los aspectos críticos de la investigación sobre la capacidad antioxidante de productos naturales se relaciona con la elección de las herramientas de medición. Cada vez es necesario contar con una batería de ensayos que nos permitan obtener información complementaria. El uso de radicales estables coloreados como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Acido2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS), o reactivos como el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstos, de acuerdo a su poder antioxidante. Dado que en los ensayos mencionados ocurren reacciones de transferencia de electrones y/o hidrógeno, el adecuado conocimiento de la química de tales sistemas es condición *sine qua non* para interpretar correctamente los resultados, particularmente cuando estos ensayos se aplican a muestras de fluidos biológicos. Como se puede apreciar en muchos estudios, los datos a menudo son cruzados con el contenido de polifenoles totales de las muestras, determinados como equivalentes de ácido gálico (GAE). Sin embargo, cada vez es más frecuente recurrir a técnicas de separación acopladas a sistemas de detección como el arreglo de diodos (DAD) o la espectrometría de masas (LC-MS). Dichas técnicas permiten diseccionar de mejor manera la actividad antioxidante y asignarla a un grupo específico de compuestos. Si bien es cierto, no existe una metodología que pueda ser considerada como un «*Gold Standard*», numerosos estudios consideran que ciertos ensayos como el ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), poseen ventajas comparativas respecto al resto. El índice ORAC permite combinar en un solo parámetro, información sobre la cinética de oxidación utilizando el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia o absorbancia de una sonda como la fluoresceína (ORAC-FL) o el rojo de pirogalol (ORAC-PGR), la cual es desafiada por radicales peroxilo (AAPH). En el ensayo ORAC-FL los tiempos de inducción están fuertemente influenciados por el número de grupos fenólicos presentes en la muestra mientras

que, en el ensayo ORAC-PGR, dichos tiempos prácticamente no se observan y el decaimiento de la absorbancia se ve influenciado principalmente por la reactividad de los fenoles de la muestra. Recientemente, se ha planteado que ambos índices ORAC (FL y PGR) son complementarios y su relación es un mejor indicador de la calidad promedio de los antioxidantes de una muestra. El mismo grupo de investigadores, ha propuesto el ORAC-PRG como una forma rápida de determinar el contenido específico de vitamina C en extractos y fluidos biológicos, dado que esta sustancia es una de las pocas que genera tiempos de inducción en forma concentración-dependiente. En busca del «*Santo Grial metodológico*», y con el objetivo de ampliar su espectro de aplicación, varios refinamientos han sido introducidos a este ensayo. Por ejemplo, el uso de ciclodextrina metilada permite obtener el índice ORAC lipofílico en distintas muestras vegetales o fluidos biológicos.

Adicionalmente, el ensayo ha demostrado ser altamente versátil, debido a que en él se han introducido modificaciones que permiten medir el efecto de antioxidantes sobre otras especies reactivas del oxígeno y nitrógeno dando origen a variantes para el radical hidroxilo (HORAC), peroxinitrito (NORAC), anión superóxido (SORAC).

Paralelamente, otros investigadores han desarrollado un ensayo denominado CUPRAC (*Cupric ion reducing antioxidant capacity*), el cual se ha empleado para la determinación de la capacidad antioxidante de polifenoles, ácido ascórbico y tioles. El ensayo también se ha adaptado para al análisis de antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos y en la determinación de la capacidad captadora de radical hidroxilo. Hace poco, el uso del índice ORAC como criterio de poder antioxidante ha sido empleado por la USDA (*United States Department of Agriculture*), la cual ha publicado una serie de tablas con la composición antioxidante de alimentos y plantas medicinales de uso en Norteamérica (Pastene, 2009).

Existe evidencia de que los compuestos con actividad antioxidante están relacionados con actividad antiproliferativa de células tumorales y cancerígenas (Bonofiglio, Giordano, De Amicis, Lanzino & Ando, 2016; Caselli, Cirri, Santi & Paoli, 2016; Formagio et al., 2015; Jahanban-Esfahlan, Modaeinama, Abasi, Abbasi & Jahanban-Esfahlan, 2015; Salim, Abd El-Magid, Farara & Maria, 2015). Las medidas de la actividad antirradical se pueden realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener:

*Determinación directa:* El radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical, la reacción comienza con la adición del oxidante (ABTS<sup>•+</sup>, DPPH, entre otros).

*Determinación indirecta:* La presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (métodos ORAC, FRAP, entre otros).

## **2.2. Métodos para evaluar la actividad antioxidante**

### **2.2.1. DPPH**

La capacidad antioxidante medida como la capacidad captadora de radicales libres se determina cualitativamente por el método DPPH.

#### **Desarrollo del método**

El ensayo estandarizado

Se toma una alícuota de 100  $\mu$ L de solución en metanol de la muestra a tres concentraciones distintas (150, 100 y 50 mg/L)

Se adicionan 900  $\mu$ L de DPPH en solución metanólica de concentración 60 mg/L y se mezclan.

Se incuban los tubos de reacción por 30 min en oscuridad.

Se mide la densidad óptica a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se utiliza como control positivo ácido ascórbico y ácido gálico en solución metanólica 100, 50 y 10 mg/L. (por triplicado)

Se determina el porcentaje de inhibición del radical DPPH con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH} = \frac{A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Blanco}}} \times 100 \quad (1)$$

*Ecuación 1. Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH*

Dónde:  $A$  es la absorbancia.

Una vez que se determina el valor del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones, se procede a realizar una regresión lineal con dichos valores, de tal manera se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = mx + b \quad (2)$$

*Ecuación 2. Ecuación de la recta*

Para calcular la  $IC_{50}$  se debe remplazar, el valor correspondiente al 50% de inhibición del DPPH en el eje «y» y en el eje «x» la concentración de antioxidante necesaria para inhibir en un 50% el DPPH (Plazas-Gonzalez, 2015).



*Figura 1. Reacción del radical DPPH, de izquierda a derecha se presenta los tubos de menor a mayor concentración del agente antioxidante. Color morado DPPH Oxidado, color amarillo DPPH reducido*

### 2.2.2. Método de captación del radical ABTS<sup>•+</sup>

La determinación de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> fue establecida por (Re et al., 1999).

Primeramente se forma el radical ABTS<sup>•+</sup> tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM,) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h.

Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluye con etanol hasta obtener una densidad óptica (DO) de  $0.700 \pm 0.200$  a 734 nm.

Se colocan 1980  $\mu$ L del radical libre en tubos de vidrio y se hacen reaccionar con 20  $\mu$ L de las soluciones de los extractos a concentraciones de 3.15 a 50  $\mu$ g/mL.

Se mide la DO de la mezcla de reacción al minuto 1 y al 6 a 734 nm, los ensayos se realizan por triplicado.

Se realiza la curva de calibración con TROLOX con concentraciones de 15 a 3 mM, y se determina el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(A_{\text{inicial}}) - (A_{\text{final}})}{(A_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (3)$$

*Ecuación 3. Determinación del porcentaje de inhibición de radicales libres con TROLOX*

Con los datos obtenidos se calcula la Concentración Inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) por medio del paquete estadístico SPSS a través de un análisis Probit, posteriormente se determina la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) con la ecuación (García Hernández, 2016; Mhadhebi, Mhadhebi, Robert & Bouraoui, 2014):

$$TEAC \left( \text{TROLOX} \frac{\text{mg}}{100 \text{ g planta}} \right) = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ muestra}} \times 100 \quad (4)$$

*Ecuación 4. Determinación de la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC)*

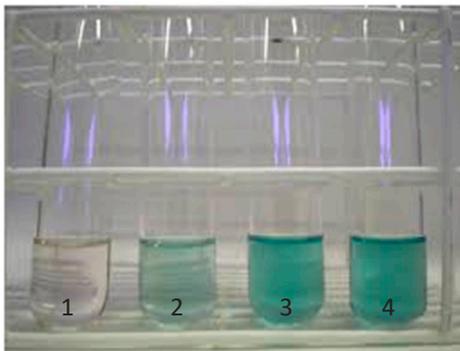


Figura 2. Reacción del radical  $ABTS^{+}$  frente a TROLOX 15 mM a diferente tiempo de reacción.  
1) 6 min; 2) 3 min; 3) 0 min; 4) Solución de  $ABTS^{+}$  sin Trolox

### 2.2.3. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). El método evalúa la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo.

#### Desarrollo del método

Se pesan 5 mg de TROLOX y depositan con 10 mL de una solución buffer de fosfato 10 mM en matraz de aforación; solubilizarlos completamente (calentar para disolver completamente).

A partir de esta solución, se realizan las diluciones respectivas para la curva de TROLOX tomando 5, 12.5, 25, 50, 75, 100  $\mu$ L y llevándolos a volumen de 1 mL con agua destilada. Curva 10–200  $\mu$ g/mL.

En una microplaca adicionar ordenadamente en cada pozo los siguientes componentes: 150  $\mu$ L de fluoresceína 1  $\mu$ M, 25  $\mu$ L de la dilución respectiva de TROLOX.

Paralelamente preparar un blanco de ensayo que contenga: 150  $\mu$ L de fluoresceína 1  $\mu$ M y 25  $\mu$ L de solución buffer fosfato 10 mM.

Preincubar la microplaca durante 30 min a 37°C.

Adicionar a cada pozo 25 µL de solución de AAPH 250 mM.

Leer la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 h a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AUC \left( 0.5 + \left( \sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) CT \quad (5)$$

*Ecuación 5. Determinación del área bajo la curva que representa la protección del antioxidante*

Donde:

$I$  = número de ciclos

$F$  = unidades de fluorescencia

$CT$  = tiempo de cada ciclo en min. En este caso,  $CT = 2$

El área limpia bajo la curva (AUC limpia) se encuentra por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC limpia (y) se representa delante de la concentración de Trolox como patrón (X) obteniendo la recta de regresión lineal, a partir de aquí, se calculan los moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]} \quad (6)$$

*Ecuación 6. Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)*

Donde:

$ABC_{AH}$  = Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

$ABC_{Trolox}$  = Área bajo la curva de Trolox.

$[Trolox]$  = Concentración de Trolox.

$[AH]$  = Concentración de Antioxidante. (Alvarez et al., 2012)

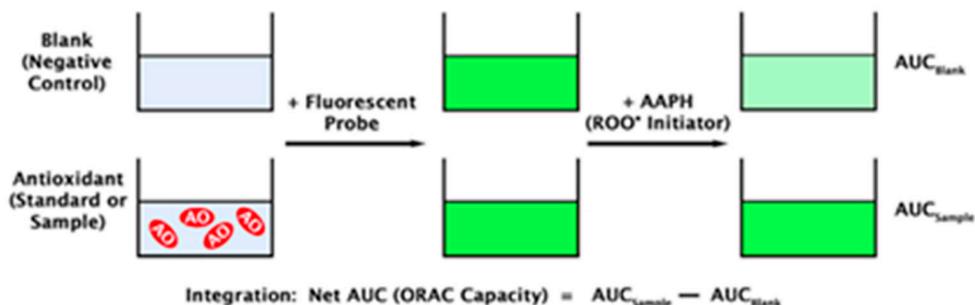


Figura 3. Diagrama de flujo para la reacción de ORAC en presencia de fluoresceína (Cellbiolabs, 2016)

#### 2.2.4. Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Se mide la DO del  $\text{Fe}^{2+}$ . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ).

Debido a que el potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

#### Desarrollo del método

Preparar un *buffer* ácido acético-acetato de sodio 0.3 mM (pH 3.4)

Solución de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM. Diluir 535  $\mu\text{L}$  de HCl (37%) en 100 mL de agua destilada.

Solución TPTZ 10 mM. Pesar 0.0312 g del reactivo TPTZ y disolverlos en un matraz de 10 mL con HCl 40 mM.

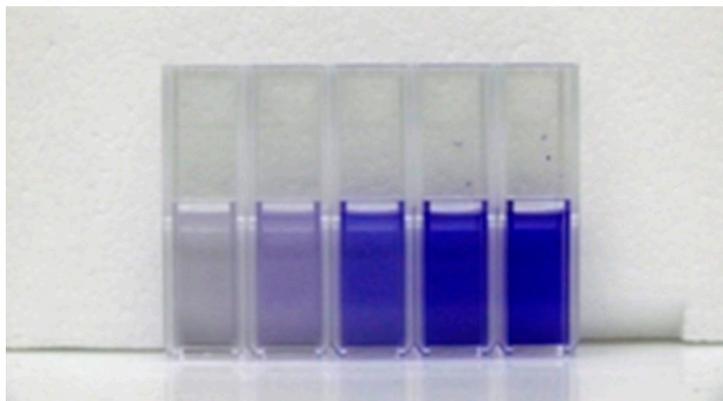
Solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM. Disolver 0.1352 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 25 mL de agua destilada.

Preparar solución de trabajo diario FRAP, esta solución de trabajo deberá de prepararse diariamente. Mezclar 900  $\mu\text{L}$  de solución TPTZ con 2.5 mL de solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM y 25 mL de tampón acetato (mantenerse en baño a 37 °C).

En una placa de 96 pozos agregar 300  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo, agregar 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada (dilución final 1:34).

Leer la DO a 593 nm y se deja reaccionar por 1 h y después se determina la DO final a la longitud de onda antes mencionada. Para cada muestra se tiene en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores.

La curva de calibración se construye usando TROLOX como control positivo (3.99 mM). La solución madre se prepara disolviendo 0.01g de Trolox en 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. A partir de esta solución se hacen diluciones que serán los distintos puntos de la recta, con concentraciones de 79, 119, 159, 199, 239, 279, 319, 359 y 399  $\mu\text{M}$ , bajo el mismo criterio antes mencionado.



*Figura 4. Reacción de FRAP, a diferentes concentraciones del agente antioxidante. De derecha a izquierda reacción de reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  de menor a mayor concentración*

Las actividades de las muestras se expresan como TEAC. Se determina la  $IC_{50}$  mediante un análisis de Probit (véase Ecuación 4) (Agudo, 2002; Benzie & Strain, 1996).

### **2.2.5. Contenido de Fenoles totales método de Folin-Ciocalteu**

Se determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro.

#### **Desarrollo del método**

Se prepara una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L, 25 mg de ácido gálico, y aforar en un matraz de 25 mL con agua destilada, enseguida se prepara una dilución 1:10 con agua destilada (recién preparada).

Preparar una disolución de carbonato de sodio al 20% pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz de aforación de 25 mL, inicialmente se disuelven en 15 mL de agua grado HPLC y se lleva a ultrasonido hasta su completa disolución, finalmente se lleva a su volumen de aforo con agua.

Preparar una disolución 1 N del reactivo de Folin-Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2 N) en agua destilada; el reactivo se protege de la luz y se refrigera hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, se hacen las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Esto se realiza tomando respectivamente 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ L de la disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L en viales ámbar de 3 mL.

Adicionar a cada vial, 250  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agita durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente se adicionan 1 250  $\mu$ L de la disolución de carbonato de sodio al 20% a cada vial, se lleva a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se deja reposar por 2 h. También se prepara un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico.

Finalmente se lee la DO a 760 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible.

El contenido de fenoles de cada extracto se expresa en mg/g de peso seco de la planta, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término «Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada».

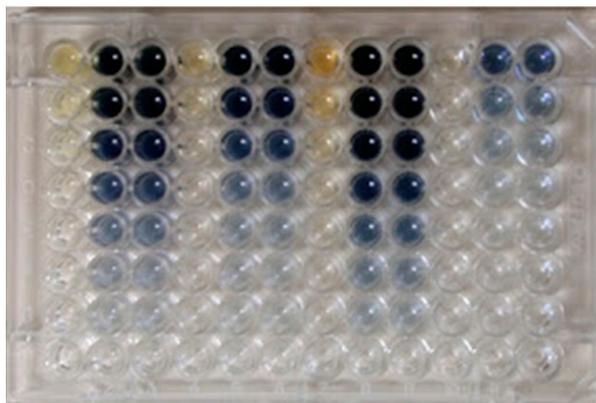
#### *2.2.5.1. Determinación del contenido de fenoles totales*

El contenido de fenoles totales se determina mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se toman 2 mg de cada extracto en un matraz Erlenmeyer y se les agrega 50 mL de agua destilada y se agita.

Tomar 0.5 mL de cada una de estas disoluciones y se mezclan con 0.75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregan 0.75 mL de carbonato de sodio al 20%.

Se agitan fuertemente y se deja reposar durante 90 min a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se mide la DO a 760 nm. Este procedimiento se realiza con cada una de las plantas objeto de estudio por triplicado (Gutiérrez-Avella, García-Ortiz & Mendoza-Cisneros, 2008).



*Figura 5. Microplaca que muestra la coloración del reactivo de Folin-Ciocalteu a diferentes concentraciones de polifenoles*

### 2.3. Toxicidad

Las plantas medicinales producen una gran cantidad de compuestos bioactivos que han sido utilizados para combatir enfermedades, desde un simple resfriado hasta el cáncer, en décadas pasadas la industria farmacéutica realizó su búsqueda en compuestos sintetizados químicamente, pero dichos compuestos presentaron efectos secundarios considerables que en ocasiones más nocivos que la enfermedad que combaten, produciendo perjuicio en órganos como hígado, riñones y páncreas, entre otros. Por tal motivo es relevante conocer si los compuestos bioactivos extraídos de las plantas presentan toxicidad, en la actualidad se sabe que el 80% de la población utiliza las plantas para su atención primaria, en general la gente que utiliza las plantas creen que por ser de origen natural y no un compuesto sintetizado en un laboratorio son amigables con el organismo, sin embargo algunos de estos compuestos son altamente tóxicos, por lo antes mencionado es de vital importancia determinar la toxicidad de los extractos de plantas para validar su uso seguro. No se puede diferenciar con precisión en lo que se refiere a toxicidad, ya que está íntimamente relacionada con la dosis administrada. De antemano, una planta que contiene sustancias con actividad relevante, puede administrarse a concentraciones medicinales, convirtiéndose en un remedio muy beneficioso para el ser humano. Aunado a esto si se conoce la toxicidad se puede determinar el índice terapéutico del extracto o compuesto para utilizarlo con dosis subtóxicas. El Índice Terapéutico refleja la seguridad relativa de un medicamento o compuesto en su selectividad de acción. Casi siempre se calcula a partir de las curvas de dosis-efecto obtenidas en animales de experimentación y generalmente, se refiere a la relación de las  $DL_{50}/DE_{50}$ , o sea, la razón de la dosis letal en 50% de la población y la dosis requerida para producir el efecto terapéutico deseado en 50% de esta población. Es importante diferenciar entre seguridad y toxicidad de un medicamento, ya que la toxicidad es una característica intrínseca del medicamento, en tanto, la seguridad es una función del medicamento y de las condiciones de uso.

La toxicidad aguda describe los efectos adversos que son el resultado de una sola exposición a una sustancia, esto difiere de la toxicidad crónica que refiere la acción tóxica de la sustancia en exposiciones repetidas en un periodo de tiempo más largo (meses a años).

Existen dos modos principales a través de los cuales pueden ejercer los productos químicos su toxicidad. Los efectos locales tienen lugar en la zona del cuerpo

que ha estado en contacto con el producto. Los efectos sistémicos tienen lugar después o una vez que el producto se ha absorbido y distribuido desde el punto por el que penetró hasta otras zonas del organismo. Casi todos los compuestos causan efectos sistémicos, aunque algunos pueden causar ambos.

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada «toxicología reguladora». Por ende es de vital importancia que los profesionales en esta rama de la toxicología experimental conozcan los métodos abreviados que existen hoy en el mundo para evaluar la toxicidad aguda de un producto, los cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 «R» (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), y de esta forma trata de utilizar la menor cantidad de animales posibles y que la muerte no fuese el objetivo fundamental de este tipo de investigación sino la aparición de la llamada toxicidad evidente o signos y síntomas de toxicidad como criterio de punto final (endpoint) de su protocolo de trabajo de investigación (Arencibia-Arrebola et al., 2003).

Es así que los métodos *in vitro* ocupan la primera línea para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial biológico que no presenten toxicidad aguda para el establecimiento de éstas como medicamentos de patente. En este capítulo describiremos técnicas para la determinación de toxicidad en distintos modelos de organismos.

### **2.3.1. Métodos para evaluar la toxicidad**

#### **2.3.1.1. Ensayo de letalidad en *Artemia salina***

Este ensayo se utilizó inicialmente para la pre-evaluación de extractos vegetales con compuestos antitumorales y se determinó una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de artemia y la citotoxicidad frente a las células 9KB.

*A. salina* son crustaceos diminutos de cuerpo blando, comúnmente comercializados como quistes en tiendas de mascotas como alimento para peces, por lo tanto ofrece ventajas tales como: disponibilidad, bajo costo, facilidad de almace-

namiento, los ensayos pueden realizarse prácticamente en cualquier momento y los requerimientos para este ensayo son mínimos.

El fundamento de este ensayo se basa en la habilidad de un extracto o compuesto de ser tóxico para las artemias cultivadas en el laboratorio (Carballo, Hernandez-Inda, Perez & Garcia-Gravalos, 2002), se utiliza para la evaluación preliminar de la toxicidad (Solis, Wright, Anderson, Gupta & Phillipson, 1993), detección de toxinas fúngicas (Harwig & Scott, 1971), toxicidad de extractos de plantas (McLaughlin, 1991), metales pesados (Martínez, Ramo, Torreblanca & Díaz-Mayans, 1999), toxinas de cianobacterias (Jaki, Orjala, Bürgi & Sticher, 2008), pesticidas (Barahona & Sánchez-Fortún, 1999), y en el ensayo de toxicidad de materiales dentales (Pelka, Danzl, Distler & Petschelt, 2000).

### **Desarrollo del método**

Se atemperan unas horas los quistes de *A. salina* y se pesan 0.1 g.

Se depositan en 300 mL agua de mar sintética (40 g de sal de mar, 6 mg de levadura de cerveza, ajustar a pH 7.8, aforar a 1 L) en una cámara de eclosión, con un lado oscuro y otro iluminado (bombilla eléctrica de 20 W), dividida con un pequeño orificio, se mantiene por 24 h con aeración constante a 22-29 °C.

Las artemias eclosionadas se separan y mantienen a las mismas condiciones por 48 h.

Se colocan una microplaca de 96 pozos con 100 µL de agua de mar en cada pozo más 10 nauplios, se depositan 100 µL de los extractos para tener una concentración final de 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL y como control negativo agua de mar artificial y positivo  $\text{KMnO}_4$  a 400 µg/mL, se incuban a las mismas condiciones por 24 h.

Se cuentan los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio y se hace el análisis estadístico PROBIT para determinar la  $\text{DL}_{50}$  (McLaughlin, 1991). El criterio de toxicidad es el establecido por (Déciga-Campos et al., 2007) se consideran: valores superiores a 1000 µg/mL como no tóxicos, los menores de 1000 pero mayores de 500 µg/mL ligeramente tóxicos y los menores a 500 µg/mL tóxicos.



Figura 6. Diagrama de flujo para el ensayo de letalidad con *A. salina*

### 2.3.1.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *D. magna*, *D. pulex*, y *D. similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad. Los ensayos de toxicidad con *D. magna*, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de poro de sedimentos, entre otros (Aoki M, Encarnación-Dimayuga & Cortés A, 2005; Díaz-Báez, Granados & Ronco, 2008).

#### Desarrollo del método

La toxicidad aguda con individuos de *D. magna* mediante la determinación de la inhibición de la movilidad ( $IC_{50}$  24 h). Primero se realizan ensayos preliminares para determinar el rango del efecto tóxico. Una vez establecido este rango se realizan las pruebas definitivas con al menos 5 concentraciones en progresión geométrica, con un porcentaje de inmovilidad (mortalidad) entre un 0 y 100%.

Previamente se cultivan los individuos de *D. magna* a 24 h de nacidos

Se colocan en recipientes de vidrio de 25 mL como cámaras experimentales 20 neonatos de *D. magna*, divididos en 5 individuos por réplica, estos se exponen a 10 mL a diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar y se mantienen sin alimentación por 24 h a  $20^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ ; utilizando dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como tóxico de referencia.

Se contabiliza el número de organismos inmóviles, presumiéndose su muerte, en caso de duda se recomienda agitar bien el frasco de experimentación para verificar la inmovilidad de los organismos afectados (muertos).

Los resultados obtenidos se analizan utilizando un método paramétrico para el cálculo de los valores de  $CL_{50}$  a 24 h y su intervalo de confianza mediante el programa estadístico Probit

### 2.3.1.3. *Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L.*

En este ensayo mediante la inhibición del crecimiento promedio de raíces. Cuando un bulbo de cebolla (*Allium* sp.) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, después de 72 h de exposición. El cálculo se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control (Báez-Díaz, Ronco & Pica-Granados, 2008).

#### **Desarrollo del método**

Se seleccionan bulbos de *Allium* sp. (cebolla amarilla) de 1.5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas o raíz, se limpian eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, se colocan en agua destilada por 2 h y dejar secar.

En tubos de ensayo de  $10 \times 1.5$  cm se depositan de 15–20 mL de las soluciones a 5 concentraciones diferentes de la muestra a evaluar, un control negativo (agua dura) y un control positivo (Solución  $Cu^{+2}$ ), las soluciones deben de llegar al borde del tubo, se colocan los bulbos en la boca del tubo procurando la zona radicular quede inmersa en el líquido (10 repeticiones)

Los tubos se colocan en una gradilla a temperatura ambiente (20°C) durante un período de 72 h. Debe evitarse la iluminación directa y mantener el nivel de la solución del tubo con ayuda de una pipeta Pasteur.

Se mide la longitud de las raíces, con una regla común con escala en milímetros.

Se obtiene el promedio de las 10 repeticiones. (Descarte valores extremos).

Registro de signos de fitotoxicidad: Disminución de la longitud de las raíces, Medición de elongación.

El porcentaje de efecto de inhibición se calcula por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ efecto de inhibición} = \left( \frac{\text{long. del control} - \text{long. de la muestra}}{\text{long. del control}} \right) \quad (7)$$

*Ecuación 7. Porcentaje del efecto de inhibición del crecimiento radicular*

Con los valores obtenidos se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la  $CI_{50}$  mediante cualquiera de los siguientes métodos: Probit, promedios móviles o Sperman y Karber.

#### 2.3.1.4. *Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario Hydra attenuata*

La especie *H. attenuata* es empleada como organismo de prueba por la facilidad de su cultivo en laboratorio, su rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo), que favorece el intercambio intra e intercelular y su potencial para la detección de compuestos tóxicos, así como por presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación. Los pólipos de agua dulce del género *Hydra* son microinvertebrados de la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica. Se caracterizan por ser animales pluricelulares, cuyas células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa, la cual encierra una cavidad digestiva continua que se comunica directamente con el exterior a través de una abertura o boca. Algunas de las células intersticiales de la epidermis dan origen a los órganos característicos de defensa y ataque.

Los ensayos de toxicidad con *H. attenuata* permiten determinar subletalidad y letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. Las pruebas de toxicidad con *H. attenuata* tienen una duración máxima de 96 h, tiempo durante el cual los organismos son expuestos al compuesto tóxico o muestra problema. Durante el ensayo, diariamente se hace

un examen microscópico y se registra los cambios morfológicos producidos. La exposición de los organismos a compuestos tóxicos da lugar a una serie de cambios morfológicos (efectos subletales) y dependiendo de la concentración, puede producir la muerte de los individuos (efectos letales). Los resultados de las pruebas permiten además de la estimación de la  $CL_{50}$  y la  $CE_{50}$ , establecer la LOEC (efectos letales), la NOEC (efectos subletales) y la concentración umbral de efectos observables (Threshold Observable Effect Concentration, TOEC) (Granados, Ronco & Baez-Díaz, 2008)

### Desarrollo del método

Primero se establece el cultivo de *H. attenuata*: Temperatura  $21 \pm 2$  °C, Fotoperiodo 16 h luz: 8 oscuridad luz Fluorescente, blanco-frío Intensidad luminosa  $< 800$ . Recipientes de mantenimiento Circulares de vidrio de 20 cm de diámetro de fondo plano, cubiertos con un vidrio o papel que se permita la entrada de aire. La alimentación de los organismos por 4 d/semana con nauplios de *Artemia sp.*, desinfectados con solución yodada.

Se evalúa la salud de las hidras y el desarrollo del cultivo están en condiciones óptimas por medio de la tasa de crecimiento del cultivo.

Se selecciona un grupo de organismos mantenidos sin alimentación durante 24 h. Se elimina el medio de cultivo invirtiendo el recipiente y descartando el líquido, los organismos permanecerán adheridos al fondo del recipiente.

Se adiciona un volumen de medio de cultivo sin EDTA. Se resuspenden los organismos y se concentran en el centro del recipiente.

Se colocan las hidras en un recipiente de 10 cm de diámetro con medio de cultivo sin EDTA y, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se transfieren de 10 a 15 organismos a cada una de las cajas Petri.

En una microplaca de cultivo celular de 12 pozos, se depositan 3 hidras en cada pozo, evitando aquellas que presenten yemas, se adicionan 4 mL de cada concentración de la muestra, control positivo (Cr (VI) a partir de dicromato de potasio) y control negativo (agua dura), se realiza por triplicado. En paralelo, se adiciona un volumen de 3 a 4 mL de cada solución en cajas Petri de  $35 \times 10$  mm. Se incuban a las condiciones antes mencionadas por un período de 96 h.

Cada 24 h se realiza la observación de los organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico o lentillas de acercamiento con capacidad de 6 a 10X. Al terminar la revisión diaria, se suma el número total de hidras que presentan el mismo estado morfológico en los tres pozos correspondientes a cada dilución.

Con los resultados, se forman tres grupos: el primero definido por el número de hidras normales, el segundo con organismos que presentan efectos reversibles (número de bulbos + número de cortas) y el tercero con organismos que presentan efectos irreversibles (número de tulipanes + número de desintegradas).

Se calcula el porcentaje de efecto subletal y letal. El primero se calcula a partir de la suma del número de organismos que presentan anomalías en su morfología, ya sea del tipo reversible o irreversible, y el segundo se obtiene a partir del número de organismos con anomalías exclusivamente irreversibles. Con estos datos se estiman los valores de  $CE_{50}$  o de  $CL_{50}$ , mediante los métodos estadísticos Probit, promedios móviles o Sperman y Karber, así como los valores de la LOEC, NOEC, y TOEC. Este último se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$TOEC = (NOEC \times LOEC)^{1/2} \quad (8)$$

*Ecuación 8. Determinación de la concentración umbral de efectos observables*

#### 2.3.1.5. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Se evalúan los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos (Sobrero & Ronco, 2004).

## Desarrollo del método

Se recomienda primero realizar un ensayo preliminar de las sustancias a evaluar, utilizando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%, necesarios para calcular la  $CI_{50}$ .

Colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro (Indicar: la dilución correspondiente, fecha, hora de inicio y término del bioensayo). Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad, cubrir las cajas de Petri de la luz inmediatamente después de colocar las semillas en su interior y durante el período de ensayo (por triplicado)

Incubar por 120 h (5 d) a una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Se mide el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo con una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas, de todos los tratamientos. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

Observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto).

Para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, se procede a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado).

Se realizan los siguientes cálculos:

Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas.

Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo con el promedio de elongación respecto del promedio de elongación del control negativo.

Porcentaje de inhibición en la germinación.

Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración.

Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición ( $CI_{50}/CE_{50}$ )

Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.

#### 2.3.1.6. *Ensayo de toxicidad con el nematodo Panagrellus redivivus*

El nematodo de la especie *P. redivivus* es un organismo de prueba aplicable al biomonitoreo de aguas y sedimentos. Se ha usado para la detección de toxicidad de muestras ambientales complejas como son aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados, ya sea a través del análisis de fracciones químicas obtenidas a partir del pretratamiento de muestras o de la obtención de elutriados o extractos.

*P. redivivus* es una especie dioica y ovovivípara. El primer estadio de desarrollo ocurre en el útero de las hembras y es denominado como J1, en el que se desarrolla la embriogénesis con una duración aproximada de 20 h. Cuando el estadio J1 muda da lugar a los juveniles o J2, que emergen del huevo y son expulsados por la vulva de la hembra como libres nadadores. Los recién nacidos (J2) continúan su crecimiento pasando por otros dos estadios juveniles, J3 y J4, hasta alcanzar el estado adulto a las 96 h de su nacimiento. Cada estadio se caracteriza por la longitud del organismo, ámbito que está bien definido para *P. redivivus*. Sin embargo, bajo condiciones adversas del medio de vida, los organismos responden ya sea muriendo o mostrando alteraciones en su periodo de desarrollo. Estas manifestaciones de efecto se determinan por el monitoreo

del crecimiento de una población de 100 organismos en estadio J2 a lo largo de un periodo de 96 h. A partir de su seguimiento es posible determinar efectos letales, a través del número de organismos muertos. Asimismo, se pueden observar efectos subletales crónicos y de genotoxicidad, a través del número de organismos estancados en etapas retardadas de desarrollo (J2, J3 y J4) o, en caso de alcanzar etapas adultas, también se pueden evaluar efectos de mayor escala temporal por el número de hembras grávidas y el número de sus huevos (Granados, 2008).

### **Desarrollo del método**

Se realiza un cultivo de *P. redivivus* en frascos con medio de harina-agua, el cual se inocula con una pequeña población con una pipeta Pasteur. Después de algunos días los enjambres de nemátodos pueden ser observados en las paredes del frasco, al reproducirse y hacerse visibles en la tapa de la caja Petri de donde pueden lavarse con buffer M9 para obtener las hembras, sin arrastrar restos de harina que interfieran en la prueba.

24 h antes de cada prueba se separan las hembras y se inoculan en placas de cultivo con medio agar-agua que contiene también colesterol (animales J2 en un estado fisiológico similar).

Los nemátodos de un cultivo stock en caja Petri son inundados con buffer M9 y son pasados a través de un tamiz, quedan los organismos de mayor tamaño, los cuáles se recuperan mediante un enjuague con buffer M9 sobre una placa fresca de agar a una profundidad no mayor de 2 a 4 mm de buffer. Dentro de estos adultos separados habrá muchas hembras grávidas. Estas hembras producirán de 10 a 20 organismos J2 en un período de 12 h. Al siguiente día, se tamizan nuevamente los organismos y se lavan con medio M9, pero ahora los organismos que se utilizan son los que pasan por el tamiz. Esta progenie definida en estado J2 será usada. Se lavan con buffer M9, a temperatura ambiente.

Preparación de diluciones de muestras problema para muestras problema líquidas (agua, extractos orgánicos y elutriados) se preparan alícuotas de 10 mL diluidas en medio M9Y. Para muestras acuosas (10%) se adiciona: 1.0 mL de muestra + 9.0 mL de medio M9Y. Para extracto orgánico en metanol (3%) se adiciona: 0.3 mL de extracto orgánico de la muestra en 9.7 mL de medio M9Y. Para extrac-

to orgánico en dimetilsulfóxido (1%) se adiciona: 0.1 mL de extracto orgánico de la muestra + 9.9 mL de medio M9Y.

Cada una de las diluciones preparadas se distribuye en volúmenes de 0.5 mL en 10 vasos pequeños de vidrio o materiales plásticos no tóxicos, de fondo plano, de aproximadamente 1 cm de diámetro y capacidad de 2.5 mL.

Bajo el microscopio se toman 10 nemátodos J2 con la ayuda de una micropipeta Drummond con capilar y punta (Eppendor loader tips) y se colocan dentro de los recipientes sobre las soluciones de prueba. Que la gota en que se tomen a los nemátodos sea lo más pequeña posible a fin de afectar lo menos posible la concentración.

Se debe correr un blanco con las soluciones involucradas en el mismo (agua, metanol, dimetilsulfóxido), se diluye en medio M9Y en la misma relación (v/v) empleada en la preparación de las muestras problema, un control negativo con medio M9Y y un control positivo con soluciones del compuesto tóxico de referencia (Zn (II) preparadas a partir de sulfato de zinc) a 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/L. Los animales se dejan crecer en los recipientes bien tapados durante 96 h a  $20 \pm 2$  °C.

Los recipientes se abren y se registra el número de sobrevivientes en cada vaso. Posteriormente, se tapan de nuevo y se colocan en agua caliente a 60 °C por unos minutos, el calor mata a los nemátodos y provoca su estiramiento y una mejor apreciación de su tamaño. La revisión y medición de cada organismo puede efectuarse en este momento u optar también por aplicar tinción, preferentemente con una gota de rosa de bengala (0.5 g/L) o con otros colorantes como azul-algodón-lactofenol o azul de metileno. La longitud debe determinarse de forma inmediata midiendo a través de un microscopio con reglilla ocular. Se recomienda hacer la medición a un aumento de 1.6X. Se registra el número de animales en cada estadio.

Los efectos sobre la sobrevivencia, el crecimiento y la maduración de la población expuesta a muestras problema son expresados como porcentajes, en relación a los valores obtenidos para estos mismos parámetros en la población del control.

El porcentaje de sobrevivientes en la población expuesta a una muestra que se sospecha tóxica, en relación a los sobrevivientes de la población control. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$S = 100 \times \frac{ST}{SC} \quad (9)$$

*Ecuación 9. Determinación de organismos sobrevivientes frente al agente químico*

Donde:

$S$  = sobrevivencia

$ST$  = número de sobrevivientes de la prueba

$SC$  = número de sobrevivientes del control

Para ver si es significativamente distinta respecto a la del control se calcula el valor de  $\chi^2$  por la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \frac{(ST - SC)^2}{SC} \quad (10)$$

*Ecuación 10. Determinación de  $\chi^2$  para determinar la significancia del método*

Si  $\chi^2$  es mayor a 5 indica que la letalidad es significativa.

*Crecimiento*

Cuando un número significativo de animales en la prueba no alcanza el estadio J4 o el estado adulto. Este parámetro se obtiene a partir de la siguiente:

$$C = 100 \times \left( \frac{J4T + AT/ST}{J4C + AC/SC} \right) \quad (11)$$

*Ecuación 11. Determinación del crecimiento de los organismos*

Donde:

$C$  = crecimiento

$J4T$  = número de organismos J4 en la población de prueba

$AT$  = número de organismos adultos en la población prueba

$ST$  = número de sobrevivientes de la prueba

$J4C$  = número de organismos  $J4$  en la población control

$AC$  = número de organismos adultos en la población control

$SC$  = número de sobrevivientes del control

La significancia estadística de las diferencias entre el crecimiento en el control y el observado en la muestra problema también se calcula a través del análisis por  $\chi^2$ , a partir de la siguiente ecuación:

$$C = 100 \times \left( \frac{(J4T + AT) - (J4C + AC)}{(J4C + AC)} \right)^2 \quad (12)$$

*Ecuación 12. Determinación de  $\chi^2$  para determinar la significancia en el crecimiento de los organismos*

Con estos datos es posible establecer si se presentó una inhibición o estimulación del crecimiento.

### *Maduración*

La maduración resulta de un desarrollo normal hasta el estadio de  $J4$ ; sin embargo, los nemátodos no logran la maduración gonádica que les permite convertirse en adultos y avanzar su reproducción. La evolución del estadio  $J4$  a adulto requiere de la acción de esteroides y de la actividad genética. La inhibición específica de esta muda sugiere la acción de agentes genotóxicos. Para el cálculo de este parámetro se emplea la siguiente ecuación:

$$M = 100 \times \frac{(AT) / (J4T + AT)}{(4C + J4C + AC)} \quad (13)$$

*Ecuación 13. Determinación de la Maduración de los organismos*

Donde:

$M$  = maduración

$AT$  = número de organismos adultos en la población prueba

$J4T$  = número de organismos  $J4$  en la población de prueba

$AC$  = número de organismos adultos en la población control

$J4C$  = número de organismos  $J4$  en la población control

La significancia estadística de las diferencias entre la maduración en el control y la muestra problema también se calcula a través del análisis por  $\chi^2$ , a partir de la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = 100 \times \frac{(AT - AC)^2}{(AC)} \quad (14)$$

*Ecuación 14. Determinación de la significancia en la maduración de los organismos*

Si  $\chi^2$  es mayor a 5 indica un efecto significativo en la maduración.

#### *Estado general de salud*

Es un valor sumario que relaciona los diversos parámetros medidos y pone énfasis en la comparación del crecimiento y de la maduración. Para ello, se da a los diferentes parámetros un valor de peso ponderado, que para la sobrevivencia es de 4, para el crecimiento de 2 y para la maduración de 1. Para su cálculo se emplea la siguiente ecuación:

$$E = 100 \times \frac{(4 \times S) + (2 \times C) + M}{7} \quad (15)$$

*Ecuación 15. Determinación del estado general de salud de los organismos*

Donde

$E$  = estado general de salud

$S$  = sobrevivencia

$C$  = crecimiento

$M$  = maduración

#### *Aceptabilidad de los resultados*

Los resultados de la prueba deben ser ignorados y la prueba repetida si alguno de los siguientes puntos es observada:

- Si menos que el 90% de la población control alcanza el estado adulto
- Si más del 10% de la población control muere
- Si hay crecimiento microbiano excesivo en el sistema de prueba

### 2.3.1.7. Otros métodos para evaluar la toxicidad

La comisión Europea, propone también los siguientes métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud (Comisión Europea, 2016):

- Mutación génica en *Saccharomyces cerevisiae*
- Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*
- Mutación génica de células de mamífero *in vitro*
- Lesión y reparación de ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero *in vitro*
- Ensayo *in vitro* de intercambio de cromátidas hermanas
- Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*
- Ensayo de transformación de células de mamífero *in vitro*
- Ensayo de letalidad dominante en roedores
- Ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero
- Ensayo de la mancha en ratón
- Translocación hereditaria en ratón
- Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
- Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores
- Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
- Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores
- Ensayo de toxicidad crónica
- Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores
- Ensayo de carcinogénesis
- Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis
- Ensayo de toxicidad para la reproducción en una generación
- Ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones

## 2.4. Conclusión

La capacidad antioxidante definida como el potencial de neutralizar a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y NOS) tiene como resultado la protección al daño celular promovido por dichas especies reactivas. La búsqueda de metabolitos de las plantas con dicha capacidad ha ido en incremento en las últimas décadas dados los beneficios que aportan, se ha demostrado que las moléculas con capacidad antioxidante además guardan un vínculo estrecho con otras actividades biológicas de importancia, como lo son antitumorales, anticancerígenas, antimicro-

crobianas, antiinflamatorias, antidiabéticas, entre otras; por lo que su aislamiento y estudio son de gran importancia para la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. Dentro los principales protocolos para la determinación de dicha capacidad podemos mencionar la neutralización del radical DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, AAPH<sup>+</sup>, ORAC, así como los análisis de reducción de diferentes especies químicas como el método CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) el método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power). Si una molécula presenta una actividad biológica específica, es necesario determinar si dicha molécula tiene efectos de toxicidad dependiendo de su dosis, por lo tanto, es de vital importancia el estudio de la concentración efectiva y de la concentración de letalidad en organismos vivos, ya sea por técnicas *in vitro*, pero más aún en técnicas *in vivo* que indiquen el grado de impacto sobre sistemas pluricelulares para escalar después en la vía de implementación a nivel clínico sobre pacientes. Es aquí que las técnicas como el ensayo de letalidad sobre *A. salina*, *D. magna*, el ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L, entre otros, nos ofrecen protocolos que cumplen con el principio de las 3 «R» Reducción, Refinamiento y Reemplazo en los sistemas de investigación, que nos brindan además de beneficios como bajo costo, menor número de organismos involucrados y una alta reproducibilidad.

## Referencias

- Agudo, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta*, 27-34.
- Alvarez, R., Carvalho, C.P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(3), 774-81. <http://doi.org/10.1021/jf203353h>
- Aoki M, K., Encarnación-Dimayuga, R., & Cortés A, A. R. (2005). Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 36(1), 11-17.
- Arencibia-Arrebola, F.D., Fernández, R.L.A., López-Feria, Y., Fariñas-Medina, M., Infante-Bourzac, J.F., & Prieto-Díaz, J. L. (2003). Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Retel revista de toxicología en línea*, 1-15.

- Báez-Díaz, C. M., Ronco, A., & Pica-Granados, Y. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces Reactivos y soluciones. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 33-40). México DF: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Barahona, M.V., & Sánchez-Fortún, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*, 104(3), 469-476. [http://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00152-3](http://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00152-3)
- Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-6. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bonofiglio, D., Giordano, C., De Amicis, F., Lanzino, M., & Ando, S. (2016). Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(8), 596-604.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., & Garcia-Gravalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., & Paoli, P. (2016). Morin: A Promising Natural Drug. *Current Medicinal Chemistry*, 23(8), 774-791. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666160106150821>
- Cellbiolabs. (2016). ORAC. Recuperado 11 de mayo de 2016, a partir de <http://www.cellbiolabs.com/orac-oxygen-radical-antioxidant-capacity-assay>
- Comisión Europea. (2016). Parte B: Métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud. Recuperado 13 de abril de 2016, a partir de [http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/annex5b\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/annex5b_es.pdf)
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and

- mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 110(2), 334-342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.001>
- Díaz-Báez, M.C., Granados, Y.P., & Ronco, A. (2008). Ensayos para agua dulce. En *Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 17-32). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Formagio, A.S.N., Ramos, D.D., Vieira, M.C., Ramalho, S.R., Silva, M.M., Zarate, N.A.H., et al. (2015). Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 75(1), 69-76. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.07413>
- García-Hernández, D. G. (2016). *Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Granados, Y.P. (2008). Ensayo de toxicidad con el nemátodo *Panagrellus redivivus*. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 139-154). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Granados, Y.P., Ronco, A., & Baez-Díaz, M.C. (2008). Ensayo de toxicidad agua con el cnidario *Hydra attenuata*. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 41-54). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Gutiérrez-Avella, D.M., García-Ortiz, C.A., & Mendoza-Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. En *Simposio de Metrología* (pp. 1-5).
- Harwig, J., & Scott, P.M. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied microbiology*, 21(6), 1011-6.
- Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M.M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in

- Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(14), 5703-5707. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5703>
- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.-R., & Sticher, O. (2008). Biological Screening of Cyanobacteria for Antimicrobial and Molluscicidal Activity, Brine Shrimp Lethality, and Cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 41(4), 243-247. <http://doi.org/10.1076/phbi.37.2.138.6092>
- Martinez, M., Ramo, J.D., Torreblanca, A., & Díaz-Mayans, J. (1999). Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture*, 315-325. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00431-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00431-1)
- McLaughlin, J. (1991). Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En Academic Press (Ed.), *K. Hostettmann, Assays for Bioactivity*. (pp. 2-32). San Diego, CA. USA.
- Mhadhebi, L., Mhadhebi, A., Robert, J., & Bouraoui, A. (2014). Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(1), 207-220.
- Pastene, E.R. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 449-455.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., & Petschelt, A. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of dentistry*, 28(5), 341-345. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(00\)00007-5](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(00)00007-5)
- Plazas-Gonzalez, E.A. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 182-199.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Salim, E.I., Abd El-Magid, A.D., Farara, K.M., & Maria, D.S.M. (2015). Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(17), 7641-7651. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7641>
- Sobrero, M.C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 55-68). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., & Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta medica*. <http://doi.org/10.1055/s-2006-959661>



## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

---

**Eduardo Sánchez-García, Sandra Loruhama  
Castillo-Hernández, Patricia García-Palencia**

Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[eduardo.sanchezg@uanl.mx](mailto:eduardo.sanchezg@uanl.mx), [sandra.castilloh@uanl.mx](mailto:sandra.castilloh@uanl.mx),  
[patricia.garciapl@uanl.edu.mx](mailto:patricia.garciapl@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>

Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., & García-Palencia, P. (2016).  
Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A.,  
& Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barce-  
lona, España: OmniaScience. 77-100.

## Resumen

Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. Existen pruebas estandarizadas *in vitro* conocidas como bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana, las cuales son técnicas esenciales en la búsqueda de actividades biológicas de nuevos compuestos naturales.

Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos.

Por otro lado los métodos de dilución son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana, la técnica más utilizada es la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI), con la cual se define la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Esta técnica puede ser mejorada con la ayuda de indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana.

Una vez que se ha establecido de forma cualitativa y cuantitativa el efecto antimicrobiano de los extractos es conveniente determinar el compuesto responsable de dicha actividad. La bioautografía es la técnica más utilizada para tal fin ya que nos indica directamente la localización del compuesto de interés en una cromatografía de capa delgada. Dicho compuesto puede ser obtenido en cantidades suficientes, utilizando técnicas como la cromatografía en columna y la cromatografía en capa preparativa para realizar diferentes bioensayos o para caracterizarlo mediante técnicas espectroscópicas.

Las metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas son muy variadas, sin embargo, siempre aportan información muy valiosa para la búsqueda preliminar de compuestos con propiedades antimicrobianas. Es importante tomar en cuenta los factores que pueden causar variaciones en los resultados, de ahí la importancia de la estandarización de los métodos y la recomendación es evaluar la actividad antimicrobiana por métodos ya estandarizados.

## Palabras Clave

Extractos de plantas, actividad antimicrobiana, técnicas de evaluación antimicrobiana.

### 3.1. Introducción

Desde la antigüedad han sido empleadas las plantas para diferentes fines ya sean en el área de alimentos (condimento), en la cosmetología y en la médica principalmente enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades (Negroni, 2000). Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. A este respecto, el desarrollo de fármacos comienza con la identificación de los principios activos, para después utilizando diversos ensayos biológicos obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida (Ncube, Afolayan & Okoh, 2008). Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, a través de diferentes métodos *in vitro* principalmente desarrollados en el laboratorio y así establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia ya sean a bacterias, hongos y protozoos (Ramirez & Marin, 2009); además se deben considerar diversos ensayos de toxicidad, para asegurar su consumo (Cos, Vlietinck, Berghe & Maes, 2006).

Estas pruebas estandarizadas son de vital importancia, debido a que la actividad biológica de extractos de plantas o sus compuestos puros es evaluada en todo el mundo por diferentes grupos de investigación. Esto es relevante debido a que se pueden obtener diferentes beneficios de los métodos antes mencionados como son el establecer una terapia alterna, una vez que el extracto vegetal ha sido evaluado en diferentes concentraciones, considerando sus propiedades antimicrobianas y tóxicas, además de establecer el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción de los extractos vegetales, generar una base de datos que permitan seleccionar los diferentes extractos vegetales para el tratamiento de diversas afectaciones médicas, hasta desarrollar políticas de uso de los extractos vegetales estudiados (Taroco, Seija & Vignoli, 2006).

Las pruebas de susceptibilidad microbiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas (Bakht, Humaira, Madiha & Haq, 2015). Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana, pueden influir en los

resultados de una manera contundente. Los métodos antimicrobianos y antifúngicos, están clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y métodos bioautográficos (Ramírez & Marin, 2009).

Los ensayos de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Y aunque no existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos para evaluar la actividad de extractos sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Cowan, 1999).

Método de difusión. Es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; el método se desarrolla en base a los fundamentos descritos por (Bauer, Kirby, Sherris & Turck, 1966) en el método de Kirby-Bauer. Esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos (Ramírez & Marin, 2009).

Se recomienda su empleo cuando una bacteria se aísla y se desconoce su sensibilidad, sobre todo si se conoce que el microorganismo presenta resistencia a los antimicrobianos más frecuentes y además, cuando se sabe que el microorganismo tiene sensibilidad a cierto medicamento, pero el paciente presenta una alergia hacia él, para estudiar nuevas alternativas de tratamiento a través de extractos naturales (Taroco et al., 2006).

A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar

de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar. Una desventaja que se presenta cuando la sustancia a probar es un extracto natural es el papel filtro Whatman debido a que contiene celulosa y esta posee grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica actuando directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco impidiendo la difusión de estos en el agar; lo que explica porqué el método de pozo es más sensible (Burgess, Jordan, Bregu, Mearns-Spragg & Boyd, 1999).

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. *Técnica de difusión en placa*

- **Material vegetal.** La planta colectada se debe secar en la sombra a temperatura ambiente, posteriormente la planta seca es triturada para llevar a cabo el proceso de extracción.
- **Microorganismos.** Es importante de establecer si estos provienen de muestras clínicas de paciente o si son cepas de referencia ATCC con la finalidad de conocer las condiciones físico-químicas específicas de cada uno de los microorganismos en estudio y que estos no sean factores que influyan de manera negativa en el procedimiento.
- **Medio de cultivo.** Cuando las cepas se encuentran liofilizadas se cultivan en caldo para posteriormente preservarse en agar inclinado en tubo (bacterias). El tipo de agar para el tubo inclinado dependerá del tipo de microorganismo, aunque los medios más recomendados son infusión cerebro y corazón (ICC), agar soya tripticasa (TSA), agar Mueller Hinton (MH) o agar nutritivo. En el caso de hongos y levaduras, se recomienda agar Saboreaud-Dextrosa. Las temperaturas de incubación, varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  para la mayoría de las bacterias mientras que para hongos y levaduras la temperatura recomendada es de  $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de incubación puede variar de 24-48 h, mientras que para el crecimiento de hongos se recomiendan de 5 a 7 d. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se deben incubar según las condiciones descritas anteriormente aplicando el método de pozo o de disco. Para la técnica de difusión en pozo algunos medios son recomendados para microorganismos específicos, tal es el caso

del agar Baird-Parker para el cultivo de *Staphylococcus aureus*; el agar McConkey para *Escherichia coli*; agar sangre para *Streptococcus*  $\beta$  hemolítico y agar Saboreaud-Dextrosa para *Saccharomyces cerevisiae*; para el método de disco se emplea cotidianamente Muller Hilton a excepción de las levaduras en las que se emplea el medio descrito en el método modificado de pozo en agar.

- **Preparación del inóculo.** Una vez cultivadas las cepas en el medio inclinado, se toman con el asa inóculos del cultivo colocándose en un tubo con solución salina (0.85%) se debe ajustar el inóculo a 0.5 unidades ( $10^8$  cel/mL) según la escala de Mc Farland y se verifica con la absorbancia a 580 nm cercana al 25%.

#### 3.2.1.1. Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer)

Se realiza la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton (bacterias) y Saboreaud-Dextrosa (levadura). Se impregnan de 10 a 25  $\mu$ L de los extractos, estándares y blancos en cada uno de los discos de papel filtro Whatman N° 42 por triplicado y se colocan sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incuban invertidas a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h para bacterias y a  $29\pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Figura 1).

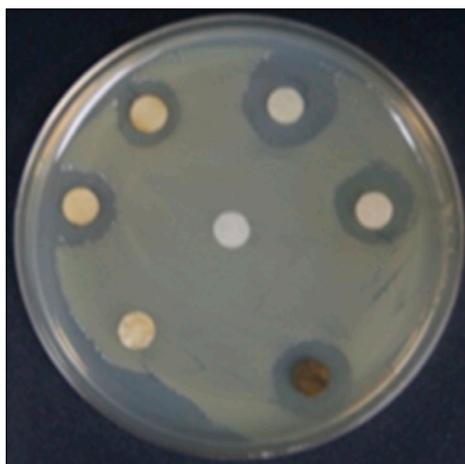


Figura 1. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en disco

### 3.2.1.2. Método modificado de pozos de agar

Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25  $\mu\text{L}$  de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h para bacterias y a  $29\pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Figura 2) (Ríos, Recio & Villar, 1988).



Figura 2. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en pozo

### 3.2.2. Métodos de dilución

Estos métodos son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana (Klančnik, Piskernik, Jeršek & Možina, 2010). En esta técnica una cantidad de extracto de planta o compuesto activo, es mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Puede ser llevado a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada p/v o v/v con respecto al medio de cultivo.

### 3.2.2.1. *Dilución en agar*

En este método, el agar es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio. Por ejemplo, si tuviésemos un extracto crudo del que no conociéramos su concentración, podría agregarse una alícuota en peso (mg,  $\mu\text{g}$ ) aforando a un volumen final; es decir si tuviésemos una alícuota de 100  $\mu\text{g}$  y completáramos el volumen con el medio de cultivo a 1 mL tendríamos una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Posteriormente, se siembra por extensión en la superficie del agar 1 mL del cultivo microbiano incubándose por tiempo determinado para cada tipo de microorganismo. Para este método, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible. La desventaja de este método radica en la gran cantidad de medio que se coloca en la placa Petri regular (23 mL aprox) por lo que se requiere gran cantidad de extracto y/o compuesto. Para contrarrestar esto, pueden utilizarse placas pequeñas o placas de tres divisiones sembrando 100  $\mu\text{L}$  de cultivo microbiano. Esto con el fin de utilizar menor cantidad de agar, extracto y/o compuesto. También puede sembrarse por goteo mediante el método de Miles y Misra (descrito más adelante) con lo que podrían sembrarse en una misma placa, cepas diferentes. A pesar de esta recomendación, hay que tener cuidado con la cantidad de humedad contenida en el agar, pues al sembrar por goteo, las gotas pueden migrar a través del agar y juntarse unas con otras. Por ello es de suma importancia que las placas tengan la prueba de esterilidad que ayudará a evitar un exceso de humedad en el medio.

#### 3.2.2.1.1. Dilución en medio líquido

En el caso de dilución en medio de cultivo líquido (dilución en caldo), se procederá de la misma forma descrita en la sección anterior para obtener una concentración final del extracto en el medio, sin embargo, la interpretación de los resultados se realiza de manera diferente, por turbidimetría e indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana. Para este tipo de técnicas se requiere un espectrofotómetro en el cual se realizan lecturas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano y de 540-570 nm cuando se utiliza REDOX. Las desventajas de la turbidimetría se presentan en aquellos compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura. Es por ello de suma importancia utilizar

un control de crecimiento (medio de cultivo y microorganismo sin adición de compuesto o extracto) así como un blanco que contenga medio de cultivo y el compuesto en cuestión sin adición del microorganismo.

En el caso de los indicadores REDOX, los utilizados principalmente son el bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y resazurina. El primero está basado en la conversión del MTT a formazán por las células metabólicamente activas, produciendo un color púrpura directamente proporcional a la viabilidad celular; normalmente se prepara en una concentración de 0.5% con agua destilada (v/v) después de 24-48 h de incubación o el requerido por el microorganismo. Una vez adicionado el MTT la reacción se lleva a cabo en 3-5 h, presentándose un viraje a azul en aquellos cultivos en donde haya viabilidad celular. Los cultivos deben ser centrifugados para recuperar el formazán al cual se le adiciona dimetil sulfóxido (DMSO) para disolverlo, finalmente se lee a una DO de 540-570 nm dependiendo de las indicaciones del fabricante, ya que hay casos en que el ensayo se proporciona a manera de «KIT» especificando la DO de lectura (Wang et al 2010). Este ensayo tiene la desventaja que el resultado no es directo, sino que se lleva a cabo en dos etapas, la reducción del MTT a formazán y la disolución de éste último en un compuesto orgánico siendo el DMSO el más utilizado.

El segundo método se basa en la reducción de resazurina a resofurina por las células metabólicamente activas, produciendo un color rosa directamente proporcional a las células viables. La resazurina se prepara con agua destilada a una concentración de 0.01% esterilizándose por filtración (Palomino et al., 2002); después del tiempo de incubación requerido por el microorganismo, se agrega una alícuota (10% v/v) de la resazurina preparada y se deja incubar por 30 min más para observar el cambio de color. Este método tiene la ventaja de ser directo sin embargo hay que ser cuidadosos con las interferencias en la lectura que se pudieran presentar debido al tipo de compuestos o extractos adicionados.

Estos dos métodos pueden escalarse a micrométodos en donde los cultivos se realizan en placas de 96 pozos (microplacas), teniendo en cuenta las proporciones arriba mencionadas.

La CMI se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color.

El método de dilución en medio líquido permite también determinar efecto bacteriostático o bactericida. Para hacer esta determinación se debe realizar un conteo en placa antes y después de la incubación, mediante la utilización de diluciones seriadas (1:10) en tubos con 9 mL de solución salina al 0.85%. Posteriormente se adiciona 1 mL del cultivo y se va diluyendo en serie pasando 1 mL del tubo anterior al tubo nuevo las veces que se desee. Para inóculos muy grandes se recomienda una serie de 10 tubos, mientras que para inóculos pequeños, de 5 a 6 diluciones. Al diluir se van obteniendo diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  etc.) por lo que al plaquear 1 mL de  $10^{-1}$ , el resultado obtenido se multiplica por el inverso de la dilución es decir por 10. Esto es, si la cuenta en placa de la dilución  $10^{-1}$  resultó en 150 colonias, el resultado final será 1500 UFC/mL. Si hubiese 12 colonias en la dilución  $10^{-2}$ , el resultado se multiplicaría por 100 por lo que el conteo final quedaría como 1200 UFC/mL. Este método se puede escalar a micro-método colocando 1.8 mL de solución salina en tubo, adicionando 200  $\mu$ L del cultivo y en las subsecuentes diluciones. En el citado micro-método, se podrían plaquear 100  $\mu$ L, por lo que el resultado final para 1 mL tendría que multiplicarse por 10 debido a que solo se plaqueó la décima parte. Es decir, si en la dilución  $10^{-2}$  se obtuvieran 12 colonias, antes de multiplicarse por el inverso de la dilución, se multiplicaría por 10 (120 UFC) para posteriormente multiplicarse por el inverso:  $120 \times 100 = 12,000$  UFC/mL.

Para determinar si el efecto del extracto o compuesto en cuestión es bacteriostático o bactericida, se toma en cuenta el conteo en placa obtenido. Para considerarse bactericida, no debe haber crecimiento en el cultivo, mientras que al obtener un crecimiento igual al inóculo inicial, se considera bacteriostático. Una de las técnicas utilizadas para el conteo bacteriano es la técnica de Miles y Misra (1938), en donde después de realizar las diluciones en tubo e incubar el tiempo determinado, se toman alícuotas de 20  $\mu$ L depositando en forma de gota en el agar (Lee et al., 2009). Por lo que en este caso, el resultado obtenido deberá multiplicarse por 50 para ajustar el resultado a 1 mL para posteriormente multiplicar por el inverso de la dilución. Es decir si en la dilución  $10^{-2}$  se obtuvieron 9 colonias, este resultado se multiplicará por 50 antes de multiplicarse por el inverso de la dilución ( $9 \times 50 = 450 \times 100 = 45,000$  UFC/mL).

Los métodos de dilución en caldo son métodos que han permitido determinar la CMI de una gran cantidad de compuestos. Las ventajas de estos métodos sobre la difusión son la sensibilidad y reproducibilidad, además de ser utilizados para una gran cantidad de microorganismos. La concentración mínima bacteri-

cida, normalmente refiere aquella concentración que causa la muerte total del microorganismo, por lo que requiere un plaqueo del cultivo que corrobore este hecho. Uno de los medios que se recomienda para este tipo de ensayos es el Muller Hinton para aquellos microorganismos que no se consideran fastidiosos también el Soya Trypticase junto con el agar nutritivo, podrían considerarse para estos microorganismos. Hay que considerar los factores que pudiesen generar variaciones en el resultado, entre ellos el inóculo. Se recomienda un inóculo de  $10^5$  para bacterias y de  $10^4$  para levaduras. Un inóculo muy bajo  $10^2$  dará falsos positivos, mientras que uno alto  $10^8$ , dará falsos negativos. Aunado a esto, es importante tomar los inóculos de cultivos frescos que se encuentren en fase logarítmica (Cos et al., 2006).

### **3.2.3. Bioautografía**

Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto (Ncube et al., 2008). La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad de el mismo (Cretu & Morlock, 2014; Jesionek, Choma, Majer-Dziedzic & Malinowska, 2014)

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas (Choma & Jesionek, 2015), se conoce como purificación guiada por bioensayos (Schmourlo, Mendonça-Filho, Alviano & Costa, 2005). Esta técnica tiene un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas, además da una idea precisa de la polaridad de los compuestos activos (Runyoro, Matee, Ngassapa, Joseph & Mbwambo, 2006); es un ensayo práctico, fácil de realizar y es sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica (Silva, Simas, Batista, Cardarelli & Tomassini, 2005).

Los métodos bioautográficos son divididos principalmente en tres categorías (Dewanjee, Gangopadhyay, Bhattacharya, Khanra & Dua, 2015):

- a) Bioautografía por contacto.
- b) Bioautografía directa.
- c) Bioautografía por inmersión o por superposición de agar.

Hay que considerar que antes, se debe seleccionar la fase móvil que proporcione mayor separación de los componentes del extracto con el fin de poder realizar la identificación del compuesto responsable con mayor facilidad.

#### *3.2.3.1. Bioautografía por contacto*

En este método se deben preparar placas Petri con agar Mueller Hinton (MH), posteriormente, la placa cromatográfica previamente eluída y sin restos de solventes, se coloca «cara abajo» sobre el agar inoculado con la cepa de interés, una vez colocada se debe permitir que los compuestos separados difundan hacia el agar, por lo que es recomendable mantener la CCF sobre el agar por 2 h. Después de esto, el cromatograma es retirado y la placa Petri será incubada considerando las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, la actividad antimicrobiana se evidencia mediante la aparición una zona de inhibición del crecimiento sobre la superficie del agar en el lugar donde el o los compuestos antimicrobianos estuvieron en contacto con la capa de agar (Horváth et al., 2010).

#### *3.2.3.2. Bioautografía directa*

En este método, la cromatografía en capa delgada previamente eluída y sin restos de solventes, es sumergida en una suspensión del microorganismo de interés, el cual se encuentra en crecimiento activo y en un caldo de cultivo apropiado (Queiroz, Wolfender, Atindehou, Traore & Hostettmann, 2002), posteriormente la bioautografía se incuba en una cámara húmeda y bajo las condiciones apropiadas para el desarrollo del microorganismo utilizado, esto permitirá que la sílica cubierta con el caldo de cultivo sirva de soporte y permita el crecimiento del microorganismo directamente sobre la CCF. Después del tiempo de incubación se observan las zonas donde no hay crecimiento, las

cuales corresponden a los compuestos antimicrobianos buscados (Choma & Grzelak, 2011).

### 3.2.3.3. Bioautografía por inmersión o por superposición de agar

Esta técnica es una combinación de la bioautografía por contacto y la bioautografía directa. En esta el cromatograma es cubierto con una capa de agar MH previamente inoculado, hay que considerar que el agar debe estar aproximadamente a 45 °C al momento de inocularlo para evitar inactivar al microorganismo en cuestión. Posteriormente, la placa cubierta con agar es incubada en cámara húmeda durante el tiempo y la temperatura apropiada, después de esto, zonas claras sobre la placa de CCF indican la actividad antimicrobiana de los componentes (Figura 3) (Marston, 2011).

Estandarización de las técnicas.

Estas técnicas, aunque fáciles de realizar, presentan algunos inconvenientes, sobre todo en la estandarización de las mismas, varios factores importantes deben ser considerados: la fase móvil apropiada para conseguir la mejor separación de los componentes del extracto, la cual debe ser establecida con anterioridad (Horváth et al., 2010); el tiempo de contacto de la cromatoplaqa y el agar inoculado, ya que suele ser muy variable con los diferentes extractos, por lo que hay que realizar una serie de ensayos para minimizar este problema. También es importante considerar que en algunas ocasiones el contacto de la placa cromatográfica con el agar

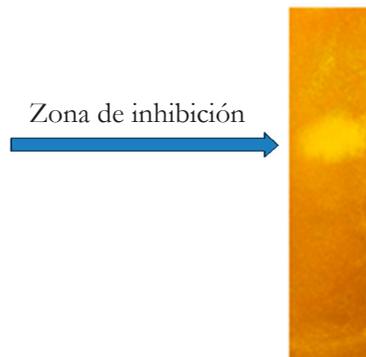


Figura 3. Zona de inhibición producida por un componente antimicrobiano en una bioautografía

no es completamente eficiente y en otras ocasiones la sílica de la cromatoplaca puede desprenderse del soporte y caer sobre la superficie del agar, además existe el problema ocasionado por la polaridad de los compuestos separados, ya que se debe considerar que entre menos polares sean estos compuestos, menor será su difusión (Dewanjee et al., 2015). Además, existen reportes que sugieren que al momento de separar los componentes de un extracto mediante CCF, puede ocasionar la interrupción de sinergismo entre los componentes activos del extracto reduciendo de este modo su actividad (Schmourlo et al., 2005).

Rios, Recio y Villar (1988) mencionan que en estas técnicas influyen diversos factores como la composición del medio de cultivo, el pH y la solubilidad del extracto en el medio de cultivo utilizado en la bioautografía, por lo que puede resultar difícil la estandarización de estos métodos debido a la diferencia existente entre los diversos extractos de plantas (Figura 4).

Basándonos en lo anterior se destaca la importancia de estandarizar las técnicas bioautográficas, ya que mucha de la literatura menciona que aunque presentan inconvenientes, son técnicas especialmente diseñadas para la detección selectiva de compuestos con actividad antimicrobiana (Nagy, Kocsis, Kőszegi & Botz, 2002).

Como parte de la estandarización de las técnicas bioautográficas, es de suma importancia considerar el inóculo del microorganismo de interés, y para esto la literatura señala que lo más recomendable es trabajar con  $1 \times 10^6$  UFC/mL en

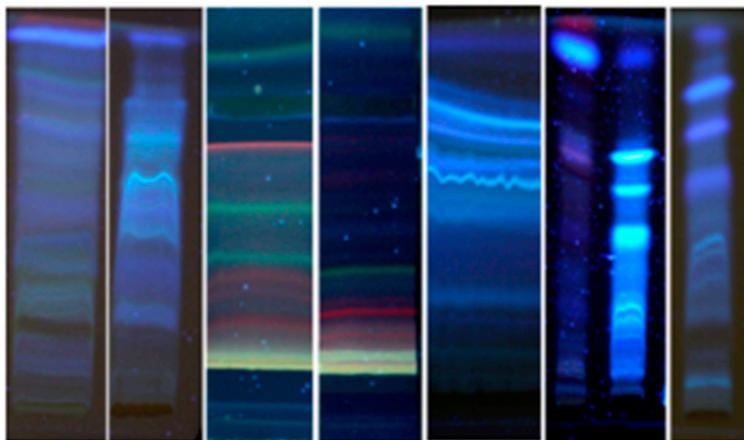


Figura 4. CCF de diferentes extractos de plantas observados con luz UV

el caso de bacterias y para el caso de hongos filamentosos  $1 \times 10^6$  conidias/mL (Schmourlo et al., 2005).

Para facilitar la observación de las zonas de inhibición es recomendable utilizar indicadores de actividad enzimática microbiana, por lo general se utilizan sales de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; MTT), estas sales detectan la actividad deshidrogenasa de microorganismos vivos, los cuales las transforman en un compuesto altamente coloreado llamado formazán, por lo que las zonas de inhibición incoloras, contrastan con el fondo purpura intenso (Silva et al., 2005). Otro colorante altamente utilizado es la resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), el cual detecta la viabilidad celular en respuesta a una reducción química del medio, dicha reducción provoca que el indicador que es de color azul intenso, cambie a su forma reducida, quedando un color rosa, observándose fácilmente las zonas de inhibición de color azul (Figura 5).

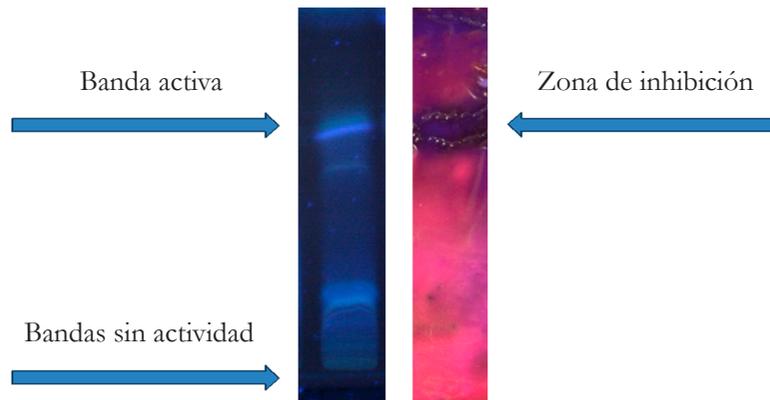


Figura 5. Bioautografía revelada con resazurina, mostrando las zona de inhibición

### 3.2.4. Cromatografía en columna

Los compuestos con actividad antimicrobiana detectados mediante estas técnicas bioautográficas, pueden ser obtenidos en cantidades suficientes para realizar evaluaciones espectroscópicas, con las cuales se podrá caracterizar el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana (Choma & Jesionek, 2015). Para esto, se puede utilizar la cromatografía en columna mediante la cual el extracto se separa obteniendo diferentes fracciones (Figura 6).

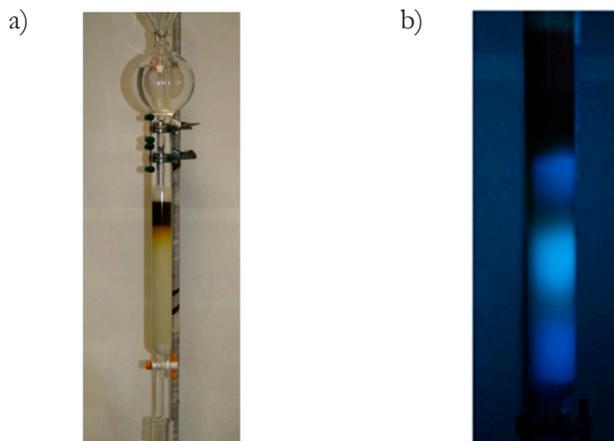


Figura 6. Separación de los compuestos por cromatografía en columna  
a) Observada al visible; b) Observada con luz UV

Posteriormente las fracciones obtenidas «semipuras» son separadas mediante la cromatografía en capa preparativa (2.5 mm de espesor), donde se coloca el extracto a lo largo de toda la base de la placa, para eluirlo con el sistema de solventes utilizados en la CCF, después del desarrollo de la cromatografía, las bandas del compuesto antimicrobiano son raspadas y lavadas con el solvente apropiado, posteriormente el solvente se evapora y el compuesto es colocado en viales ámbar para su posterior análisis (Figura 7) (Móricz, Fornal, Jesionek, Majer-Dziedzic & Choma, 2015), por métodos espectroscópicos (UV, IR, RMN, CG-EM) y la toxicidad de los compuestos activos.

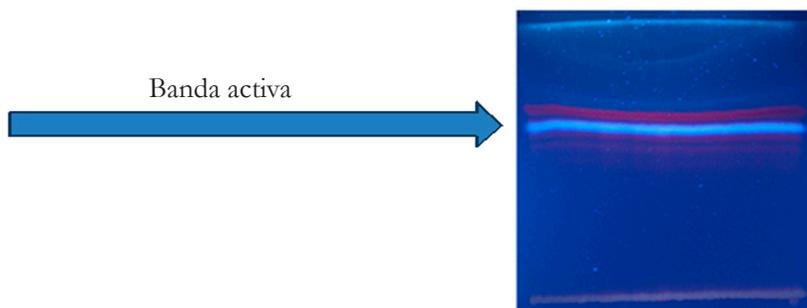


Figura 7. Cromatografía en capa preparativa de la fracción activa mostrando el compuesto con actividad antimicrobiana, seleccionado de acuerdo a la autobiografía

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Thymus vulgaris</i> <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Mentha spicata</i> <i>Cinnamomum</i> <i>Zeylanicum</i>	Bioautografía Directa	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Syringae</i> <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	(Horváth et al., 2010)
<i>Hypericum perforatum</i>	Aislamiento por cromatografía preparativa	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	(Jesionek et al., 2014)
<i>Chelidonium majus</i>	Bioautografía Directa Aislamiento cromatografía preparativa	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	(Móricz et al., 2015)
<i>Helichrysum italicum</i>	Concentración Mínima Inhibitoria	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	(Ramirez & Marin, 2009)
<i>Achyranthes aspera</i>	Difusión en agar	<i>B. subtilis</i>	(Narayan, Kartik, Manoj & Singh, 2010)
<i>Nymphaea nouchali</i>	Difusión en disco en agar Concentración Mínima Inhibitoria por método microdilución/ colorimétrico	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(Parimala & Shoba, 2014)
<i>Salvia indica</i>	Difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> ,	(Viswanad, Aleykutty, Jaykar, Zachariah & Thomas, 2011)
<i>Adansonia digitata</i> , <i>Hibiscus sabdarifa</i> , <i>Aframomum polyanthum</i> , <i>A. albobviolaceum</i> <i>Ocimum gratissimum</i>	Concentración Mínima Inhibitoria	<i>E. aerogenes</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Djeussi et al., 2013)

## Continuación

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Rhus coriaria</i> <i>Sacropoterium spinosum</i> <i>Rosa damascena</i>	Método de microdilución Concentración Mínima Inhibitoria	<i>P. aeruginosa</i>	(Adwan, Abu-Shanab & Adwan, 2010)
<i>Melissa officinalis</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Lauria nobilis</i> , <i>R. coriaria</i> , <i>Dianthus coryophyllum</i> , <i>Pippier nigrum</i> , <i>Capsicum annum</i>	Método en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	(Ertürk, 2006)
<i>Acacia arabica</i> , <i>Nymphaea lotus</i> <i>Sphareranthus hirtus</i> , <i>Emblica officinalis</i> , <i>Cinchorium intybus</i> <i>Cardua marianum</i>	Método en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(Hassan, Rahman, Deeba & Mahmud, 2009)
<i>Margaritaria discoidea</i> <i>Cajanus cajan</i> <i>Ziziphus abyssinica</i> <i>Combretum zeyheri</i> <i>P lectranthus barbatus</i>	Bioautografía por sobreposición en agar	<i>C. albicans</i>	(Runyoro et al., 2006)
<i>Ottonia martiana</i>	Técnica de difusión en papel filtro; Bioautografía con observación colorimétrica	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. aerogenes</i>	(Machado et al., 2012)
<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Magnolia officinalis</i> , <i>Rubus chingii</i> , <i>Terminalia chebula</i> <i>Rabdosia rubescens</i>	Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida Técnicas Espectrofotométricas	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>E. coli</i>	(Miyasaki et al., 2013)

Nombre científico	Técnica utilizada	Microorganismo	Referencia
<i>Xylopiya aethiopica</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida	<i>Trichophyton rubrum</i>	(Njimoh et al., 2015)
<i>Mitracarpus scaber</i>		<i>C. albicans</i>	
<i>Aframomum danielli</i>		<i>S. saprophyticus</i>	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>		<i>S. epidermidis</i>	
<i>Albizia lebecke</i>		<i>S. typhi</i>	
<i>Baillonella toxisperma</i>		<i>S. aureus</i>	
<i>Fagara leprieuri</i>		<i>K. pneumonia</i>	
		<i>E. coli</i>	
<i>Acacia farnesiana</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida Cromatografía en columna	<i>V. cholerae</i>	(Sanchez, Heredia, Camacho-Corona & Garcia, 2013)
<i>Azadirachta indica</i>	Técnica de difusión en pozo en agar Técnicas espectrofotométricas	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>Propionibacterium acnés</i>	(Nand, Drabu & Gupta, 2012)
<i>Lythrum salicaria</i>	Técnica de difusión en pozo en agar	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Guclu, Genc, Zengin & Karabay, 2014)

Tabla 1. Plantas con la actividad antimicrobiana evaluada por diferentes técnicas

### 3.3. Conclusión

La metodología para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas es muy variada y aporta información muy valiosa para la búsqueda preliminar de extractos o compuestos con propiedades antimicrobianas. Es importante tomar en cuenta los factores que pueden causar variaciones en los resultados, de ahí la importancia de la estandarización de los métodos y de las recomendaciones realizadas en métodos ya estandarizados. Las condiciones específicas utilizadas durante el desarrollo del método aseguran la reproducibilidad de los resultados, que son de suma importancia para evaluar la actividad antimicrobiana. Hay que

considerar algunos factores que son decisivos para obtener resultados reproducibles y exactos, desde el método de extracción, solventes utilizados, medios de cultivo, cantidad de inóculo, uso correcto de controles; esto nos permitirá descartar algunos errores sistemáticos durante la realización de las evaluaciones que pudieran arrojar falsos positivos o negativos.

## Referencias

- Adwan, G., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. (2010). Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(4), 266-269. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60064-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60064-8)
- Bakht, N., Humaira, F., Madiha, A., & Haq, I.U. (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol.*, 1(1), 1002.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. [http://doi.org/10.1016/S0305-4179\(78\)80006-0](http://doi.org/10.1016/S0305-4179(78)80006-0)
- Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., & Boyd, K.G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 27-32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00054-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00054-1)
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225-238. <http://doi.org/10.3390/chromatography2020225>
- Choma, I.M., & Grzelak, E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* «proof-of-concept». *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>

- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-82. [http://doi.org/0893-8512/99/\\$04.0010](http://doi.org/0893-8512/99/$04.0010)
- Cretu, G.C., & Morlock, G.E. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.038>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T.K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84. <http://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Djeussi, D.E., Noumedem, J.A., Seukep, J.A., Fankam, A.G., Voukeng, I.K., Tankeo, S.B. et al. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 164. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-164>
- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61(3), 275-278. <http://doi.org/10.2478/s11756-006-0050-8>
- Guclu, E., Genc, H., Zengin, M., & Karabay, O. (2014). Antibacterial Activity of *Lythrum salicaria* against Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Research & Review in Biology*, 4(7), 1099-1105. <http://dx.doi.org/10.9734/ARRB/2014/7357>
- Hassan, A., Rahman, S., Deeba, F., & Mahmud, S. (2009). Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(1), 20-23.
- Horváth, G., Jám bor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovichs, É., Héthelyi, É. et al. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and fragrance journal*, 25(3), 178-182. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1993>
- Jesionek, W., Choma, I.M., Majer-Dziedzic, B., & Malinowska, I. (2014). Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(20), 2882-2891. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2014.907103>

- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Lee, K.-M., Kim, W.-S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.-W. et al. (2009). Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of food protection*, 72(2), 325-331.
- Machado, M., Garcia, C., De, C.P., Cristina, L., Dallarmi, M., Sanquetta, O.G., & Roberto, C. (2012). Bioautography to assess antibacterial activity of *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) on the human oral microbiota. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(4), 515-519.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>
- Miyasaki, Y., Rabenstein, J.D., Rhea, J., Crouch, M.-L., Mocek, U.M., Kittell, P.E. et al. (2013). Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 8(4), e61594. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061594>
- Móricz, Á.M., Fornal, E., Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I.M. (2015). Effect-directed isolation and identification of antibacterial *Chelidonium majus* L. alkaloids. *Chromatographia*, 78(9-10), 707-716. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-015-2870-6>
- Nagy, S., Kocsis, B., Kószegi, T., & Botz, L. (2002). Optimization of conditions for culture of the test bacteria used for direct bioautographic detection. 1. The gram-positive test bacterium *Bacillus subtilis*. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 15(2), 132-137. <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.15.2002.2.9>
- Nand, P., Drabu, S., & Gupta, R.K. (2012). Insignificant anti-acne activity of *Azadirachta indica* leaves and bark. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 3(1), 29-33. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-9234.99650>

- Narayan, G.R., Kartik, V., Manoj, P., & Singh, P.S. (2010). Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine. *IJRAP*, 1(2), 529-535.
- Ncube, N.S., Afolayan, A.J., & Okoh, A.I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb07.613>
- Negróni, M. (2000). *Microbiología estomatológica*. Ed. Médica Panamericana.
- Njimoh, D.L., Assob, J.C. N., Mokake, S.E., Nyhalah, D.J., Yinda, C.K., & Sandjon, B. (2015). Antimicrobial Activities of a Plethora of Medicinal Plant Extracts and Hydrolates against Human Pathogens and Their Potential to Reverse Antibiotic Resistance. *International journal of microbiology*, 2015, 547156. <http://doi.org/10.1155/2015/547156>
- Palomino, J., Martín, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720-2722. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720>
- Parimala, M., & Shoba, F.G. (2014). *In vitro* antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. f. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 361. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-361>
- Queiroz, E.F., Wolfender, J.-L., Atindehou, K.K., Traore, D., & Hostettmann, K. (2002). On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. *Journal of Chromatography A*, 974(1), 123-134. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01224-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01224-4)
- Ramírez, L., & Marin, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.

- Rios, J.L., Recio, M.C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3)
- Runyoro, D.K.B., Matee, M.I.N., Ngassapa, O.D., Joseph, C.C., & Mbwambo, Z.H. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 11. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-6-11>
- Sanchez, E., Heredia, N., Camacho-Corona, M.D.R., & Garcia, S. (2013). Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(6), 1307-1316. <http://doi.org/10.1111/jam.12328>
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., & Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 563-568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007>
- Silva, M.T.G., Simas, S.M., Batista, T.G.F.M., Cardarelli, P., & Tomassini, T.C.B. (2005). Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología Médica*, (Cim), 663-672.
- Viswanad, V., Aleykutty, N.A., Jaykar, B., Zachariah, S.M., & Thomas, L. (2011). Studies on antimicrobial and antioxidant activity of methanolic extract of *Saundersia indica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 11, 59-64.

## ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

---

**David Gilberto García-Hernández,  
Catalina Rivas-Morales, Catalina Leos-Rivas**

Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[david.garciahn@uanl.edu.mx](mailto:david.garciahn@uanl.edu.mx), [catalina.rivasmr@uanl.edu.mx](mailto:catalina.rivasmr@uanl.edu.mx),  
[catalina.leosrs@uanl.edu.mx](mailto:catalina.leosrs@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.314>

García-Hernández, D.G., Rivas-Morales, C., & Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antifúngica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 101-128.

## Resumen

Los hongos constituyen un numeroso grupo de organismos, diverso y variado, que incluye a los mohos, las setas y las levaduras. Un extenso número de hongos son parásitos de plantas, causando enfermedades con relevancia económica en plantíos cultivados. Algunos son responsables de enfermedades en animales, incluyendo al hombre. Todos los hongos son microorganismos eucariontes y cada célula fúngica posee al menos un núcleo y membrana nuclear, retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato secretor. La mayoría son aeróbicos obligados o facultativos. Las infecciones producidas por hongos son las micosis; la mayor parte de los hongos patógenos son exógenos; las de mayor incidencia son conocidas como candidiasis y dermatofitosis, son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están muy adaptados para sobrevivir en el huésped humano. Estas enfermedades pueden clasificarse: por conveniencia, superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas. La medicina tradicional como alternativa de salud nos ha brindado una cobertura muy amplia en el tratamiento de diversas enfermedades y más aún en el desarrollo de nuevas fuentes de fármacos, sin embargo, sus aplicaciones en el campo de la industria nos han permitido el desarrollo de nuevos productos. La diversidad química de los productos naturales es complementaria a la diversidad encontrada en las bibliotecas sintéticas. Sin embargo, los productos naturales son estéricamente más complejos y poseen una diversidad de sistemas de anillos mayores debido al largo proceso evolutivo de la selección natural. Por lo tanto, las estrategias para explotar las fuentes naturales y el desarrollo de metodologías para tener bibliotecas que faciliten la síntesis de productos naturales. Algunos de los grupos funcionales con actividad biológica son: compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos, cumarinas, entre otros. Para determinar la actividad biológica sobre hongos se siguen protocolos estandarizados por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) disponibles en las principales bases de datos científicas.

## Palabras clave

Antifúngica, Plantas Medicinales, Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida.

## 4.1. Introducción

Los hongos constituyen un gran grupo de organismos, diverso y muy extendido, que incluye a los mohos, las setas y las levaduras. Se han descrito aproximadamente 100 000 especies de hongos y se estima que podrían existir hasta 1.5 millones de especies. Se agrupan filogenéticamente separados de otros organismos, estando más íntimamente relacionados con los animales. Un gran número de hongos son parásitos de plantas, causando enfermedades con relevancia económica en plantíos cultivados. Algunos causan enfermedades en animales, incluyendo al hombre. Los hongos también pueden establecer asociaciones simbióticas con muchas plantas, participan también en la síntesis de antibióticos y procesos fermentativos con alta importancia económica para el hombre (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009).

Todos los hongos son microorganismos eucariontes y cada célula fúngica posee al menos un núcleo y membrana nuclear, retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato secretor. La mayoría son aeróbicos obligados o facultativos. Las infecciones producidas por hongos son las micosis; la mayor parte de los hongos patógenos son exógenos; las de mayor incidencia son conocidas como candidiasis y dermatofitosis, son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están muy adaptados para sobrevivir en el huésped humano. Estas enfermedades (Tabla 1) pueden clasificarse por conveniencia: superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas (Brooks, Butler & Morse, 2005).

Una complicación que se presenta en el tratamiento de las micosis es la resistencia a los antibióticos, esta se define como la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente (Madigan et al., 2009). Ésta es causada por mutaciones en el cromosoma bacteriano, plásmidos o transposones que pueden transferir determinada resistencia a diversas especies de microorganismos más rápido que los nuevos fármacos que se desarrollan para combatirlos (Kimpe, Decostere, Martel, Devriese & Haesebrouck, 2003; Salipante, Barlow & Hall, 2003; Shahid, Malik & Sheeba, 2003). Ésta constituye un problema serio de salud pública en el mundo el cual se ha agudizado durante los últimos años, especialmente en los países subdesarrollados donde su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de cepas multiresistentes a éstos.

Tipo de micosis	Agentes causantes	Micosis
Superficial	Especies de <i>Malassezia</i> <i>Hortaea werneckii</i> Especies de <i>Trichosporon</i> <i>Piedraia hortae</i>	Pitiriasis versicolor Tiña negra Piedra blanca Piedra negra
Cutánea	Especies de <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i>	Dermatofitosis  Candidiasis de piel, mucosa o uñas.
Subcutánea	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> y otros <i>Pseudallescheria boydi</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> y otros <i>Exophiala</i> , <i>bipolar</i> , <i>exserohilum</i> y otros	Esporotricosis Cromoblastomicosis  Micetoma  Faohifomicosis
Endémica (primaria, sistémica)	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Coccidioidomicosis Histoplasmosis Blastomicosis Paracoccidioidomicosis
Oportunista	<i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> y otras especies de <i>Aspergillus</i> Especies de <i>Rhizopus</i> , <i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> y otros zigomicetos <i>Penicillium marneffeii</i>	Candidiasis sistémica Criptococosis Aspergilosis  Mucormicosis (zigomicosis) Peniciliosis

Tabla 1. Principales micosis y hongos causantes en el hombre (Brooks et al., 2005)

Numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello, se han empleado técnicas *in vitro* dada la

sencillez y la reproducibilidad de las mismas (Hernández Díaz & Rodríguez Jorge, 2001).

La medicina tradicional como alternativa de salud nos ha brindado una cobertura muy amplia en el tratamiento de diversas enfermedades y más aún en el desarrollo de nuevas fuentes de fármacos, sin embargo sus aplicaciones en el campo de la industria nos han permitido el desarrollo de nuevos productos.

Según la OMS la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (WHO, 2016).

Podemos asumir que el trabajo en la investigación en la Química de Productos Naturales que se realiza en muchos lugares del mundo será precisamente el de evaluar, aislar del extracto de la planta a través de diferentes tipos de obtención, moléculas biológicamente activas. Con éstos estudios se beneficia no sólo el campo de la medicina, ya que «las plantas» acumulan sustancias o metabolitos secundarios que pueden ser extraídas y utilizadas en aplicaciones científicas, tecnológicas y comerciales, especialmente aquellos compuestos con actividad farmacológica considerados de importancia biológica e industrial (Hernández-Morales et al., 2004).

## 4.2. Actividad biológica

(Arif et al., 2009; Domingo & López-Brea, 2003)

Las plantas medicinales han sido fuente de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos por muchos siglos y se ha utilizado sea como material crudo (extractos, infusiones, tinturas, entre otras) o como compuestos puros para el tratamiento de enfermedades. Relativamente del 1-10% de las plantas son usadas por los humanos, se estiman que existen entre 250 000- 500 000 especies de ellas en la tierra. La diversidad química de los productos naturales es complementaria a la diversidad encontrada en las bibliotecas sintéticas. Sin embargo, los productos naturales son estéricamente más complejos y poseen una diversidad de sistemas de anillos mayores debido al largo proceso evolutivo de la selección

natural. Por lo tanto, las estrategias son importantes para explotar las fuentes naturales y el desarrollo de metodologías para tener bibliotecas que faciliten la síntesis de productos naturales. La medicina convencional está siendo cada vez más receptiva hacia el uso de antimicrobianos y otros fármacos derivados de las plantas, por ejemplo: Taxol, Vincristina, Vinblastina, entre otros, ya que los fármacos tradicionales son inefectivos. Un número de compuestos aislados de las plantas como la dimetil pirrola, hidroxidihidrocornin-agliconas, derivados de índoles, entre otros, han sido reportados con actividad antifúngica.

### **4.3. Plantas con actividad antifúngica**

La medicina tradicional ofrece una alternativa ya sea oral o escrita, para beneficiar la calidad de vida de la humanidad a través del uso de las plantas. En años recientes se ha incrementado el interés científico en el aislamiento, purificación e identificación de nuevas moléculas que posean actividad biológica relevante, en la Tabla 2 se presenta una revisión de plantas desde 1999 a la fecha, las cuales asumen la validación científica de que poseen actividad antifúngica para microorganismos patógenos para el hombre como para las plantas.

### **4.4. Determinación de la actividad antifúngica**

#### **4.4.1. Método para dermatofitos**

Para el estudio *in vitro* de dermatofitos se debe tener en cuenta que estos microorganismos tienen un lento crecimiento y los métodos de propagación para los hongos filamentosos se deben de modificar según cada microorganismo; el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés), recomienda utilizar medio de cultivo sólido (Pakshir, Bahaedinie, Rezaei, Sodaifi & Zomorodian, 2009; Rex et al., 2001) para la propagación y el ensayo de fármacos potenciales.

Se prepara el inóculo de la cepa a evaluar por picadura en medio Lactrimel, se incuba por 7-15 d. a 25 °C para la formación de micro y macroconidias. Se cosechan las conidias en tubo cónico estéril con agua destilada estéril; se cuentan las conidias en un hematocitómetro y se ajusta la densidad a  $1 \times 10^6$  conidias/mL. Se inoculan placas de medio sólido Mueller-Hinton con ayuda de un hisopo, se

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Anchusa strigosa</i> , <i>Asphodelus microcarpus</i> , <i>A. luteus</i> , <i>A. arvensis</i> , <i>Capparis spinosa</i> , <i>Clematis cirrhosa</i> , <i>E. creticum</i> , <i>Inula viscosa</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Lycium europaeum</i> , <i>Micromeria nervosa</i> , <i>Parietaria diffusa</i> , <i>Paronchya argentea</i> , <i>Phagnalon rupestre</i> , <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Plumbago europaea</i> , <i>Ruscus aculeatus</i> , <i>Ruta calapensis</i> , <i>Retema reatam</i> , <i>Solanum nigrum</i> , <i>Salvia fruticosa</i> , <i>Ziziphus spina-christi</i>	<i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. violaceum</i>	(Ali-Shtayeh & Ghdeib, 1999)
<i>Laurus nobilis</i> , <i>allium neapolitanum</i> , <i>Nicotiana rustica</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i>	(Digrak, Alma & İlçim, 2001)
<i>Ocimum basilicum</i> , <i>O. tenuiflorum</i> , <i>Cymbopogon citratus</i>	<i>C. albicans</i> , <i>T. mentagrophytes</i>	(Hernández Díaz & Rodríguez Jorge, 2001)
<i>Portulaca quadrifida</i> , <i>Agerantum conyzoides</i> , <i>Nembouldia laevis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>	(Hoffman et al., 2004)
<i>Antidesma madagascariense</i>	<i>Aspergillus niger</i>	(Mahomoodally, Gurib-fakim, & Subratty, 2005)
<i>Vitex negundo</i> , <i>Zanthoylum alatum</i> , <i>Ipomea carnea</i> , <i>Thuja orientalis</i> , <i>Cinnamomum camphora</i>	<i>A. alternata</i> , <i>C. lunata</i>	(Guleria & Kumar, 2006)
<i>Ambrosia confertiflora</i> , <i>A. indica</i> , <i>Baccharis glutinosa</i> , <i>Larrea tridentata</i>	<i>F. verticillioides</i>	(Suárez-Jiménez et al., 2007)
<i>Cestrum nocturnum</i> , <i>Annona cherimola</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>C. aurantifolia</i> , <i>Bougainvillea spectabilis</i> , <i>Justicia spicigera</i> , <i>Petroselinum sativum</i> , <i>Parthenium hysterophorus</i> , <i>Schinus molle</i> , <i>Ricinus communis</i> , <i>Cartica papaya</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	(Hernández-Albíter, Barrera-Necha, Bautista-Baños & Bravo-Luna, 2007)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Syzygium jambolanum</i> , <i>Cassia siamea</i> , <i>Odina wodier</i> , <i>Momordia charantia</i> , <i>Melia azedarach</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. kerusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i>	(Prabhakar et al., 2008)
<i>Aspalathus linearis</i> , <i>Cyclopia genistoides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	(Coetzee et al., 2008)
<i>Anthemis arvensis</i> subsp <i>arvensis</i> , <i>A. cotula</i> , <i>Cyborium intybus</i> , <i>Jasonia glutinosa</i> , <i>Santonila</i> <i>chamaecyparissus</i> subsp <i>squarrosa</i> , <i>Tussilago farfara</i> , <i>Achillea millefolium</i> subs <i>millefolium</i> , <i>Tanacetum parthenium</i> , <i>Anagallis arvensis</i> , <i>A. foemina</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i>	(López et al., 2008)
<i>Piper betel</i>	<i>C. tropicalis</i>	(Nair & Chanda, 2008)
<i>Capparis erythocarpos</i> , <i>Cussonia arborea</i> , <i>Dracaena steudneri</i> , <i>Lannea schimperi</i> , <i>Rauwolfia vomitoria</i> , <i>Rumex</i> <i>usambarensis</i> , <i>Sapium ellipticum</i> , <i>Zehneria scabra</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus niger</i>	(Kisangau et al., 2009)
<i>Azima tetracantha</i> , <i>Baubinia tomentosa</i> , <i>Biophytum sensitivum</i> , <i>Diospyros ebenum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. simii</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Magnethophora</i> sp.	(Duraipandiyan, Muthu, & Ignacimuthu, 2009)
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	<i>A. solani</i> , <i>Botryodiplodia</i> <i>theobromae</i> , <i>C. gloesporioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Cucumericum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. Sp. <i>Lycopersici</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Niverum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Leptoshaeria</i> <i>maculans</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>R. cerealis</i> , <i>R. solani</i>	(Gong et al., 2009)

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Magnolia obovata</i>	<i>M. grisea</i> , <i>R. solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Puccinia recondita</i> , <i>Erysiphe graminis</i> f. <i>sp. hordei</i> , <i>C. coccodes</i>	(Choi et al., 2009)
<i>Laserpitium garganicum</i> subsp <i>garganicum</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>C. globosum</i> , <i>P. chrisogenum</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>T. viride</i>	(Tirillini et al., 2009)
<i>Tectona grandis</i> , <i>Semecarpus anacardium</i> , <i>Holoptelea integrifolia</i> , <i>Pithecellobium dulce</i> , <i>Strychnos nux-vomica</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus spinulose</i> , <i>A. niger</i>	(Singh et al., 2010)
<i>Magnifera indica</i> , <i>Prosopis chilensis</i> , <i>Cedrella toona</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>C. albicans</i>	(Singh et al., 2010)
<i>Satureja khuzestanica</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Mucor sp.</i>	(Batool Sadeghi-Nejad, Shiravi, Ghanbari, Alinejadi, & Zarrin, 2010)
<i>Illicium verum</i>	<i>A. solani</i> , <i>B. maydis</i> , <i>B. theobromae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cucumerinum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lycopersici</i> , <i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. vasinfectum</i> , <i>M. oryzae</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>R. cerealis</i> , <i>R. solani</i>	(Huang et al., 2010)
<i>Metasequoia ghyptostroboides</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>C. capsici</i> , <i>F. solani</i> , <i>P. capsici</i>	(Bajpai & Kang, 2010)
<i>Pogostemon parviflorus</i>	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>	(B Sadeghi-Nejad & Deokule, 2010)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Allium sativum</i> , <i>Zingiber officinalis</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Azadirachta indica</i> , <i>Withania somnifera</i> , <i>Acorus calamus</i> , <i>Piper betel</i> , <i>Adhatoda vasica</i> , <i>Solanum</i> <i>xanthocarpum</i> , <i>A. vera</i> , <i>O. sanctum</i>	<i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>F. sp. ciceri</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>Dreschlera</i> <i>oryzae</i> , <i>A. tenuis</i> , <i>F. solani</i> , <i>C. coccoodes</i>	(Meena et al., 2010)
<i>Acacia karroo</i> , <i>Trichilia emetica</i> , <i>Cassia</i> <i>abbreviata</i> , <i>Plumbago auriculata</i> , <i>Pittosporum tobira</i> , <i>Schefflera actinophylla</i> , <i>C. ambrosioides</i> , <i>Anacardium occidentale</i> , <i>Litogyne gariepona</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	(Kolaczowski et al., 2010)
<i>Zea mays</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Salvia</i> <i>sclarea</i> , <i>Lippia alba</i>	<i>Alternaria sp</i>	(Dellavalle et al., 2011)
<i>Clerodendrum inerme</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	(Velmurugan et al., 2011)
<i>Andrographis paniculata</i>	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>Mycrosporium canis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>A. niger</i>	(Sule et al., 2012)
<i>Achillea biebersteinii</i> , <i>Anthemis</i> <i>pseudocotula</i> , <i>A. tinctoria</i> var <i>tinctoria</i> , <i>Artemisia austriaca</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Hedera helix</i> , <i>Lantana</i> <i>camara</i> , <i>Nepeta italica</i> , <i>Ononis spinosa</i> , <i>Paliurus spina-christi</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>P. major</i> , <i>Primula vulgaris</i> , <i>Rosa canina</i> , <i>Rubus sanctus</i> , <i>Salvia fruticosa</i> , <i>S.</i> <i>verticillata</i> , <i>Teucrium polium</i> , <i>Urtica dioica</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. gypseum</i>	(Orhan, Özçelik, Hoşbaş & Vural, 2012)
<i>Arctotis arctotooides</i> , <i>Gasteria bicolor</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>T. mucoides</i> , <i>M. canis</i>	(Otang, Grierson & Ndip, 2012)

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Acanthus licifolius</i>	<i>A. fumigatus</i>	(Kalaskar, Karande, Bannalika & Gatne, 2012)
<i>Anvillea radiata</i> , <i>Halimium umbellatum</i> , <i>Ceratonia siliqua</i> , <i>Cistus villosus</i> , <i>Pistacia atlantica</i> , <i>Rubus ulmifolius</i> , <i>H. antiatlanticum</i> , <i>I. viscosa</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	(Talibi et al., 2012)
<i>Bellevalia gracilis</i> , <i>Muscari aucheri</i> , <i>Tulipa armena var hycica</i>	<i>Coryorlus versicolor</i>	(Yildirim, Paksoy, Yuce & Yildirim, 2013)
<i>Croton pullei</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	(Peixoto et al., 2013)
<i>Arctium lappa</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Xanthium strumarium</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Acremonium chrysogenum</i>	(Butu, Dobre, Rodino, Butu & Lupuleasa, 2013)
<i>Nepeta Meyeri</i>	<i>Aspergillus solani</i> , <i>Fusarium verticilloides</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. chlamydsporium</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. scirpi</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phoma sp.</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. sp.</i> , <i>S. rolfsii</i>	(Kordali, Usanmaz, Cakir, Cavusoglu & Ercisli, 2013)
<i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Citrus limon</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>P. digitatum</i>	(Vitoratos, Bilalis, Karkanis & Efthimiadou, 2013)
<i>Eugenia uniflora</i>	<i>Paracoccidioides</i>	(Zambuzzi-Carvalho et al., 2013)
<i>Plinia cauliflora</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. kerusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	(Souza-Moreira et al., 2013)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Inula viscosa</i> , <i>Asteriscus graveolens</i> , <i>Bubonium odorum</i> , <i>Thymus leptobotrys</i> , <i>A. radiata</i> , <i>Hammada scoparia</i> , <i>Ighermia pinifolia</i> , <i>H. umbellatum</i>	<i>Penicillium italicum</i>	(Askarne et al., 2013)
<i>Firmania simplex</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	(Ajaib, Wahla, & Khan, 2014)
<i>Acalypha gaumeri</i> , <i>Bonellia flammea</i> , <i>Calea urticifolia</i>	<i>Alternaria chrysanthemi</i>	(Vargas-Días, Gamboa-Angulo, Medina-Baizabal, & Pérez-Brito, 2014)
<i>Azadirachta indica</i> , <i>Datura alba</i> , <i>Eucalyptus sp.</i> , <i>Melia azedarach</i>	<i>A. alternata</i>	(Anwar et al., 2014)
<i>Hypericum barvae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. laurentii</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	(Dulger & Dulger, 2014)
<i>Phyllanthus emblica</i> <i>Aegle marmelos</i> , <i>Ricinus communis</i> , <i>Lansonia inermis</i> , <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> , <i>Trigonella foenum-graecum</i> , <i>A. indica</i> , <i>Sapindus mukorossi</i> , <i>Acacia concinna</i> , <i>Murraya koenigii</i>	<i>Malassezia furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. sympodialis</i>	(Sibi, Alam, Shah, & Razak, 2014)
<i>Boswellia papyrifera</i> , <i>Acacia nubica</i> , <i>Nigella sativa</i>	<i>Madurella mycetomatis</i>	(Elfadil, Fahal, Kloezen, Ahmed, & van de Sande, 2015)
<i>Terminalia chebula</i> , <i>T. arjuna</i> , <i>Persea americana</i> , <i>T. tomentosa</i> , <i>S. jambos</i> , <i>Terminalia catappa</i> , <i>Polyalthia longifolia</i> , <i>Psorelea corylifolia</i>	<i>C. albicans</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>	(Sakander, Akhilesh, & Koteswara, 2015)

Nombre de la planta	Microorganismos	Referencia
<i>Piper betel</i>	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>C. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> , <i>Sphaeloma ampelinum</i>	(Singburaudom, 2015)
<i>Ocimum sanctum</i> , <i>Calotrips procera</i> , <i>Astragalous tribuloide</i>	<i>Macrophamina phaseolina</i>	(Gupta, Chakraborty, & Mittal, 2015)
<i>Andrographis paniculata</i> , <i>Butea</i> <i>monospera</i> , <i>Callistemon lanceolatus</i> , <i>Canthium</i> <i>parvolorum</i> , <i>Cissus quadrangularis</i> , <i>Cordia dichrotoma</i> , <i>Ficus religiosa</i> , <i>Vitex negundo</i> , <i>Moringa oleifera</i> , <i>Sphaeranthus indicus</i> , <i>Streblus asper</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Fusarium crookwellense</i> , <i>F.</i> <i>sporotrichioides</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>	(Kavitha & Satish, 2016)

Tabla 2. Compendio de plantas con actividad antifúngica

espera a que se seque la superficie del medio, se adicionan 10  $\mu$ L del agente a evaluar sobre un disco de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro; una vez seco el disco, con ayuda de pinzas se coloca sobre la superficie del agar, se incuba bajo las condiciones antes mencionadas. Al concluir el período de incubación se observa la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco y se mide su diámetro. (Figura 1).



Figura 1. Método de difusión en placa con disco, halos de inhibición y resistencia de diferentes fármacos vs *T. rubrum* (Pakshir et al., 2009)

#### 4.4.2. Método para levaduras

Se sigue la metodología del documento M27-A2 de la CLSI (NCCLS, 2002), para la preparación del inóculo se realiza un subcultivo en agar dextrosa Sabouraud o agar papa dextrosa, se incuba a una temperatura 35°C, por un período de tiempo dependiendo del microorganismo a prueba. Posteriormente se prepara una suspensión en solución salina 0.85% o agua estéril con  $0.5-2.5 \times 10^2$  UFC/mL. Se preparan placas con medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico (MOPS) 0.165 M a pH  $7.0 \pm 0.1$ ; los agentes antimicrobianos a evaluar, se preparan a diferentes concentraciones y se agregan 0.1 mL de estas soluciones en medio a tubos de ensayo estériles; después se agregan 0.9 mL de la solución de dilución, se incuba bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Para la interpretación de los resultados se observa la turbidez de los tubos contrastándolos con los controles.

#### 4.4.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) para dermatofitos

Para la determinación de la CMI se sigue el método de microdilución establecido por la LCSM M38-A para hongos filamentosos. Se prepara un inóculo de conidias a una densidad óptica de 0.08-0.1 UA, se realiza la lectura en un espectrofotómetro a 625 nm, de esta solución se toma una alícuota y se hace una dilución 1:50 en medio RPMI-1640, por otra parte se preparan una serie de diluciones del

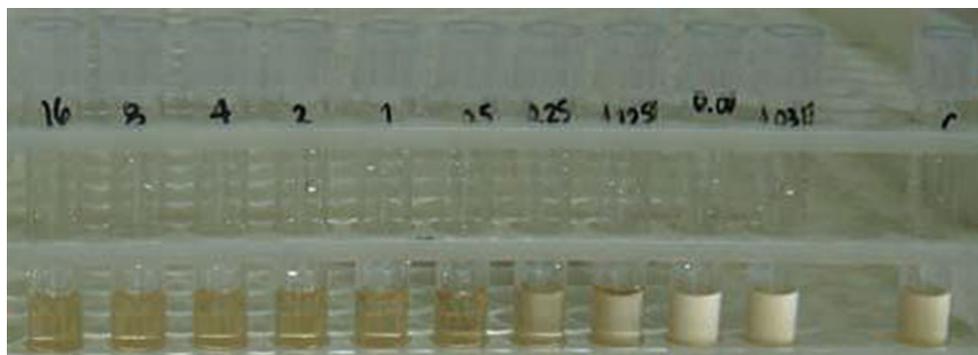


Figura 2. Concentración mínima inhibitoria de anfotericina B vs un aislado clínico de *C. parapsilosis*. CMI = 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Bonifaz, 2012)

fármaco a evaluar. En una placa de 96 pocillos se colocan 100  $\mu\text{L}$  de la solución diluida de conidias más 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de los fármacos y controles. Posteriormente se incuban a las mismas condiciones antes mencionadas por 7 d. Al término de éste se observan los pocillos para verificar el crecimiento de los microorganismos, la CMI es la última concentración donde hay inhibición del crecimiento; de éstos pocillos se toma una asada y se inocula en medio sólido Mueller-Hinton y se incuba bajo las mismas condiciones por 7 d; la CMF corresponde a la concentración donde no hay crecimiento.

#### **4.4.4. Principales grupos funcionales con actividad antifúngica**

Las plantas cuentan con la habilidad de sintetizar sustancias aromáticas de diferentes grupos funcionales, la mayoría de los cuales son fenoles o sus derivados oxigenados. Los metabolitos secundarios son utilizados como mecanismos de defensa de las plantas contra depredadores: microorganismos, insectos y herbívoros. Algunas plantas de las que se explotan su esencia (terpenoides), pigmentos (quinonas y taninos), su sabor (terpenoide capseisina del pimentón dulce) en donde se han encontrado que poseen propiedades medicinales. Algunas de las hierbas y especias que se utilizan para dar sazón a los alimentos también contienen compuestos con usos medicinales (Arif et al., 2009).

##### **4.4.4.1. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos aislados de fuentes naturales han sido reportados con actividad antifúngica. Se ha visto que los sitios y el número de grupos hidroxilos en el grupo fenólico está íntimamente relacionado con la toxicidad hacia los microorganismos, es decir a mayor número de grupos hidroxilos, mayor la toxicidad (Figura 3). Los mecanismos responsables de esta acción incluyen la inhibición enzimática por oxidación de compuestos, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfidrilos o a través de otras interacciones no específicas con proteínas.

Otros estudios en mecanismos de acción de compuestos diterpénicos y fenólicos aislados de especies de *Euphorbia* muestran que estos compuestos modulan a diferente grado la resistencia de fármacos de tipo azol regulados por Pdr5, Snq2p y Cdr1p.

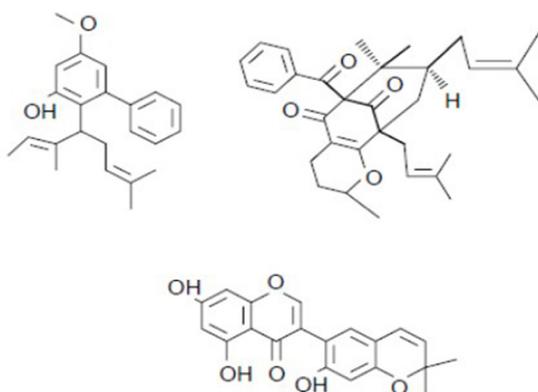


Figura 3. Estructura de algunos compuestos fenólicos

#### 4.4.4.2. Flavonoides

Las Flavonas (Figura 4) son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y la adición de un grupo hidroxilo en el carbono número 3 lo hace un flavonol. Algunos ejemplos de este grupo son: la amentoflavona, extraída de *Selaginella tamariscina* la cual tiene actividad antifúngica ( $IC_{50} = 18.3$  mg/mL) contra cepas patógenas de hongos y un bajo efecto hemolítico en eritrocitos humanos. *Inula viscosa* es comúnmente utilizada en la medicina tradicional por sus efectos terapéuticos. Compuestos como flavonoides, azulenos, sesquiterpenos y aceites esenciales de ésta mostraron una actividad antifúngica significativa en contra de especies de dermatofitos en concentraciones bajas (10 mg/mL). La actividad antifúngica es mayor en los compuestos cuya

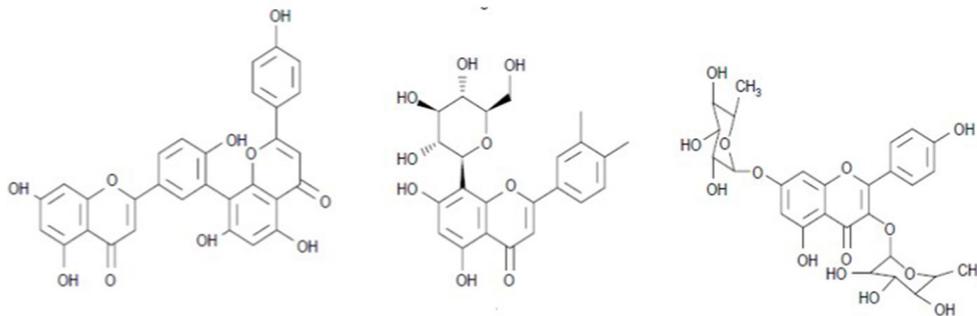


Figura 4. Variedad estructural de flavonoides

molécula está completamente metilada, como es el caso de la tangeretina de los cítricos, y disminuye dramáticamente cuando se remueve el grupo metilo de la posición 5. Los flavonoides inhiben una numerosa variedad de enzimas entre las que se encuentran: hidrolasas:  $\beta$ -glucoronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, aril-sulfatasa, ATPasa  $H^+$  de las membranas lisosomal y granular. Liasas: DOPA decarboxilasa. Transferasas: catecol o metiltransferasa. Hidroxilasas: aril hidroxilasa. Oxidoreductasas: aldosa reductasa. Quinonas: hexoquinasas.

#### 4.4.4.3. *Cumarinas*

Las cumarinas han sido reportadas que estimulan a los macrófagos, los cuales tienen un efecto negativo indirecto en las infecciones. Estas son sustancias fenólicas compuestas de anillos de benceno y  $\alpha$ -pirano (Figura 5). Su fama ha venido creciendo ya que se conocen algunas actividades biológicas como antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora.

El mecanismo de acción de la cumarinas se debe a su actividad fotosensibilizante sobre las células, la cual se manifiesta como fototoxicidad que altera y desorganiza numerosos procesos biológicos en diferentes tipos de células. Podemos explicar su actividad debido a la reactividad del estado triplete en las furanocumarinas

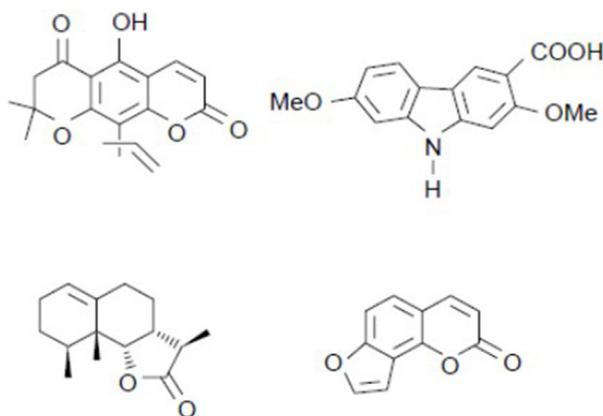


Figura 5. Diversidad estructural de cumarinas

que se genera cuando éstas interactúan con la radiación UV, y cuyas posibles reacciones se pueden agrupar en dos categorías:

- Los fotoenlaces directos con macromoléculas como el ADN, el ARN y las proteínas.
- Las fotomodificaciones indirectas a los sustratos biológicos a través de formas reactivas del oxígeno.

#### 4.4.4.4. *Quinonas*

Las quinonas (Figura 6) están compuestas por anillos aromáticos disustituídos con el grupo cetona y altamente reactivos. Pueden cambiar entre sus formas difenol y diacetona fácilmente a través de reacciones de óxido-reducción. Éstos compuestos, siendo de color, son responsables de la reacción de oscurecimiento en las frutas y vegetales cortados o dañados. Además de proporcionar una fuente de radicales libres estables, las quinonas son conocidas por formar complejos irreversibles con aminoácidos nucleófilos en proteínas. Por lo tanto, las quinonas inactivan la proteína y entorpece su función. Las quinonas se unen con adhesinas superficiales expuestas, polipéptidos de la pared celular, enzimas unidos a la membrana y forma complejos que inactivan las enzimas.

#### 4.4.4.5. *Xantonas*

Las Xantonas son un grupo restringido de polifenoles de plantas, biosintéticamente relacionados con los flavonoides. Son moléculas planares de seis carbonos en sistemas de anillos conjugados de la cadena principal y varios grupos químicos unidos a

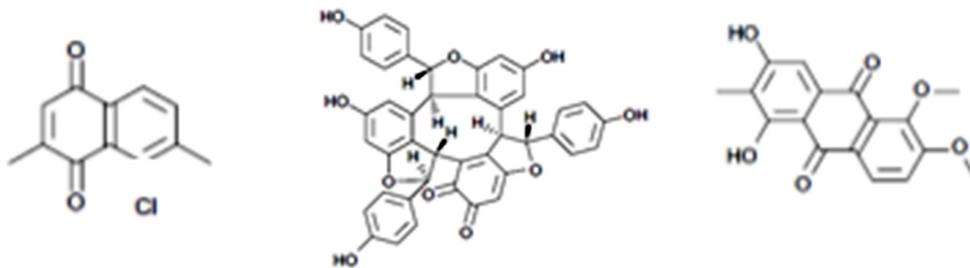


Figura 6. Algunos ejemplos de quinonas

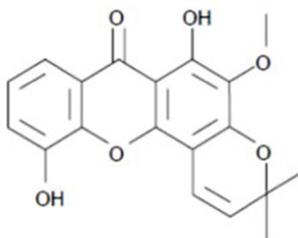


Figura 7. Estructura de caledonixantona

ella. La cadena principal de las Xantonas consiste en dos anillos de benceno unidos a través de un grupo carbonilo y un oxígeno que no permite la libre rotación entre los enlaces C-C. La cadena principal, la posición y tipo de los grupos químicos que posee, define las propiedades específicas de estas moléculas. Poseen actividad biológica variada, incluyendo la actividad antifúngica. Por ejemplo la Caledonixantona aislada de la corteza de *Calophyllum caledonicum*. (Figura 7).

#### 4.4.4.6. Alcaloides

Los alcaloides son un grupo de compuestos nitrogenados heterocíclicos (Figura 8) el primero del que se tiene uso con fines medicinales es la Morfina aislada del opio *Papaver somniferum*. La Walterione A, un alcaloide tipo quinolinona de las hojas de *Meloquia odorata*, ha exhibido actividad antifúngica contra un amplio espectro de hongos patógenos. Los mecanismos de acción de los alcaloides parecen ser primordialmente modificaciones del ADN-ARN (mutaciones), alquilación, efecto negativo en la ADN o ARN polimerasa, también en inhibición de la traducción protéica, se ha observado que afectan las membranas dando efectos negativos

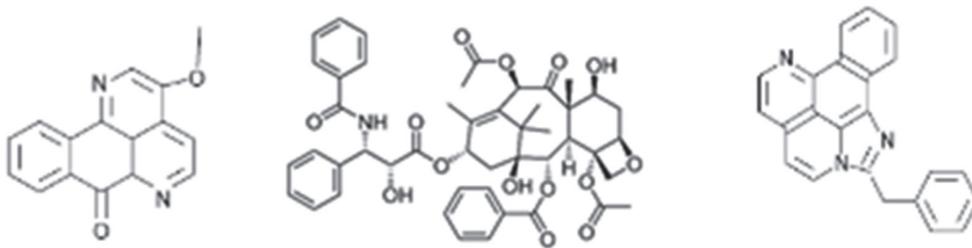


Figura 8. Estructura de alcaloides

en los transportadores de iones y por efecto en la estabilidad de la membrana y cuentan con la inhibición enzimática de hidrolasas y adenilato ciclasa.

#### 4.4.4.7. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que se producen en un amplio rango de especies de plantas (Figura 9) se encuentran almacenadas en las células vegetales como precursores inactivos listos para ser transformados en antibióticos activos vía enzimática en respuesta a un patógeno. Son compuestos glicosilados ampliamente

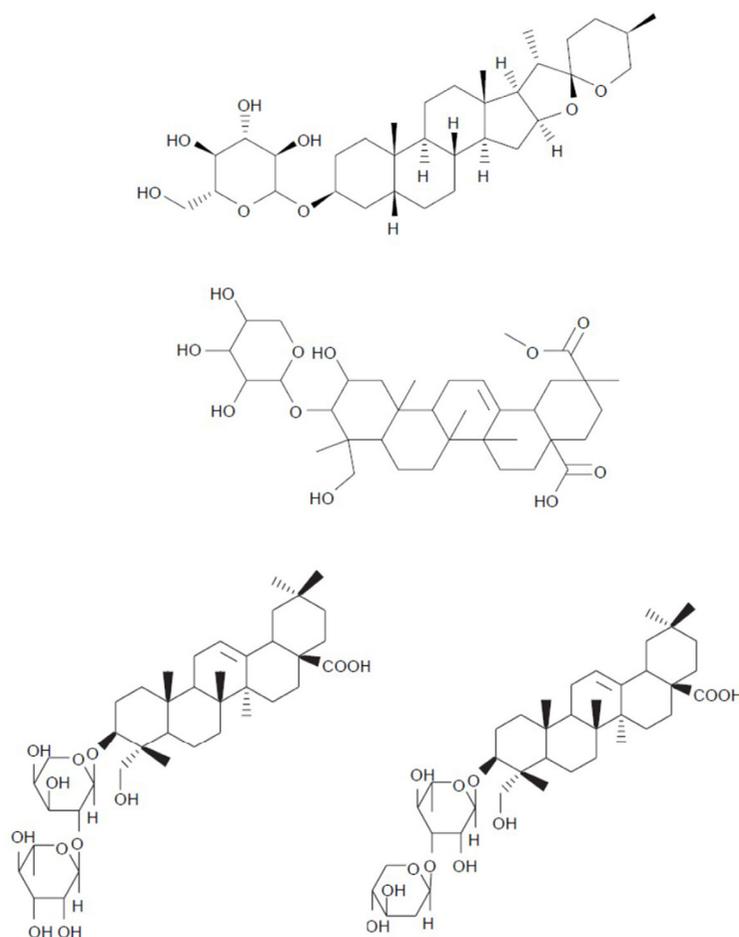


Figura 9. Diversidad estructural de saponinas

distribuidos en el reino vegetal y pueden ser divididos en tres grandes grupos: triterpenoides, esteroideos y alcaloides esteroideos glicosilados. Su mecanismo de acción es sobre la membrana afectando la integridad de las células fúngicas.

#### 4.5. Conclusión

Las plantas nos brindan una nueva fuente de moléculas con actividad biológica significativa, la medicina tradicional ha llegado hasta nuestra vida con el paso de generaciones brindándonos un conjunto de conocimiento considerado patrimonio para la humanidad, con la cual la calidad de vida de muchas personas se ha visto beneficiada. Los hongos representan para el hombre una fuente de pérdidas a nivel económico de muy alto nivel, además las enfermedades causadas por estos (micosis) son recurrentes en los pacientes, ya que su tratamiento es prolongado, costoso y con altos efectos secundarios. El aislamiento de moléculas de las plantas constituye una vía para disminuir el uso de aquellos fármacos de patente en los cuales estos efectos son notorios, ya que debido a la naturaleza química de los metabolitos secundarios pueden ejercer varias actividades a la vez, por ejemplo fungicida y antioxidante. Grupos de metabolitos como las quinonas, xantonas, cumarinas, alcaloides, entre otros, nos ofrecen éstos beneficios. Ya que sus mecanismos de acción nos brindan un amplio espectro de dianas para llevar a cabo su efecto. En conclusión el estudio de las plantas en esta última década ha llevado a la medicina nuevas moléculas con posibilidad de ser en algún momento nuevos fármacos para la aplicación en humanos y compuestos para combatir plagas.

#### Referencias

- Ajaib, M., Wahla, S.Q., & Khan, K.M. (2014). Firmiana Simplex: A Potential Source of Antimicrobials. *J. Chem. Soc. Pak.*, 36(4), 744-753.
- Ali-Shtayeh, M., & Ghdeib, S.I.A. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42, 665-672. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00499.x>
- Anwar, W., Haider, M.S., Aslam, M., Shahbaz, M., Khan, S.N., & Bibi, A. (2014). Assessment of antifungal potentials of some aqueous plant extracts and fungicides against. *J. Agric. Res.*, 52(3), 75-83.

- Arif, T., Bhosale, J.D., Kumar, N., Mandal, T.K., Bendre, R.S., Lavekar, G.S., & Dabur, R. (2009). Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(7), 621-638. <http://doi.org/10.1080/10286020902942350>
- Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Aoumar, A. (2013). Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 37-43. <http://doi.org/10.1111/lam.12012>
- Bajpai, V.K., & Kang, S.C. (2010). Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(3), 327-336. <http://doi.org/10.1007/S11746-009-1500-6>
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica* (4.<sup>a</sup> ed.). México: McGraw Hill.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., & Morse, S.A. (2005). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. In El Manual Moderno (Ed.), *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (18th ed., pp. 621-622). México DF.
- Butu, M., Dobre, A., Rodino, S., Butu, A., & Lupuleasa, D. (2013). Testing of the Antifungal Effect of Extracts of Burdock, Thyme and Rough Cocklebur. *Studia Universitatis «Vasile Goldiș», Seria Științele Vieții*, 23(1), 65-69.
- Choi, N.H., Choi, G.J., Min, B.S., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kang, M.S. et al. (2009). Effects of neolignans from the stem bark of *Magnolia obovata* on plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2057-2063. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04175.x>
- Coetzee, G., Marx, I.J., Pengilly, M., Bushula, V.S., Joubert, E., & Bloom, M. (2008). Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29(1), 33-38.
- Dellavalle, P.D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., & Rizza, M.D. (2011). Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* SPP. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(June), 231-240. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392011000200008>

- Digrak, M., Alma, M.H., & İlçim, A. (2001). Antibacterial and Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, 39(5), 346-350. <http://dx.doi.org/10.1076/phbi.39.5.346.5903>
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.
- Dulger, G., & Dulger, B. (2014). Antifungal Activity of Hypericum havvae Against Some Medical Candida Yeast and Cryptococcus Species. *Trop J Pharm Res*, 13(March), 405-408
- Duraipandiyar, V., Muthu, C., & Ignacimuthu, S. (2009). Antifungal Properties of Some Medicinal Plants. *The Icfai University Journal of Life Sciences*, 3(2), 54-59.
- Elfadil, H., Fahal, A., Kloezen, W., Ahmed, E.M., & van de Sande, W. (2015). The *In Vitro* Antifungal Activity of Sudanese Medicinal Plants against *Madurella mycetomatis*, the Eumycetoma Major Causative Agent. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003488. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003488>
- Gong, Y., Huang, Y., Zhou, L., Shi, X., Guo, Z., Wang, M., & Jiang, W. (2009). Chemical Composition and Antifungal Activity of the Fruit Oil of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae) from China. *Journal of Essential Oil Research*, 21(2), 174-178. <http://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700141>
- Guleria, S., & Kumar, A. (2006). Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5, 95-98.
- Gupta, P., Chakraborty, D., & Mittal, R. . (2015). Antifungal activity of medicinal plants leaf extracts on growth of *Macrophomina phaseolina*. *Agricultural Science Digest - A Research Journal*, 35(3), 211. <http://doi.org/10.5958/0976-0547.2015.00048.8>
- Hernández-Díaz, L., & Rodríguez-Jorge, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(2), 44-47.
- Hernández-Albíter, R.C., Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S., & Bravo-Luna, L. (2007). Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of Two Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 180-185.

- Hoffman, B.R., DelasAlas, H., Blanco, K., Wiederhold, N., Lewis, R.E., & Williams, L. (2004). Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Ten Medicinal Plants from Ghana. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), 13-17. <http://doi.org/10.1080/13880200490504925>
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X. et al. (2010). Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(11), 7558-7569. <http://doi.org/10.3390/molecules15117558>
- Kalaskar, P.S., Karande, V.V, Bannalikal, A.S., & Gatne, M.M. (2012). Antifungal Activity of Leaves of Mangroves Plant *Acanthus licifolius* Against *Aspergillus fumigatus*. *Indian J. Pharm. Sci.*, 74(6), 575-580. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.110614>
- Kavitha, K.S., & Satish, S. (2016). Bioprospecting of some medicinal plants explored for antifungal activity. *Pharmacognosy Journal*, 8(1), 59-65. <http://dx.doi.org/10.5530/pj.2016.1.13>
- Kimpe, A., Decostere, A., Martel, A., Devriese, L., & Haesebrouck, F. (2003). Phenotypic and genetic characterization of resistance against macrolides and lincosamides in *Streptococcus gallolyticus* strains isolated from pigeons and humans. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 9(1), S35-S38. <http://doi.org/10.1089/107662903322541874>
- Kisangau, D.P., Hosea, K.M., Lyaruu, H.V.M., Joseph, C.C., Mbwambo, Z.H., Masimba, P.J. et al. (2009). Screening of traditionally used Tanzanian medicinal plants for antifungal activity. *Pharmaceutical Biology*, 47(8), 708-716. <http://doi.org/10.1080/13880200902933039>
- Kolaczkowski, M., Kolaczowska, A., Środa, K., Ramalhete, C., Michalak, K., Mulhovo, S., & Ferreira, M.J.U. (2010). Substrates and modulators of the multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. *Mycoses*, 53(4), 305-310. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01711.x>
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Cavusoğlu, A., & Ercisli, S. (2013). *In Vitro* Antifungal Effect of Essential Oils from *Nepeta meyeri* Benth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2), 209-213.

- López, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J., Caverro, R., & Calvo, M. (2008). Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities. *Pharmaceutical Biology*, 46(9), 602-609. <http://doi.org/10.1080/13880200802179634>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., & Clark, D.P. (2009). Brock. Biología de los microorganismos. En Pearson Educación (Ed.), *Brock. Biología de los microorganismos* (12.<sup>a</sup> ed., p. 592).
- Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A., & Subratty, A.H. (2005). Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*, 43(3), 237-242. <http://doi.org/10.1080/13880200590928825>
- Meena, A.K., Kaur, R., Singh, B., Yadav, A.K., Singh, U., Sachan, A. et al. (2010). Review on antifungal activities of Ayurvedic Medicinal Plants. *Journal of Medicine (Cincinnati)*, 2(2), 146-148.
- Nair, R., & Chanda, S. (2008). Antimicrobial Activity of Terminalia catappa, Manilkara zapota and Piper betel Leaf Extract. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(June), 390-393. <http://doi.org/10.4103/0250-474X.43012>
- NCCLS. (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard – Second Edition Serving the World's Medical Science Community Through Voluntary Consensus* (Vol. 22).
- Orhan, D.D., Özçelîk, B., Hoşbaş, S., & Vural, M. (2012). Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish journal of biology*, 36, 672-686. <http://doi.org/10.3906/biy-1203-33>
- Otang, W.M., Grierson, D.S., & Ndip, R.N. (2012). Antifungal activity of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm. and *Gasteria bicolor* Haw. against opportunistic fungi associated with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacognosy magazine*, 8(30), 135-40. <http://doi.org/10.4103/0973-1296.96564>
- Pakshir, K., Bahaedinie, L., Rezaei, Z., Sodaifi, M., & Zomorodian, K. (2009). *In vitro* activity of six antifungal drugs against clinically important dermatophytes.

- Jundishapur Journal of Microbiology*, 2(4), 158-163. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.05.762>
- Peixoto, R., Guilhon, G., das Graças B. Zoghbi, M., Araújo, I., Uetanabaro, A., Santos, L., & do S.B. Brasil, D. (2013). Volatiles, A Glutarimide Alkaloid and Antimicrobial Effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). *Molecules*, 18(3), 3195-3205. <http://doi.org/10.3390/molecules18033195>
- Prabhakar, K., Kumar, L.S., Rajendran, S., Chandrasekaran, M., Bhaskar, K., & Saji-Khan, A.K. (2008). Antifungal activity of plant extracts against *Candida* species from oral lesions. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(6), 801-803. <http://doi.org/10.4103/0250-474X.49128>
- Rex, J.H.H., Pfaller, M.A.A., Walsh, T. J. J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, D., Ghannoum, M.A.A. et al. (2001). Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*, 14(4), 643-658. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.643-658.2001>
- Sadeghi-Nejad, B., & Deokule, S.S. (2010). Antidermatophytic activity of *Pogostemon parviflorus* Benth. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 279-285.
- Sadeghi-Nejad, B., Shiravi, F., Ghanbari, S., Alinejadi, M., & Zarrin, M. (2010). Antifungal activity of *Satureja khuzestanica* (Jamzad) leaves extracts. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 3, 36-40.
- Sakander, H., Akhilesh, B., & Koteshwara, A.R. (2015). Evaluation of antifungal potential of selected medicinal plants against human pathogenic fungi. *International Journal of Green Pharmacy*, 9(2), 110. <http://doi.org/10.4103/0973-8258.155058>
- Salipante, S.J., Barlow, M., & Hall, B.G. (2003). GeneHunter, a transposon tool for identification and isolation of cryptic antibiotic resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3840-3845. <http://doi.org/10.1128/aac.47.12.3840-3845.2003>
- Shahid, M., Malik, A., & Sheeba. (2003). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC beta-lactamases isolated

- from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS microbiology letters*, 228, 181-186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00756-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00756-0)
- Sibi, G., Alam, M.A., Shah, J., & Razak, M. (2014). Susceptibility pattern of *Malassezia* species to selected plant extracts and antifungal agents. *International Journal of Green Pharmacy*, 8(4), 226. <http://doi.org/10.4103/0973-8258.142675>
- Singburauodom, N. (2015). Hydroxychavicol from Piper betel leave is an antifungal activity against plant pathogenic fungi. *JBiopest*, 8(2), 82-92.
- Singh, M., Khatoon, S., Singh, S., Kumar, V., Rawat, A.K., & Mehrotra, S. (2010). Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. *Pharmacognosy Res*, 2(4), 254-257. <http://doi.org/10.4103/0974-8490.69127>
- Souza-Moreira, T. M., Severi, J.A., Lee, K., Preechasuth, K., Santos, E., Gow, N.A.R. et al. (2013). Anti-Candida targets and cytotoxicity of casuarinin isolated from *Plinia cauliflora* leaves in a bioactivity-guided study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(7), 8095-80108. <http://doi.org/10.3390/molecules18078095>
- Suárez-Jiménez, G.M., Cortéz-Rocha, M.O., Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., & Cinco-Moroyoqui, F.J. (2007). Antifungal Activity of Plant Methanolic Extracts Against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb and Fumonisin B1 Production. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 134-142.
- Sule, A., Ahmed, Q.U., Latip, J., Samah, O.A., Omar, M.N., Umar, A., & Dogarai, B.B.S. (2012). Antifungal activity of *Andrographis paniculata* extracts and active principles against skin pathogenic fungal strains *in vitro*. *Pharmaceutical biology*, 50(7), 850-856. <http://doi.org/10.3109/13880209.2011.641021>
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Aoumar, A. (2012). Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*, 35, 41-46. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.016>
- Tirillini, B., Pagiotti, R., Angelini, P., Pintore, G., Chessa, M., & Menghini, L. (2009). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of

Laserpitium garganicum from Italy. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(1), 103-105. <http://doi.org/10.1007/s10600-009-9237-x>

Vargas-Días, A., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, I.L., & Pérez-Brito, D. (2014). Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas Contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad Antifúngica de *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1), 1-11.

Velmurugan, P., Rajan, K., Kamaraj, M., Prabhu, S., Nadu, T., & Herbarium, T. R. (2011). Phytochemical And Antifungal Effects Of *Clerodendrum inerme* Leaf Extracts. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 12(1), 21-24.

Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., & Efthimiadou, A. (2013). Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not Bot Horti Agrobi*, 41(1), 86-92.

WHO. (2016). Medicina tradicional: definiciones 2016. Recuperado a partir de [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)

Yildirim, N.C., Paksoy, M.Y., Yuce, E., & Yildirim, N. (2013). Total Antioxidant Status and Antifungal Activities of Endemic Geophytic Plants Collected from Munzur Valley in Tunceli, Turkey. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(1), 403-408.

Zambuzzi-Carvalho, P.F., Tomazett, P.K., Santos, S.C., Ferri, P.H., Borges, C.L., Martins, W.S. et al. (2013). Transcriptional profile of *Paracoccidioides* induced by oenothien B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BMC microbiology*, 13, 227. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-13-227>

## ACTIVIDAD ANTIHIPERCOLESTEROLÉMICA

---

**Diana Patricia Moreno-Peña<sup>1</sup>, María Azucena Oranday-Cárdenas<sup>1</sup>, Paula Cordero-Pérez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Unidad de Hígado, Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[dpatricia.moreno@gmail.com](mailto:dpatricia.moreno@gmail.com), [azucena.orandaycr@uanl.edu.mx](mailto:azucena.orandaycr@uanl.edu.mx),  
[paula.corderoprz@uanl.edu.mx](mailto:paula.corderoprz@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.323>

Moreno-Peña, D.P., Oranday-Cárdenas, M.A., & Cordero-Pérez, P. (2016). Actividad antihipercolesterolemica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 129-160.

## Resumen

En el presente capítulo se aborda de manera general la función de los lípidos séricos, en particular del colesterol, las proteínas y enzimas que regulan su síntesis, así como los padecimientos asociados a su elevación a niveles superiores de lo normal y el panorama general de estas enfermedades en México. Se enlistan también las publicaciones científicas de plantas estudiadas por más de dos décadas, para evaluar la actividad hipocolesterolémica en modelos *in vivo* e *in vitro*, las dosis utilizadas, las determinaciones realizadas, así como los resultados obtenidos para cada una de ellas. De esta revisión se encontró que se reportan estudios de 64 plantas de diferentes familias predominando la Fabaceae seguida de la Rosaceae. En la mayoría de los estudios consultados se utilizó la planta completa y el extracto que más fue usado fue el etanólico. Los principales metabolitos que se evaluaron para la actividad hipocolesterolémica descritos en la mayoría de los artículos revisados fueron la reducción de los niveles séricos de lípidos totales, colesterol total y de los niveles de triglicéridos; además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo. Fueron utilizados diversos modelos animales para inducir hipercolesterolemia, los modelos más utilizados fueron una alimentación con una dieta aterogénica y la inducción con Tritón, siendo ratas el animal más utilizado.

## Palabras clave

Actividad hipocolesterolémica de plantas, colesterol total, triglicéridos, lípidos séricos.

## 5.1. Introducción

En México la obesidad y el sobrepeso son considerados un problema de salud pública, de acuerdo con la encuesta nacional de salud 7 de cada 10 mexicanos presentan obesidad. En las últimas tres décadas esta ha tenido un aumento inusitado y su velocidad de incremento ha sido una de las más altas a nivel mundial. (Romero-Martínez et al., 2013).

La obesidad es considerada uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, tales como las enfermedades cardiovasculares, las cuales son la principal causa de mortalidad general en México (INEGI, 2013), y están ampliamente ligadas a niveles de colesterol alto en sangre.

El colesterol pertenece al grupo químico de los esteroides, su nombre proviene del griego *stereos* (*στερεος*) sólido, contiene un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, son compuestos con 27 a 29 átomos de carbono, formados por una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) en el carbono 3. Son lípidos resistentes a la saponificación y se encuentran tanto en células animales como vegetales. Estos lípidos se clasifican como triterpenos que derivan del escualeno los cuales resultan de la ciclación dando lanosterol en animales y cycloartenol en plantas, el primero da lugar a la formación de colesterol y el segundo a fitoesteroides y a sus formas reducidas, los fitoestanoles, (Domínguez, 1988), éstos producen una disminución del colesterol total plasmático (cuando los valores no son altos). Existen varias teorías sobre el mecanismo de acción de éstos, una es que son poco absorbidos en el intestino y los que se absorben se excretan por la bilis lo anterior es posible por la similitud de la estructura química entre el colesterol y los fitoesteroides; otra propone que como el colesterol del intestino es poco soluble, en presencia de fitoesteroides y fitoestanoles precipita en un estado que impide su absorción y se elimina, o que provoca que el colesterol de la circulación pase al lumen intestinal (De Smet, Mensink & Plat, 2012). Sin embargo la FDA recomienda discreción en el uso de estos compuestos como sustancias que pueden reducir el riesgo de enfermedades coronarias al disminuir los niveles de colesterol sanguíneo FDA 2003 (Taylor, 2013) y otras publicaciones indican que son necesarios estudios clínicos pertinentes antes que sea recomendada una dieta suplementada con fitoesteroides (Weingärtner, Böhm & Laufs, 2009), aunque recientemente al-

gunos autores los consideran importantes aliados en la prevención de las enfermedades cardíacas (Coker et al., 2015), por lo que es recomendable seguir investigando sobre ellos, ya que la enfermedad coronaria continúa siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados, la reducción de la concentración de LDL-colesterol es la estrategia primaria para disminuir el riesgo de enfermedad coronaria.

Recientemente la OMS realizó un estudio utilizando los datos de las encuestas de vigilancia sanitaria, representativas a nivel nacional en ocho países entre los que se encontraba México para conocer la proporción de individuos con un tratamiento eficaz para tratar la hipercolesterolemia, de este estudio se concluyó que la mayoría de las personas que padecen hipercolesterolemia a nivel mundial no están recibiendo el tratamiento que necesitan para reducir los índices de colesterol sérico (Roth et al., 2011).

El colesterol es el lípido natural más conocido, su notoriedad es debida a la fuerte correlación entre sus niveles elevados en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares en el ser humano. Es una molécula esencial en muchos animales, incluido el hombre, pero no es necesario en la dieta de los mamíferos porque todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores sencillos (Nelson & Cox, 2005). Sin embargo, ésta síntesis a veces es anómala, Michael Brown y Joseph Goldstein, Premio Nobel 1985, descubrieron mutaciones en el gen del receptor de LDL, lo que ocasiona la Hipercolesterolemia Familiar, (Goldstein & Brown, 2009) por lo que aunque el colesterol es un intermediario clave en la biosíntesis de sustancias fisiológicamente importantes: vitamina D, esteroides, incluyendo los ácidos biliares, hormonas adrenocorticales y hormonas sexuales (estrógenos, testosterona y progesterona) además que su participación en la fertilidad humana está en estudio (Mahan, Escott-Stump & Raymond, 1998; Oh, Lee & Lim, 2006), y que es una molécula indispensable en nuestro metabolismo, si el interior de las arterias coronarias o las carótidas tienen exceso de colesterol, pueden provocar infartos al corazón o al cerebro, para evitar este proceso, se han hecho muchos estudios para tratar la hipercolesterolemia, si ésta se debe a incremento de lipoproteínas de baja densidad-colesterol, se intenta disminuir las cifras de éstas últimas mediante la modificación del régimen nutricional con dieta baja en grasas y ácidos grasos saturados y rica en fibra (Saravanan, Srikumar, Manikandan, Jeya & Sheela-Devi, 2007), que puede ser suplementada con fitoesteroles, pero si las concentraciones de lipoproteínas de baja

densidad-colesterol permanecen arriba de 130 mg/dL después de tres meses de dietoterapia, se instituye farmacoterapia. Los fármacos que suelen usarse con objeto de disminuir las cifras de lipoproteínas de baja densidad comprenden:

Niacina o ácido nicotínico, fue introducido como agente anticolesterolémico en 1954. Fue una de las primeras dos drogas que fueron probadas en un estudio clínico de prevención cardiovascular y fue la primera y la única droga en ese estudio que demostró prevenir la enfermedad coronaria. No obstante, su uso ha sido limitado principalmente por los efectos secundarios producidos, (Rubor, prurito, aumento de glucosa, gota, náusea y hepatitis en prácticamente todos los usuarios del tratamiento, en sus días iniciales de uso (Knopp, 2000).

Fibratos, derivados del ácido fibríco (ácido clorofenoxiisobutírico), actúan estimulando los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR) la mayoría de los derivados del ácido fibríco producen gastritis, litos vesiculares y rabdomiólisis y en ocasiones problemas en la coagulación (Ericsson et al., 2016).

Estatinas o vastatinas, son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A reductasa, son los fármacos más eficaces disponibles (Liu et al., 2002), sin embargo, entre sus efectos colaterales están: aumentar transaminasas, dolores musculares y rabdomiólisis (O'Connor & Deuster, 2011). En la actualidad, se dispone de cuatro inhibidores de este tipo: la mevastatina una de las primeras estatinas obtenidas en 1976, la cual fue aislada de cultivos de *Penicillium*, más tarde se aisló la lovastatina, un análogo, aislado de cultivos de *Aspergillus terreus*, que solo difería por la presencia de un grupo metilo, además se cuenta con la sinvastatina, pravastatina y fluvastatina, que fue la primera estatina totalmente sintética. (Endo, 2010; Yamamoto, Yamamura, Yokoyama, Sudo & Matsuzawa, 1984). Sin embargo, algunos pacientes no pueden tolerar los efectos adversos de esos fármacos y por lo tanto se requiere de investigación continua para la búsqueda de nuevos productos, para eso es necesario el estudio de las plantas, las cuales pueden ser una buena opción como sustituto de los fármacos (Kojuri, Vosoughi & Akrami, 2007).

Gran parte de la población de los países en vías de desarrollo dependen de la medicina tradicional y de los remedios a base de plantas para su atención

primaria, sin embargo, en los últimos 20 años el interés por el uso de terapias alternativas naturales ha ido en incremento en los países industrializados (Benzie & Wachtel-Galor, 2011).

## 5.2. Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol

Algunos estudios en donde se evalúa la actividad hipocolesterolémica de las plantas se han realizado *in vivo* utilizando ratas, conejos, hámsteres o incluso el hombre. Otros se han efectuado *in vitro* midiendo la actividad de enzimas como la escualeno epoxidasa, la cual está involucrada en la biogénesis del colesterol (Abe, Seki, Noguchi & Kashiwada, 2000), otros sobre la inhibición de la enzima escualeno sintasa, una enzima involucrada en la biosíntesis del colesterol (Choi et al., 2007) y otros han evaluado la inhibición de la HMG-CoA reductasa la cual cataliza la formación de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) el cual constituye el metabolito clave en la biosíntesis del colesterol (Menéndez et al., 2001; Wächtershäuser, Akoglu & Stein, 2001).

En México el 60% de la población utiliza remedios herbales como tratamiento a sus enfermedades. Sin embargo, existen pocas evidencias científicas que fundamenten estos efectos terapéuticos, se estima que solo el 20% de las plantas empleadas en la cultura popular han sido analizadas biológica y científicamente. Los principales grupos fitoquímicos reportados con actividad hipocolesterolémica han sido del tipo alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles, glicósidos y terpenos (Vogel et al., 2015).

## 5.3. Plantas con actividad hipocolesterolémica

En la siguiente tabla se agrupan las publicaciones científicas de plantas estudiadas por más de dos décadas, para evaluar la actividad hipocolesterolémica en modelos *in vivo* e *in vitro*, las dosis utilizadas, las determinaciones realizadas, así como los resultados obtenidos.

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Achyranthes aspera</i> (Amarantáceas)	Extracto alcohólico 100 mg/kg	Triton WR-1339/ Ratas normocolesterolémicas	Triton WR-1339 Lípidos séricos: CT ↓, PL ↓, TG ↓, LT ↓, Normocolesterolémicas Lípidos séricos: CT ↓, PL ↓, Ac. Cólico fecal ↑, Ac. Desoxicólico fecal ↑	(Khanna, Chander, Singh, Srivastava & Kapoor, 1992)
<i>Achillea wilhelmssii</i> (Asteraceae)	Extracto Hidro-alcohólico. 15-20 gotas diarias por 6 meses	Pacientes con hipercolesterolemia	Lípidos séricos: CT ↓, LDL ↓, TG ↓, HDL-C ↑	(Asgary et al., 2000)
<i>Agaricus bisporus</i> (Agaricaceae)	50 g/kg de fibra de hongo por d por 6 semanas	Ratas de 8 sem con dieta especial	Lípidos séricos: CT ↓, LDL ↓, IDL ↓ LDL-r ↑	(Fukushima et al, 2000)
<i>Allium sativum</i> (Liliaceae)	Polvo de ajo soluble en agua	Cultivo de Hepatocitos de rata.	Enzimas de la biosíntesis de colesterol: HMG CoA ↓, Colesterol α hidroxilasa ↓, ACAT ↓	(Gebhardt, 1991)
<i>Allium sativum</i> (Liliaceae)	Extracto clorofórmico 166 µg/mL	Homogenizado de hígado para evaluar la síntesis de colesterol	Síntesis de colesterol hepático ↓	(Sendl, Schliack, Löser, Stanislaus & Wagner, 1992)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Alpinia galanga</i> (Zingiberaceae)	Extracto etanólico 20 mg por d por 4 semanas	Ratas Wistar con dieta alta en grasa	Lípidos séricos: CT ↓, PL ↓, TG ↓, HDL-C	(Achuthan & Padikkala, 1997)
<i>Alpinia pruri</i> (Zingiberaceae)	Extracto etanólico (500 mg/kg)		Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓, LDL-C/ HDL-C ↓, CT/HDL-C ↓ Peroxidación lipídica: TBARS ↓ Metabolismo lipídico: PPARγ ↓	(Chang, Wu, Wang, Pei & Lin, 2010)
<i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae)	Extracto etanólico 0.1, 0.2, y 0.4 g/Kg d	Ratas con diabetes inducida con streptozotocina	Lípidos séricos: TG ↓	(Zhang & Tan, 2000)
<i>Azadirachta Indica</i> (Meliaceae)	Extracto etanólico 100 mg/kg/d/ 4 semanas	Ratas con dieta aterogénica. 0.15% sales bilíares, 1% de colesterol	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, PL NS Lípidos hepáticos: TG ↓	(Chattopadhyay, 1995)
<i>Basella alba</i> (Basellaceae)	Extracto metanólico (100 y 200 mg/kg)	Conejos con dieta hipercolesterolemica	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑ Enzimas antioxidantes: SOD ↑	(Baskaran et al., 2015)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Cajanus cajan</i> L (Fabaceae)	Extracto etanólico (200 mg/kg)	Dieta alta en colesterol en ratones Kunming	Lípidos hepáticos: CT ↓, TG ↓ Enzimas antioxidantes: SOD ↓ Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol: HMGCoA ↓, CYP7A1 ↓, LDL-R ↓	(Luo, Sun, Si & Chen, 2008)
<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	3g/d	Pacientes hiperlipidémicos	Lípidos Séricos: CT ↓, LDL-C, HDL-C Actividad antioxidante: TRAP ↑	(Santana, Mandarino & Cardoso, 2008)
<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	Extracto nanoemulsificado de té verde	Ratones C57BL/6	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓ Genes y proteínas reguladores del colesterol: SREBP2 ↓, LDL-R ↑, HMGCoA ↓	(Kim et al., 2012)
<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	Extracto etanol- agua (50% v/v)	Ratas Sprague Dawley con dieta aterogénica	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓, TG ↓	(Yousaf, Butt, Suleria & Iqbal, 2014)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Citrus bergamia</i> Risso (Rutaceae)	Jugo del fruto 1 ml/rata/d	Dieta suplementada con 2% de colesterol y 2% de colato de sodio en ratas Wistar	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL ↓, HDL ↑, Esteroles fecales ↑ Ac. Biliares fecales ↑ Actividad antioxidante: DPPH ↑	(Miceli et al., 2007)
<i>Cnidioscolus chayamansa</i> (Euphorbiaceae)	Extracto acuoso (100 mg/kg)	Dieta adicionada con 1% de colesterol y 0.5% de colato de sodio en ratones albinos Balb/c	Lípidos séricos: CT ↓ Enzimas síntesis de colesterol: HMGCoA NS	(Miranda-Velasquez et al., 2010)
<i>Coptis chinensis</i> (Ranunculaceae)	Extracto acuoso (0.125, 0.25, 0.5 g/kg/d)	Dieta adicionada con 18% de caseína, 1% de colesterol y 0.5% de ácido. cólico en ratas Wistar	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓ Colesterol hepático ↓	(Yuan, Tu, Ye & Wu, 2006)
<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	Extracto etanólico (300 mg/100g)	Triton-WR-1339. Ratas albinas	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, PL ↓, LDL-C ↓, VLDL-C ↓	(Dixit, Joshi & Jain, 1986)
<i>Gyamopsis tetragonoloba</i> (Goma guar)	Adicionado en la dieta 6 y 12%	Codornices con dieta adicionada con 0.5% colesterol.	Lípidos séricos: CT ↓	(Day, 1990)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Dioscorea spp</i> (Dioscoreaceae)	Saponina adicionada a la dieta en 0.1y 0.5%	Dieta adicionada con 1% de colesterol en ratas Sprague Dawley	Lípidos séricos: CT ↓, HDL-C ↑ Colesterol hepático ↓ TBARS ↓ Enzimas antioxidantes: SOD ↑, GSH-Px ↑, CAT ↑	(Son et al., 2007)
<i>Euterpe oleracea</i> (Arecaceae)	Pulpa del fruto dieta adicionada al 2%	Dieta adicionada con colesterol en ratas Fisher	Lípidos séricos: TC ↓, NO HDL-C ↓ Enzimas de peroxidación lipídica: SOD ↓, PON ↓	(de Souza, Silva, Silva, de Paula Oliveira & Pedrosa, 2010)
<i>Euterpe oleracea</i> (Arecaceae)	Pulpa del fruto adicionado al 2% en la dieta	Ratas Fisher con dieta hipercolesterolémica	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, HDL-C ↑ Excreción fecal de colesterol ↑ Genes y proteínas reguladores del colesterol: LDL-R ↑, ABCG5 ↑, ABCG8 ↑	(Souza et al., 2012)
<i>Fagopyrum esculentum</i> (Polygonaceae)	Extracto proteico adicionado a la dieta por 3 semanas	Ratas alimentadas con una dieta adicionada en colesterol al 0.5% y ácido cólico al 0.125%	Lípidos séricos: CT NS, TG NS Lípidos hepáticos: CT ↓, TG NS	(Kayashita, Shimaoka & Nakajoh, 1995)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Gymnema sylvestre</i> (Apocynaceae)	Extracto (100 mg/kg)	Ratas albinas con dieta alta en colesterol	Lípidos séricos: TG ↓, CT ↓, VLDL-C ↓, LDL-C ↓	(Bishayec & Chatterjee, 1994)
<i>Gymnema sylvestre</i> (Asclepiadaceae)	Á. gimenico 0.05 – 1.0 g/kg por 22 d	Ratas sin dieta de colesterol	Excreción fecal de colesterol ↑ Excreción fecal de Ac. Biliares	(Nakamura, Tsumura, Tonogai & Shibata, 1999)
<i>Gymnema sylvestre</i> (Asclepiadaceae)	Extracto Hidroalcohólico 33 mg/kg por 3 semanas	Ratas Wistar de tres semanas con dieta especial	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓ Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol: LCAT	(Shigematsu, Asano, Shimosaka & Okazaki, 2001)
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Haematococcaceae)	Extractos enriquecidos en astaxantina	Ratones Apo E-/- con una dieta aterogénica	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓ Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol: LDL-R ↑, SREBP-2 ↑, Acetil-CoA carboxilasa ↑, Acil-CoA oxidasa ↑	(Yang et al., 2011)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L (Malvaceae)	Extracto acuoso (500 y 1000 mg/kg)	Administración de colesterol i.g 2g/kg en ratas Sprague-Dawley	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL ↓, HDL NS, Oxidación de LDL, TBARs ↓	(Hirunpanich et al., 2006)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Hymenocardia Acida</i> ( <i>Phyllanthaceae</i> )	Extracto metanólico 500 mg/kg	Ratas Wistar con diabetes inducida con aloxano	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL ↓, HDL ↓	(Ezeigbo & Asuzu, 2012)
<i>Lagerstroemia speciosa</i> ( <i>Lithraceae</i> )	Extracto acuoso (5% en el alimento por 5 semanas	Ratones de 4 semanas con dieta especial	CT ↓, TG ↓	(Kakuda et al., 1996)
<i>Malus domestica</i> ( <i>Rosaceae</i> )	Polifenoles de la planta 0.3 y 0.6%	Dieta adicionada con 0.1% de colesterol en Hamsters	Lípidos séricos: TC NS, HDL-C ↑, LDL-C ↓ Proteínas y enzimas reguladoras del colesterol: SREBP-2, LDLR Sin cambio, HMGCR, CYP7A, CEPT ↓	(Lam et al., 2008)
<i>Medicago sativa</i> ( <i>alfalfa</i> ) ( <i>Fabaceae</i> )	Extracto etanólico 500 mg/d	Conejos alimentados con 500 mg colesterol /5 mL de aceite de coco por 4 meses	Lípidos séricos: (TC, TG, PL, LDL-C y VLDL-C) ↓ Peso de Hígado ↓ Colesterol hepático ↓ Colesterol en tejidos ↓	(Dixit et al., 1986)
<i>Momordica charantia</i> ( <i>Cucurbitaceae</i> )	Fruto adicionado a la dieta 5%	Ratas Wistar con dieta hipercolesterolemica	Lípidos séricos: CT ↓, Ac. Biliares fecales ↑ Genes y proteínas reguladores del colesterol: CYP7A1 ↑	(Matsui, Yamane, Takita, Oishi & Kobayashi-Hattori, 2013)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Moringa oleifera</i> (Moringaceae)	Extracto 80% metanol en agua	Células HepG2 suspendidas en DMEM, usando RT-PCR	Genes y proteínas reguladores del colesterol: HMGCoA↓, HMG-CoAR↓, PPARα1↓, PPARγ↓	(Sangkitikomol, Rocejanasaroj & Tencomnao, 2014)
<i>Morus alba</i> L. (Moraceae)	Fraciones de extracto etanólico 500 mg/Kg	Dieta adicionada con 25% de aceite de coco y 2% de colesterol en ratas Wistar	Lípidos séricos: CT↓, TG↓, LDL-C↓, VLDL-C↓ Parámetros antioxidantes: PON1 NS Plasma: TBARS↓, GST: NS Hígado: TBARS↓, GST NS	(El-Beshbishy, Singab, Sinkkonen & Pihlaja, 2006)
<i>Nasturtium Officinale</i> (Brassicaceae)	extracto hidroalcohólico (200 mg/kg)	Ratas Wistar diabéticas	Lípidos séricos: CT↓, TG↓, LDL-C↓	(Mousa-Al-Reza Hadjzadeh, Moradi & Ghorbani, 2015)
<i>Ocimum basilicum</i> (Lamiaceae)	Extracto etanólico 60 µg/mL	Cultivo de Macrófagos humanos	Acumulación lipídica : Tinción Rojo Oleoso ↓ Síntesis de lípidos: Colesterol no esterificado ↓	(Bravo, Amrani, Aziz, Harnafi & Napolitano, 2008)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Ocimum sanctum</i> (Lamiáceae)	Hojas frescas 1 y 2 g/100 g dieta	Conejos albinos normales	Lípidos séricos: TG ↓, CT ↓, PL ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑ Esteroles fecales ↑	(Surkar, Lavania, Pandey & Pant, 1994)
<i>ofloxeris dentata</i> (Asteraceae)	Extracto metanólico 40 mg/kg y 80 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina 65 mg/kg	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓	(Choi, Young & Kim, 1990)
<i>Olea europea</i> (Oleaceae)	Extractos fenólicos de aguas residuales de molino de oliva. 10 mg/kg	Dieta suplementada con 1% de colesterol y 0.25% de sales bilíares en ratas Wistar	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓ Tejidos: TBARS ↓ Enzimas antioxidantes: CAT ↑, SOD ↑	(Fki, Sahnoun & Sayadi, 2007)
<i>Opuntia robusta</i> (Cactaceae)	Pulpa de nopal 250 g/d, por 8 semanas	Mujeres no obesas con hipercolesterolemia moderada.	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, VLDL-C ↓, HDL-C NS	(Wolfram, Kritz, Efthimiou, Stomatopoulos & Sinzinger, 2002)
<i>Paederia foetida</i> (Rubiaceae)	Extracto metanólico 100, 250 y 500 mg/kg.	Ratas con diabetes inducida con Streptozotocina	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, PL ↑, HDL C ↑	(Kumar et al., 2014)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Polvo: 125 a 250 mg/kg/d/3d.	Ratas con alta dieta en colesterol	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, PL ↑, HDL C ↑	(M. Yamamoto, Uemura, Nakama, Uemiya & Kumagai, 1983)
<i>Parkinsonia aculeata</i> (Fabaceae)	Extracto acuoso metanólico (250 y 500 mg/kg)	Ratas diabéticas inducidas con alloxan y con dieta hipercolesterolémica	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓ Reducción de manera dosisdependiente	(Marzouk, Moharram, El Dib & El-Hossary, 2013)
<i>Persea americana</i> (Lauraceae)	Harina de semilla (125, 250 y 500 mg/kg)	Ratones CD-1 con dieta hipercolesterolémica.	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-L ↓, TG ↓	(Pahua-Ramos et al., 2012)
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	Polvo de planta 5 y 10% en la dieta	Dieta adicionada con colesterol	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑ Lípidos hepáticos ↓	(K.-S. Kim, Ezaki, Ikemoto & Itakura, 1995)
<i>Platycodon grandifloru</i> (Campanulaceae)	Saponinas de Extracto acuoso 0.3 - 1.0% adicionado en la dieta.	Dieta adicionada con 0.25% de colesterol en Hámster	Lípidos séricos: CT ↓, TG NS, NON HDL-C ↓ Colesterol hepático ↓ Colesterol fecal ↓	(Zhao, Harding, Marinangeli, Kim & Jones, 2008)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Prunus davidiana</i> (Rosaceae)	Extracto metanólico 40 y 80 mg/kg/3 d	Ratas con dieta adicionada con 10 g de aceite de soya, 4 g de mezcla de sales, 1 g de mezcla de vitaminas, 2 g de celulosa, y almidón ad libitum por 6 d.	Lípidos séricos: TG ↓, CT ↓ Índice aterogénico ↓ Colesterol hepático ↓ Colesterol libre NS, Tejido adiposo, TG ↑	(J. S. Choi, Yokozawa & Oura, 1991)
<i>Pterocarpus marsupium</i> (Fabaceae)	Extracto de acetato de etilo 120 mg/kg/14 d	Ratas con dieta adicionada con 2% de colesterol, 1% de ac, cólico.	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, VLDL-C ↓, HDL-C NS	(Jahromi, Ray & Chansouria, 1993)
<i>Quillaja saponaria</i> (Quillajaceae)	Planta pulverizada (100 ppm)	Ratas Wistar diabéticas inducidas con Estreptozotocina	Lípidos Séricos: CT ↓, TG ↓, HDL-C ↓, LDL-C: NS Peroxidación lipídica: MDA ↓, NOx ↑	(Fidan & Dündar, 2008)
<i>Rosa rugosa</i> (Rosaceae)	Extracto metanólico adicionado en dieta al 1%	Ratas con dieta purificada	Lípidos séricos: CT NS, TG ↓ Lípidos hepáticos: TG hepático ↓	(Lee, Kim, Lee, Rhee & Choi, 1991)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Sesamum indicum</i> L. (Pedaliaceae)	Extracto proteico	Dieta adicionada con 2% de colesterol en ratas albinas	Lípidos séricos: CT ↓, LDL-C ↓, TG ↓ Peroxidación lipídica: MDA ↓ Plasma ↓ Membrana ↓ Lipoproteínas ↓	(Biswas, Dhar & Ghosh, 2010)
<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	Terpenoide B-amirina (100 mg/kg)	Ratones Swiss con dieta alta en grasas.	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓ VLDL-C ↓, HDL-C ↑ Índice aterogénico ↓	(Santos et al., 2012)
<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	Jugo de tomate	Ratas Sprague-Dawley con dieta alta en grasas.	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↓, HMGR ↓	(Navarro-González, Pérez-Sánchez, Martín-Pozuelo, García-Alonso & Periago, 2014)
<i>Solanum melongena</i> (Solanaceae)	Infusión de fruto deshidratado 2% peso/vol diarios por 5 semanas	Pacientes con hipercolesterolemia	Lípidos séricos CT ↓, LDL-C ↓, HDL-C NS	(Guimarães et al., 2000)

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
Terminalia belerica (Combretaceae)	Pulpa del fruto secada y pulverizada. 500 mg/d	Conejos a los que se les administró 500 mg/kg de colesterol por 45 d. por 90 d se les administró dieta normal o pulpa de fruto 500 mg/d.	Lípidos séricos: CT ↓, TG:NS, CT en tejidos ↓, Colesterol hepático ↓	(Shailla, Udupa & Udupa, 1995)
Terminalia arjuna (Combretaceae)	Extracto etanólico 50% (100 mg por Kg	Conejos con dieta hiperlipidémica	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓	(Ram, Lauria, Gupta, Kumar & Sharma, 1997)
<i>Theobroma cacao</i> (Malvaceae)	Extracto polifenólico (adicionado al 1% en alimento)	Dieta suplementada con colesterol 1% en ratas Wistar	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓ Colesterol fecal ↑ Ac. Biliares fecales ↑	(Yasuda et al., 2008)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (Fabaceae)	Extracto de acetato de etilo adicionado a la dieta en un 0.125%	Dieta adicionada con 1% de colesterol y 1% de ácido cólico	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑ Estrés oxidativo en tejidos (hígado, corazón y riñón): TBARS ↓, CAT ↑, SOD ↓	(Belguith-Hadriche et al., 2010)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta y familia	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados	Referencia
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	Extracto acuoso de uva ad libitum.	Ratones Apo E -/- alimentadas con dieta aterogénica	Lípidos séricos: CT ↓, TG NS Lípidos hepáticos: CT ↓, TG NS Lípidos fecales: CT ↑, TG ↑ Disminución de lesión arteriosclerótica en nivel avanzado.	(Peluzio et al., 2014)
<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Extracto etanólico 250 µg/d, durante 10 semanas	Ratones de 6 semanas con dieta especial	Lípidos séricos: CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑ Estrés oxidativo: TBARS ↓	(Fuhrman, Rosenblat, Hayek, Coleman & Aviram, 2000)

Abreviaturas: CT, colesterol total; PL, fosfolípidos; TG, triglicéridos; LT, lípidos totales; HMGCoA ;LDL-t, receptor de lipoproteína de baja densidad; LDL-C, lipoproteína de baja densidad-colesterol; HDL-C, lipoproteína de alta densidad-colesterol; VLDL-C lipoproteína de muy baja densidad-colesterol; PPAR $\gamma$ , receptor activado de proliferación de peroxisoma; TRAP, potencial antioxidante reactivo total; GSH-Px, glutatión peroxidada; ACAT, Acil CoA Colesterol aciltransferasa; SOD, superóxido dismutasa; GSH, glutatión; MDA, malondialdehído; CAT, catalasa; DPPH, 2,2-difenil, TBARS, especies reactivas de ácido triobarbiturico, PON $^1$ , paraxonasa; d, día; i.g, intragástrico; NS, no significativo, ↓ disminuye, ↑ aumenta.

Tabla.1 Plantas estudiadas con actividad hipocolesterolemica

## 5.4. Conclusión

De los artículos revisados se encontró que los principales mecanismos para inducir hipercolesterolemia fueron: una dieta aterogénica, triton y en aquellas donde se evaluó a la par la actividad diabética se utilizó estreptozotocina y alloxan. Estos modelos de daño principalmente fueron realizados en animales de experimentación utilizando ratas en un 57%, ratones en un 14%, en conejos 8%, en menor cantidad se usaron hamsters y codornices, en algunos se empleó el homogenizado de hígado (6%) para evaluar la síntesis de colesterol y en un pequeño porcentaje (6%) de los estudios se emplearon pacientes

Se reportan estudios de 64 plantas de diferentes familias predominando la Fabaceae seguida de la Rosaceae. En la mayoría de los estudios consultados se utilizó la planta completa (29%), el extracto más utilizado fue el etanólico (20%), seguido del acuoso, metanólico (ambos al 10%), el hidroalcohólico (7%) y con este mismo porcentaje se utilizaron compuestos puros de los cuales prevalecieron las saponinas; aunque en menor porcentaje, los extractos de acetato de etilo y compuestos fenólicos (4%), clorofórmico (2%), también fueron utilizados además de proteínas en un 3%.

Los principales metabolitos que se evaluaron para la actividad hipocolesterolemica descritos en la mayoría de los artículos revisados fueron la reducción de los niveles séricos de lípidos totales, colesterol total y de los niveles de triglicéridos.; además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) y una restauración de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) evaluados en suero o tejido. Además de la evaluación de una serie de genes y proteínas reguladores del colesterol como SREBP-2, LXR $\alpha$ , CYP7A1 HMGCoA y LDL-R., Acetil coenzima A carboxilasa.

## Referencias

- Abe, I., Seki, T., Noguchi, H., & Kashiwada, Y. (2000). Galloyl esters from rhubarb are potent inhibitors of squalene epoxidase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis. *Planta Medica*, 66(8), 753–756. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-9781>

- Achuthan, C.R., & Padikkala, J. (1997). Hypolipidemic effect of *Alpinia galanga* (Rasna) and *Kaempferia galanga* (Kachoori). *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 12(1), 55-58. <http://doi.org/10.1007/BF02867956>
- Asgary, S., Naderi, G.H., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Mostafavi, S., & Vakili, R. (2000). Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 26(3), 89-93.
- Baskaran, G., Salvamani, S., Azlan, A., Ahmad, S.A., Yeap, S.K., & Shukor, M.Y. (2015). Hypocholesterolemic and Antiatherosclerotic Potential of *Basella alba* Leaf Extract in Hypercholesterolemia-Induced Rabbits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/751714>
- Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussi, K., El Feki, A., Sayadi, S., & Makni-Ayedi, F. (2010). Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2116-2122. <http://dx.doi.org/10.1021/jf903186w>
- Benzie, I.F.F., & Wachtel-Galor, S. (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/b10787-2>
- Bishayee, A., & Chatterjee, M. (1994). Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effects of oral *Gymnema sylvestre* R. Br. Leaf extract in albino rats fed on a high fat diet. *Phytotherapy Research*, 8(2), 118-120. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2650080216>
- Biswas, A., Dhar, P., & Ghosh, S. (2010). Antihyperlipidemic effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate in rats fed a normal and high cholesterol diet. *Journal of Food Science*, 75(9), H274-H279. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01821.x>
- Bravo, E., Amrani, S., Aziz, M., Harnafi, H., & Napolitano, M. (2008). *Ocimum basilicum* ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. *Fitoterapia*, 79(7), 515-523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2008.05.002>
- Chang, N.W., Wu, C.T., Wang, S.Y., Pei, R.J., & Lin, C.F. (2010). *Alpinia pricei* Hayata rhizome extracts have suppressive and preventive potencies against

- hypercholesterolemia. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8), 2350-2356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.070>
- Chattopadhyay, R.R. (1995). Hypolipidemic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 61, 281.
- Choi, J.S., Yokozawa, T., & Oura, H. (1991). Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *Journal of Natural Products*, 54(1), 218-224. <http://dx.doi.org/10.1021/np50073a022>
- Choi, J.S., Young, H.S., & Kim, B.W. (1990). Hypoglycemic and hypolipemic effects of *Ilex dentata* in diabetic rats. *Archives of Pharmacal Research*, 13(3), 269-273. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02856534>
- Choi, S., Hur, N., Ahn, S., Kim, D., Lee, J., Kim, D. et al. (2007). Isolation and structural determination of squalene synthase inhibitor from *Prunus mume* fruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(12), 1970.
- Coker, R.H., Deutz, N.E., Schutzler, S., Beggs, M., Miller, S., Wolfe, R.R., & Wei, J. (2015). Nutritional Supplementation with Essential Amino Acids and Phytosterols May Reduce Risk for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease in Overweight Individuals with Mild Hyperlipidemia. *Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 3(2).
- Day, C.E. (1990). Guar gum reduces serum cholesterol in sea quail fed a cholesterol diet. *Artery*, 18(3), 107-114.
- De Smet, E., Mensink, R.P., & Plat, J. (2012). Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1058-1072. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201100722>
- de Souza, M.O., Silva, M., Silva, M.E., de Paula Oliveira, R., & Pedrosa, M.L. (2010). Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, 26(7), 804-810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.09.007>

- Dixit, V.P., Joshi, S.C., & Jain, P. (1986). Prevention of aortic lesions and hyperlipidaemia by alfalfa seed extract in cholesterol fed rabbit. *Journal of Biosciences*, 10(2), 251-256. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02703483>
- Domínguez, X.A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=YwGStgAACAAJ>
- El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J., & Pihlaja, K. (2006). Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L.(Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sciences*, 78(23), 2724-2733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.010>
- Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 86(5), 484-493. <http://doi.org/10.2183/pjab.86.484>
- Ericsson, C.-G., de Faire, U., Grip, L., Svane, B., Hamsten, A., & Nilsson, J. (2016). Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *The Lancet*, 347(9005), 849-853. <http://doi.org/10.5555/uri:pii:S0140673696913434>
- Ezeigbo, I.I., & Asuzu, I.U. (2012). Anti-diabetic activities of the methanol leaf extracts of *Hymenocardia acida* (tul.) in alloxan-induced diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, 9(2), 204-209. <http://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i2.4>
- Fidan, A.F., & Dündar, Y. (2008). The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 22(5), 348-356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.11.010>
- Fki, I., Sahnoun, Z., & Sayadi, S. (2007). Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 624-631. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0623586>

- Fuhrman, B., Rosenblat, M., Hayek, T., Coleman, R., & Aviram, M. (2000). Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1124-1131.
- Fukushima, M., Nakano, M., Mori, Y., Ohashi, T., Fujiwara, Y., & Sonoyama, K. (2000). Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2151-2156.
- Gebhardt, R. (1991). Inhibition of cholesterol biosynthesis by a water-soluble garlic extract in primary cultures of rat hepatocytes. *Arzneimittel-Forschung*, 41(8), 800-804.
- Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(4), 431-438. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179564>
- Guimarães, P.R., Galvão, A.M.P., Batista, C.M., Azevedo, G.S., Oliveira, R.D., Lamounier, R.P. et al. (2000). Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(9), 1027-1036. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000000900006>
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., & Suthisang, C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 252-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.033>
- INEGI. (2013). INEGI. Consultado el 27 de Abril de 2016, a partir de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=>
- Jahromi, M.A.F., Ray, A.B., & Chansouria, J.P.N. (1993). Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of Natural Products*, 56(7), 989-994. <http://dx.doi.org/10.1021/np50097a001>
- Kakuda, T., Sakane, I., Takihara, T., Ozaki, Y., Takeuchi, H., & Kuroyanagi, M. (1996). Hypoglycemic effect of extracts from *Lagerstroemia speciosa* L. lea-

- ves in genetically diabetic KK-AY mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(2), 204-208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063966>. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60.204>
- Kayashita, J., Shimaoka, I., & Nakajyoh, M. (1995). Hypocholesterolemic effect of buckwheat protein extract in rats fed cholesterol enriched diets. *Nutrition Research*, 15(5), 691-698. [http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00036-I](http://dx.doi.org/10.1016/0271-5317(95)00036-I)
- Khanna, A.K., Chander, R., Singh, C., Srivastava, A.K., & Kapoor, N.K. (1992). Hypolipidemic activity of *Achyranthus aspera* Linn in normal and triton induced hyperlipemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30(2), 128-130.
- Kim, K.-S., Ezaki, O., Ikemoto, S., & Itakura, H. (1995). Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 41(4), 485-491. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.41.485>
- Kim, Y.J., Houg, S.-J., Kim, J.H., Kim, Y.-R., Ji, H.G., & Lee, S.-J. (2012). Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2), 186-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.11.015>
- Knopp, R.H. (2000). Evaluating niacin in its various forms. *The American Journal of Cardiology*, 86(12A), 51L-56L. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149\(00\)01471-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(00)01471-5)
- Kojuri, J., Vosoughi, A.R., & Akrami, M. (2007). Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 1. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-6-5>
- Kumar, V., Anwar, F., Ahmed, D., Verma, A., Ahmed, A., Damanhour, Z.A. et al. (2014). *Paederia foetida* Linn. leaf extract: an antihyperlipidemic, antihyperglycaemic and antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 76. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-76>
- Lam, C.K., Zhang, Z., Yu, H., Tsang, S., Huang, Y., & Chen, Z.Y. (2008). Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(8), 950-958. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700319>

- Lee, S.-Y., Kim, J.-D., Lee, Y.-H., Rhee, H., & Choi, Y.-S. (1991). Influence of extract of *Rosa rugosa* roots on lipid levels in serum and liver of rats. *Life Sciences*, 49(13), 947-951. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90077-O](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(91)90077-O)
- Liu, J.-C., Chan, P., Hsu, F.-L., Chen, Y.-J., Hsieh, M.-H., Lo, M.-Y., & Lin, J.-Y. (2002). The *in vitro* inhibitory effects of crude extracts of traditional Chinese herbs on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase on Vero cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 30(04), 629-636. <http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X02000454>
- Luo, Q.-F., Sun, L., Si, J.-Y., & Chen, D.-H. (2008). Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Phytomedicine*, 15(11), 932-939. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.03.002>
- Mahan, L.K., Escott-Stump, S., & Raymond, J.L. (1998). *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Elsevier.
- Marzouk, M.S., Moharram, F.A., El Dib, R.A., & El-Hossary, D.G. (2013). Novel macrocyclic monoterpene glycosides from bioactive extract of *Parkinsonia aculeata* L. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 65(3), 301-313. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-012-9433-3>
- Matsui, S., Yamane, T., Takita, T., Oishi, Y., & Kobayashi-Hattori, K. (2013). The hypocholesterolemic activity of *Momordica charantia* fruit is mediated by the altered cholesterol-and bile acid-regulating gene expression in rat liver. *Nutrition Research*, 33(7), 580-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2013.05.002>
- Menéndez, R., Más, R., Amor, A.M., Rodeiros, I., Gonzalez, R.M., & Alfonso, J.L. (2001). Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. *Pharmacological Research*, 44(4), 299-304. <http://dx.doi.org/10.1006/phrs.2001.0851>
- Miceli, N., Mondello, M.R., Monforte, M.T., Sdraffakis, V., Dugo, P., Crupi, M.L. et al. (2007). Hypolipidemic effects of *Citrus bergamia* Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemic diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10671-10677. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071772i>

- Miranda-Velasquez, L., Oranday-Cardenas, A., Lozano-Garza, H., Rivas-Morales, C., Chamorro-Cevallos, G., & Cruz-Vega, D.E. (2010). Hypocholesterolemic activity from the leaf extracts of *Cnidocolus chayamansa*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(4), 392-395. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-010-0202-4>
- Mousa-Al-Reza Hadjzadeh, Z.R., Moradi, R., & Ghorbani, A. (2015). Effects of Hydroalcoholic Extract of Watercress (*Nasturtium Officinale*) Leaves on Serum Glucose and Lipid Levels in Diabetic Rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 59(2), 223-230.
- Nakamura, Y., Tsumura, Y., Tonogai, Y., & Shibata, T. (1999). Fecal steroid excretion is increased in rats by oral administration of gymnemic acids contained in *Gymnema sylvestre* leaves. *The Journal of Nutrition*, 129(6), 1214-1222.
- Navarro-González, I., Pérez-Sánchez, H., Martín-Pozuelo, G., García-Alonso, J., & Periago, M.J. (2014). The inhibitory effects of bioactive compounds of tomato juice binding to hepatic HMGCR: *in vivo* study and molecular modelling. *PloS One*, 9(1), e83968. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083968>
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan Higher Education. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=IatLXwAACAAJ>
- O'Connor, F.G., & Deuster, P.A. (2011). *Rhabdomyolysis*. En Goldman, L., & Schafer, A.I. (Eds.) (24th ed.). Philadelphia, Pa: Cecil Medicine.
- Oh, P.-S., Lee, S.-J., & Lim, K.-T. (2006). Hypolipidemic and antioxidative effects of the plant glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* stokes fruit in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(2), 447-456. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70.447>
- Pahua-Ramos, M.E., Ortiz-Moreno, A., Chamorro-Cevallos, G., Hernández-Navarro, M.D., Garduño-Siciliano, L., Necochea-Mondragón, H. et al. (2012). Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 10-16. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-012-0280-6>
- Peluzio, M. do C.G., Teixeira, T.F.S., Oliveira, V.P., Sabarense, C.M., Dias, C.M.G.C., Abranches, M.V., & Maldonado, I. R. dos S.C. (2011). Grape extract

- and  $\alpha$ -Tocopherol effect in cardiovascular disease model of Apo E-/-Mice. *Acta Cirurgica Brasileira*, 26(4), 253-260. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000400002>
- Ram, A., Lauria, P., Gupta, R., Kumar, P., & Sharma, V.N. (1997). Hypocholesterolaemic effects of Terminalia arjuna tree bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(3), 165-169. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01493-6](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01493-6)
- Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Franco-Núñez, A., Villalpando, S., Cuevas-Nasu, L., Gutiérrez, J.P. et al. (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pública de México*, 55, S332-S340.
- Roth, G.A., Fihn, S.D., Mokdad, A.H., Aekplakorn, W., Hasegawa, T., & Lim, S.S. (2011). High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(2), 92-101. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.10.079947>
- Sangkitikomol, W., Rocejanasaroj, A., & Tencomnao, T. (2014). Effect of Moringa oleifera on advanced glycation end-product formation and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 723-735. <http://doi.org/10.4238/2014.January.29.3>
- Santana, M.B., Mandarino, M.G., & Cardoso, J.R. (2008). Association between soy and green tea (Camellia sinensis) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasmatic antioxidant potential in dyslipidemic subjects. *Nutrition*, 24, 562-568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2008.02.007>
- Santos, F.A., Frota, J.T., Arruda, B.R., de Melo, T.S., de Castro Brito, G.A., Chaves, M.H. et al. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from Protium heptaphyllum in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 1. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-11-98>
- Saravanan, S., Srikumar, R., Manikandan, S., Jeya, P.N., & Sheela-Devi, R. (2007). Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats. *Yakugaku Zasshi*, 127(2), 385-388. <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.127.385>

- Sendl, A., Schliack, M., Löser, R., Stanislaus, F., & Wagner, H. (1992). Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic. *Atherosclerosis*, 94(1), 79-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150\(92\)90190-R](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150(92)90190-R)
- Shaila, H.P., Udupa, A.L., & Udupa, S.L. (1995). Preventive actions of Terminalia belerica in experimentally induced atherosclerosis. *International Journal of Cardiology*, 49(2), 101-106. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273\(95\)02285-5](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273(95)02285-5)
- Shigematsu, N., Asano, R., Shimosaka, M., & Okazaki, M. (2001). Effect of administration with the extract of Gymnema sylvestre R. Br leaves on lipid metabolism in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(6), 713-717. <http://doi.org/10.1248/bpb.24.713>
- Son, I.S., Kim, J.H., Sohn, H.Y., Son, K.H., Kim, J.-S., & Kwon, C.-S. (2007). Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12), 3063-3071. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70472>
- Souza, M.O. de, Silva, L., Magalhães, C.L. de B., Figueiredo, B.B. de, Costa, D.C., Silva, M.E. et al. (2012). The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat.
- Surkar, A., Lavania, S.C., Pandey, D.N., & Pant, M.C. (1994). Changes in the blood lipid profile after administration of *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaves in the normal albino rabbits. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 38, 311.
- Taylor, C.L. (2013). FDA Letter Regarding Enforcement Discretion With Respect to Expanded Use of an Interim Health Claim Rule About Plant Sterol/Stanol Esters and Reduced Risk of Coronary Heart Disease. Recuperado en Febrero de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm074779.htm>
- Vogel, P., Machado, I.K., Garavaglia, J., Zani, V.T., de Souza, D., & Morelo, S. D.B. (2015). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutrición Hospitalaria: Organo Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral Y Enteral*, 31(3), 1427-1433.

- Wächtershäuser, A., Akoglu, B., & Stein, J. (2001). HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*, 22(7), 1061-1067. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/22.7.1061>
- Weingärtner, O., Böhm, M., & Laufs, U. (2009). Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, 30(4), 404-409. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn580>
- Wolfram, R.M., Kritz, H., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J., & Sinzinger, H. (2002). Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia—a pilot study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114(19-20), 840-846. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503475>
- Yamamoto, A., Yamamura, T., Yokoyama, S., Sudo, H., & Matsuzawa, Y. (1984). Combined drug therapy--cholestyramine and compactin--for familial hypercholesterolemia. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, 22(9), 493-497.
- Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiya, M., & Kumagai, A. (1983). Serum HDL-cholesterol-increasing and fatty liver-improving actions of Panax ginseng in high cholesterol diet-fed rats with clinical effect on hyperlipidemia in man. *The American Journal of Chinese Medicine*, 11(1-4), 96-101. <http://doi.org/10.1142/S0192415X83000161>
- Yang, Y., Seo, J.M., Nguyen, A., Pham, T.X., Park, H.J., Park, Y. et al. (2011). Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice. *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1611-1617. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.142109>
- Yasuda, A., Natsume, M., Sasaki, K., Baba, S., Nakamura, Y., Kanegae, M. et al. (2008). Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors*, 33(3), 211-223. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520330307>
- Yousaf, S., Butt, M.S., Suleria, H.A.R., & Iqbal, M.J. (2014). The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference

to hyperglycemia and hypercholesterolemia. *Food & Function*, 5(3), 545-556. <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60203f>

Yuan, L., Tu, D., Ye, X., & Wu, J. (2006). Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptis chinensis* franch inflorescence. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(3), 139-144. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-006-0023-7>

Zhang, X.F., & Tan, B.K. (2000). Anti-diabetic property of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(12), 1157-1164.

Zhao, H.L., Harding, S.V, Marinangeli, C.P.F., Kim, Y.S., & Jones, P.J.H. (2008). Hypocholesterolemic and Anti-Obesity Effects of Saponins from *Platycodon grandiflorum* in Hamsters Fed Atherogenic Diets. *Journal of Food Science*, 73(8), H195–H200. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00915.x>

## ACTIVIDAD ANTIUROLÍTICA

---

**Raymundo Alejandro Pérez-Hernández<sup>1</sup>,  
Catalina Rivas-Morales<sup>1</sup>, María Luisa Ramos-Ibarra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Departamento de Salud Pública, División Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

[alex130688@hotmail.com](mailto:alex130688@hotmail.com), [catalina.rivasmr@uanl.com.mx](mailto:catalina.rivasmr@uanl.com.mx),  
[maluisaramos@hotmail.com](mailto:maluisaramos@hotmail.com)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.339>

Pérez-Hernández, R.A., Rivas-Morales, C., & Ramos-Ibarra, M.L. (2016). Actividad antiurolítica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 161-176.

## Resumen

La urolitiasis es una condición en la que se desarrollan cálculos en el sistema urinario y que se manifiesta habitualmente en forma de crisis reiteradas de cólico renal. La formación de un cálculo renal es consecuencia de complejos procesos fisicoquímicos como la nucleación, crecimiento y agregación. El componente principal de la mayoría de los cálculos renales son los cristales de oxalato de calcio. Este padecimiento afecta principalmente a la población de países desarrollados. La franja etaria más afectada es de 20 a 40 años con un predominio mayor en hombres que en mujeres con una alta tasa recidiva. Para el tratamiento de la urolitiasis se dispone de técnicas para la extracción de cálculos renales considerados eficaces. Sin embargo, son procedimientos quirúrgicos costosos; así mismo pueden tener diversos efectos secundarios adversos. Actualmente no se dispone de ningún fármaco eficaz para su tratamiento. Los agentes terapéuticos utilizados son profilácticos y se dirigen principalmente a corregir los trastornos metabólicos subyacentes, pero la evidencia de su eficacia todavía no es convincente, además de que pueden presentar efectos secundarios adversos.

A lo largo de la historia las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas, ya que contienen constituyentes químicos que poseen actividad biológica. Algunas de ellas han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la urolitiasis, por lo que son consideradas una alternativa terapéutica para dicho padecimiento.

Los métodos que se disponen para la investigación de la urolitiasis son modelos *in vitro* que simulan los acontecimientos iniciales en la formación de cálculos renales, siendo empleados principalmente los métodos espectrofotométricos. Sin embargo, estos modelos no comprenden los procesos biológicos que están realmente involucrados en la formación de los cálculos renales. Así mismo, se emplean modelos *in vivo* con ratas que son lo más ampliamente utilizados debido a que existen similitudes considerables con los humanos con respecto a estructura y fisiología del sistema urinario. Estos modelos incluyen la inducción química o la inserción quirúrgica de un cuerpo extraño en vejiga urinaria para la formación de los litos en animales de experimentación y evaluar la dosis efecto del principio bioactivo o fármaco.

## Palabras clave

Urolitiasis, antiurolítica, plantas medicinales, modelos *in vitro* e *in vivo*.

## 6.1. Introducción

La urolitiasis es una condición en la que se desarrollan cálculos en el sistema urinario. La formación inicial de un cristal litiásico y finalmente de un cálculo renal es consecuencia de complejos procesos fisicoquímicos como la nucleación, crecimiento y agregación (Atmani & Khan, 2000). El cálculo se forma cuando la orina se encuentra sobresaturada con respecto a sus constituyentes cristalinos lo cual se puede presentar por diversos mecanismos como: la sobre excreción, alteración de la fuerza iónica, formación de complejos solubles y pH urinario (B. Patel, Patel & Patel, 2011).

La orina es una solución en la que existen sales de calcio, oxalato, ácido úrico, fosfato y cistina. Dependiendo de su concentración, cada sustancia puede alcanzar diversas situaciones en cuanto a su saturación. Cuando éstas están en bajas concentraciones, la orina está infrasaturada; si se incrementa progresivamente la concentración, se alcanza un punto denominado sobresaturación urinaria (González Enguita, 2009). Ésta última, da lugar a la formación de cristales a través de la combinación de los iones en solución para formar una fase sólida, proceso denominado nucleación, que puede ser de dos tipos: homogénea cuando los componentes del cristal se unen entre sí o heterogénea, que consiste en la fijación y orientación de los componentes cristalinos sobre la superficie de otro cristal. Posterior a la nucleación, ocurre el crecimiento del cristal, agregación de otros y finalmente la formación del cálculo (Grases, García-Ferragut & Costa-Bauzá, 1998).

El componente principal de la mayoría de los cálculos renales son los cristales de oxalato de calcio, sin embargo, también pueden estar compuestos de fosfato de calcio, estruvita, ácido úrico, cistina y mixtos (Riella, Meneses da Silva & Correia, 2003).

La urolitiasis es el tercer padecimiento más común del tracto urinario, cuya etiología implica aspectos epidemiológicos, raciales, culturales, geográficos y hereditarios, que está asociado con una alta tasa de recurrencia (Khan, Khan & Gilani, 2012). El factor de riesgo a padecerlo es de 2-5% en Asia, 8- 15% en Europa y América y alrededor del 20% en Medio oriente. Se manifiesta habitualmente en forma de crisis reiteradas de cólico renal provocando dolor en abdomen o ingles así como hematuria en la orina (Rajeshwari, Rajeswari, Jabbirulla & Vardhan, 2013). Es un padecimiento que genera un elevado número de consultas médicas

y de ingresos hospitalarios, de gran repercusión económica y social. El riesgo medio de formación de cálculos a lo largo de la vida oscila entre 10-23% al año, 50% en 5-10 años y 75% en 20 años. Con el riesgo de desarrollar complicaciones importantes y frecuentes, como infección urinaria, sepsis, obstrucción urinaria, anuria o insuficiencia renal aguda y crónica (Khan, Bashir, Khan & Gilani, 2011; Martínez Pérez, 2012).

Actualmente, el tratamiento para la urolitiasis dispone de técnicas consideradas eficaces para la extracción de cálculos renales tales como la litotricia extracorpórea por ondas de choque, ureteroscopía para cálculo y nefrolitotomía percutánea, sin embargo, son procedimientos quirúrgicos costosos, convirtiéndose en una opción para un limitado número de personas. Así mismo, estas técnicas pueden tener diversos efectos secundarios adversos como: hipertensión, insuficiencia renal, hematuria, pancreatitis y fragmentos residuales persistentes que pueden dar lugar a la formación de nuevos cálculos (Hussain et al., 2009; Patel et al., 2011). A pesar del progreso en el estudio de la manifestación biológica y física de la urolitiasis, su mecanismo aún no está claramente comprendido (Coe, Evan, Worcester & Lingeman, 2010) y no se dispone de ningún fármaco eficaz para el tratamiento de dicho padecimiento, especialmente para prevenir su recurrencia (Hess, 2003). Los agentes terapéuticos utilizados actualmente son profilácticos y se dirigen principalmente a corregir los trastornos metabólicos subyacentes, pero la evidencia de su eficacia todavía no es convincente, además de que presentan efectos secundarios adversos (Mattle & Hess, 2005; Moe, Pearle & Sakhaee, 2011).

## 6.2. Urolitiasis

Este padecimiento ha afectado al ser humano a lo largo de la historia (Gürocak & Küpeli, 2006). Se tiene registro de diversos hallazgos arqueológicos, como el papiro de Ebers, en los que se hace referencia al tratamiento de enfermedades del tracto urinario, incluyendo cólico renal y extracción de cálculos (Eknoyan, 2004).

Hipócrates en el siglo IV a.C fue el primer médico en describir la dificultad para orinar que solía presentarse en varones de edad avanzada a causa de cálculos y abscesos renales, a lo que denominó mal de piedra (Gürocak & Küpeli, 2006). En 1901, el arqueólogo Inglés E. Smith encontró una momia egipcia que data del año 4800 a.C con litiasis en vejiga urinaria (López & Hoppe, 2010).

La prevalencia de litiasis en el mundo contemporáneo varía de acuerdo con la población estudiada. Estudios epidemiológicos revelan que afecta principalmente a la población de países desarrollados observándose un aumento significativo en la incidencia y prevalencia en los últimos años (Patel, Patel & Patel, 2011). La franja etaria más afectada es de 20 a 40 años con un predominio mayor en hombres que en mujeres con 12 y 6% respectivamente (Deoda et al., 2012; Gürocak & Küpeli, 2006). Su tasa recidiva es alta. A los 5 años de un primer episodio litiásico, un 50% de los pacientes ha recaído; la mitad de los individuos sufrirán nueva crisis litiásica en un plazo inferior a 5 años, el 60% a los 8 y a los 25 años la cifra puede ser del 90%.

En México se han efectuado pocos estudios epidemiológicos sobre la urolitiasis. Este padecimiento comprende 13% de todas las hospitalizaciones por enfermedad renal en el ámbito nacional en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Otra encuesta nacional efectuada en este mismo instituto reportó una prevalencia de 2.4 casos de urolitiasis/10 000 habitantes derechohabientes y refiere a los estados de Yucatán, Puebla y Quintana Roo como áreas endémicas (Zaidi, Medina-Escobedo, Real-de León & Orozco-Rivadeneira, 2002).

### 6.3. Plantas con actividad antiurolítica

Las plantas medicinales son una alternativa terapéutica, ya que contienen constituyentes químicos que poseen actividades biológicas diversas (Patel et al., 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre el 65-80% de la población mundial de países en desarrollo depende esencialmente de medicina tradicional para la atención primaria de su salud, debido a la pobreza y la falta de acceso a la medicina moderna. Las plantas medicinales son su recurso más abundante, accesible y conocido.

A lo largo de la historia de la humanidad las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas, algunas de ellas han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la urolitiasis (Gürocak & Küpeli, 2006).

En la Tabla 1 se muestra una lista de plantas estudiadas para evaluar la actividad antiurolítica en modelos *in vitro* e *in vivo* así como los resultados obtenidos.

<b>Nombre de la Planta</b>	<b>Método utilizado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
<i>Costus spiralis</i>	<i>In vivo</i>	Posee actividad antiurólítica	(Araújo, Miranda, De Fernandes, Soares & Silva, 2009)
<i>Raphanus sativus</i>	<i>In vivo</i>	Efecto diurético e inhibe la formación de cálculos	(Vargas, Perez, Perez, Zavala, & Perez, 1999)
<i>Herniaria birsuta</i>	<i>In vitro</i>	Favorece la nucleación de cristales	(Atmani & Khan, 2000)
<i>Phyllanthus niruri</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurólítica	(Barros, Schor & Boim, 2003)
<i>Tribulus terrestris</i> y <i>Bergenia ligulata</i>	<i>In vitro</i>	Presentó actividad antiurólítica relevante	(Joshi, Parekh, Joshi & Vaidya, 2005)
<i>Tamarix gallica</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurólítica	(Bensatal & Ouahrani, 2008)
<i>Bergenia ligulata</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Posee actividad antiurólítica	(Bashir & Gilani, 2009)
<i>Trachyspermum ammi</i>	<i>In vivo</i>	Disminuye la formación de cristales	(Kaur, Bijarnia, Singla & Tandon, 2009)
<i>Pinus eldarica</i>	<i>In vivo</i>	Previene la formación de cálculos renales	(Hosseinzadeh, Khooei, Khashayarmanesh & Motamed-Shariaty, 2010)
<i>Rivea hypocrateriformis</i> , <i>Cynodon dactylone</i> y <i>Balanite aegypticae</i>	<i>In vitro</i>	<i>Rivea hypocrateriformis</i> presentó mayor actividad	(Patel, Patel, Makwana, Patel & Brahmhatt, 2010)
<i>Origanum vulgare</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Posee actividad antiurólítica	(Khan et al., 2011)
<i>Celosia argentea</i>	<i>In vitro</i>	Inhibe formación de precipitados de calcio y fosfato.	(Patel et al., 2011)
<i>Tectona grandis</i>	<i>In vitro</i>	Inhibe formación de precipitados de calcio y fosfato.	(Patel et al., 2011)

<b>Nombre de la Planta</b>	<b>Método utilizado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
<i>Boerhaavia diffusa</i>	<i>In vivo</i>	Inhibe la nucleación	(Pareta, Patra, Mazumder & Sasmal, 2011)
<i>Nymphaea odorata</i> y <i>Dolichos lablab</i>	<i>In vitro</i>	Ambos extractos presentan actividad antiurolítica	(Deoda et al., 2012)
<i>Holarrhena antidiysenterica</i>	<i>In vitro e in vivo</i>	Posee actividad antiurolítica	(Khan et al., 2012)
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	<i>In vivo</i>	Posee actividad antiurolítica.	(Laikangbam & Damayanti Devi, 2012)
<i>Solanum xanthocarpum</i>	<i>In vivo</i>	Inhibe la formación de cristales	(Patel, Patel, Vyas, Shah & Gandhi, 2012)
<i>Convolvulus arvensis</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Rajeshwari et al., 2013)
<i>Zea mays</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Rathod, Fitwe, Sarnaik & Kshirsagar, 2013)
<i>Bergenia ciliata</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Saha & Verma, 2013)
<i>Rotula aquatica</i>	<i>In vitro</i>	Inhibe la nucleación y agregación de cristales	(Sasikala, Radha & Vijayakumari, 2013)
<i>Centratherrum anthelminticum</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Galani & Panchal, 2014)
<i>Kalanchoe pinnata</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Phatak & Hendre, 2015)
<i>Parmentiera aculeata</i>	<i>In vivo</i>	Posee actividad antiurolítica.	(Morales-Sánchez, Osuna-Fernández, Brechú-Franco, Laguna-Hernández & Vargas-Solís, 2015)
<i>Berberis trifoliata</i>	<i>In vitro</i>	Posee actividad antiurolítica	(Pérez Hernández et al., 2015)

Tabla 1. Estudio de plantas con Actividad antiurolítica en modelos *in vivo* e *in vitro*.

#### **6.4. Modelos *in vitro* para la evaluación de la actividad antiurolítica**

Los métodos que se disponen para la investigación de la urolitiasis son técnicas realizadas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Los modelos *in vitro* utilizados para este propósito simulan los acontecimientos iniciales en la formación de cálculos renales tales como la nucleación, agregación y crecimiento del cristal (Singh, Patil, Harlalka & Gaud, 2010). Sin embargo, éstos modelos no comprenden las actividades de los inductores e inhibidores endógenos de los cálculos renales y de los procesos biológicos que están realmente involucrados en la formación de éstos.

La cristalización de oxalato de calcio (CaOx) *in vitro* es de importancia fundamental para la investigación en el ámbito de la urolitiasis. Se disponen de diversos métodos experimentales los cuales difieren cualitativa y cuantitativamente en la manera de reproducir los aspectos del sistema renal o del proceso de cristalización (Kavanagh, 2006).

Éstos pueden ir desde experimentos sencillos en soluciones inorgánicas a experimentos con orina que replican algunas características del sistema urinario y pueden ser categorizados por el tipo de procedimiento, por la técnica analítica o por el perfil de supersaturación, que es un factor crucial que rige los aspectos de la cristalización tales como: nucleación, crecimiento y agregación (Hess, 2003).

De los diversos métodos existentes para evaluar la actividad antiurolítica *in vitro* se emplean principalmente los espectrofotométricos que son técnicas basadas en la medición de los cambios en la turbidez debido a la nucleación y agregación de cristales de oxalato de calcio.

#### **6.5. Modelos *in vivo* para la evaluación de la actividad antiurolítica**

La evaluación preclínica de la actividad antiurolítica se lleva a cabo en modelos experimentales que representan el proceso de formación de cálculos renales.

En la evaluación de la actividad antiurolítica, los modelos *in vivo* con ratas son lo más ampliamente utilizados (Basavaraj, Biyani, Browning & Cartledge, 2007; Singh et al., 2010), debido a que existen similitudes considerables con los humanos con respecto a estructura y fisiología del sistema urinario (Basavaraj et al., 2007).

Los modelos para la formación de cálculos incluyen la inducción química o la inserción quirúrgica de un cuerpo extraño en vejiga urinaria de animales de experimentación. La formación de cálculos renales puede ser inducida químicamente en los animales de experimentación mediante la administración oral de etilenglicol, cloruro de amonio, vitamina D3, gluconato de calcio, oxalato de amonio, sulfato de gentamicina o L-hidroxiprolina (Liu, Cao, Zhang, Zhou & Ye, 2007). Éstos productos químicos pueden alterar los procesos bioquímicos conduciendo a la excesiva formación de oxalato en la orina, produciendo la precipitación de sustancias que dan lugar a la formación de los cálculos. Sin embargo inducen un daño renal grave y por lo tanto no representan la enfermedad tal como evoluciona clínicamente (Basavaraj et al., 2007).

Por tal motivo, se consideran los modelos en los cuales se induce la formación de cálculos mediante la inserción de un cuerpo extraño en vejiga urinaria, ya que representan en mejor medida la etiología de la formación de cálculos en los seres humanos (Liu et al., 2007). Este modelo se emplea para estudiar el efecto de sustancias que puedan inhibir el crecimiento de los urolitos preformados y aquellas que aceleran su disolución. Los materiales utilizados son discos de zinc, cristales de oxalato de calcio, discos de plástico y piezas de material quirúrgico no absorbible que pueden implantarse en vejiga urinaria para inducir la litiasis (Singh et al., 2010). El modelo de inserción de discos de zinc es el más utilizado y reportado científicamente (Liu et al., 2007). En este modelo se utilizan discos de zinc de tamaño y peso conocidos que se implantan quirúrgicamente en la vejiga del animal de experimentación. Los animales se recuperan de la cirugía durante un periodo de tres días, posteriormente se inicia el tratamiento con la sustancia en estudio. Al final del periodo del tratamiento establecido, los animales son sacrificados, se extrae el disco de la vejiga y se pesa para determinar la actividad antiurolítica de la sustancia en estudio (Singh et al., 2010).

## 6.6. Conclusión

A lo largo de la historia de la humanidad, las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de patologías diversas, entre ellas la urolitiasis, ya que estas poseen

constituyentes biológicamente activos que han demostrado capacidad de inhibir los procesos involucrados en la litiasis renal.

La evaluación de la actividad antiurolítica de constituyentes fitoquímicos dispone actualmente de diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los modelos *in vitro* utilizados para este propósito simulan los eventos involucrados en la formación de cálculos tales como la nucleación, agregación y crecimiento del cristal. Por otra parte, los modelos *in vivo* disponen de la inducción química de la litiasis y de la inserción de cuerpo extraño. Éstos últimos, presentan varias ventajas fisiológicas que solamente se pueden observar en un organismo íntegro a través de sus tejidos, órganos y sistemas; aunado a factores como temperatura, pH de la orina, agregación de bacterias y de otras sales o desechos metabólicos propios del organismo. Todos estos aspectos indudablemente acercan al investigador mucho más a la realidad del problema de salud que se esté evaluando; así como también la respuesta del tratamiento.

En este trabajo se realizó una revisión en distintas bases de datos sobre reportes que datan del año 1999 hasta 2015 de plantas con actividad antiurolítica. Los estudios que se revisaron fueron llevados a cabo mediante técnicas tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando una extensa diversidad de plantas con uso en la medicina tradicional, tales como *Raphanus sativus*, *Herniaria hirsuta*, *Tamarix gallica*, *Pinus elliottiana*, *Rotula aquatica* por mencionar algunas. Los resultados demuestran que existen plantas pertenecientes a familias diversas con compuestos capaces de inhibir los procesos involucrados en la formación de litiasis, lo que les confiere actividad antiurolítica.

## Referencias

- Araújo, C.R., Miranda, K.C., De Fernandes, O.F.L., Soares, A.J., & Silva, M.D.R.R. (2009). *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(1), 9-12. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652009000100002>
- Atmani, F., & Khan, S.R. (2000). Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. *BJU International*, 85(6), 621-625. <http://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2000.00485.x>

- Barros, M.E., Schor, N., & Boim, M.A. (2003). Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. *Urological Research*, 30(6), 374-379. <http://doi.org/10.1007/s00240-002-0285-y>
- Basavaraj, D.R., Biyani, C.S., Browning, A.J., & Cartledge, J.J. (2007). The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones {A figure is presented}. *EAU-EBU Update Series*, 5(3), 126-136. <http://doi.org/10.1016/j.euus.2007.03.002>
- Bashir, S., & Gilani, A.H. (2009). Antiurolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 106-116. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.004>
- Bensatal, A., & Ouahrani, M.R. (2008). Inhibition of crystallization of calcium oxalate by the extraction of *Tamarix gallica* L. *Urological Research*, 36(6), 283-287. <http://doi.org/10.1007/s00240-008-0157-1>
- Coe, F.L., Evan, A.P., Worcester, E.M., & Lingeman, J.E. (2010). Three pathways for human kidney stone formation. *Urological Research*. <http://doi.org/10.1007/s00240-010-0271-8>
- Deoda, R.S., Pandya, H., Patel, M., Yadav, K.N., Kadam, P.V., & Patil, M.J. (2012). Antilithiatic activity of leaves, bulb and stem of *Nymphaea odorata* and *Dolichos Lablab* beans. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(1), 814-819.
- Eknoyan, G. (2004). History of Urolithiasis An Approach to the History, 2(3), 177-185. <http://doi.org/10.1385/BMM:2:3:177>
- Galani, V.J., & Panchal, R.R. (2014). Invitro Evaluation of *Centratherum antihelminthicum* Seeds for Antinephrolithiatic Activity. *Homeopathy & Ayurvedic Medicine*, 3(1), 3-6. <http://doi.org/10.4172/2167-1206.100014>
- González-Enguita, C. (2009). Litiasis renal. En *Nefrología clínica* (pp. 567-579). Madrid, España: Ed. Panamericana.
- Grases, F., García-Ferragut, L., & Costa-Bauzá, A. (1998). Development of Calcium Oxalate Crystals on Urothelium: Effect of Free Radicals. *Nephron*, 78(3), 296-301. Recuperado de <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000044939>

- Gürocak, S., & Küpeli, B. (2006). Consumption of Historical and Current Phytotherapeutic Agents for Urolithiasis: A Critical Review. *The Journal of Urology*, 176(2), 450-455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2006.03.034>
- Hess, B. (2003). Pathophysiology, diagnosis and conservative therapy in calcium kidney calculi. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique*, 60(2), 79-87. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/MED/12649986>. <http://dx.doi.org/10.1024/0040-5930.60.2.79>
- Hosseinzadeh, H., Khooei, A.R., Khashayarmanesh, Z., & Motamed-Shariaty, V. (2010). Antiurolithiatic activity of *Pinus eldarica* medw. Fruits aqueous extract in rats. *Urology Journal*, 7(4), 232-237.
- Hussain, M., Rizvi, S.A.H., Askari, H., Sultan, G., Lal, M., Ali, B. et al. (2009). Management of stone disease: 17 years experience of a stone clinic in a developing country. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 59(12), 843-846.
- Joshi, V.S., Parekh, B.B., Joshi, M.J., & Vaidya, A.B. (2005). Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals *in vitro*. *Journal of Crystal Growth*, 275(1-2), 1403-1408. <http://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.11.240>
- Kaur, T., Bijarnia, R.K., Singla, S.K., & Tandon, C. (2009). *In vivo* efficacy of *Trachyspermum ammi* anticalcifying protein in urolithiatic rat model. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 459-462. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.015>
- Kavanagh, J.P. (2006). *In vitro* calcium oxalate crystallisation methods. *Urological Research*, 34(2), 139-145. <http://doi.org/10.1007/s00240-005-0027-z>
- Khan, A., Bashir, S., Khan, S. R., & Gilani, A.H. (2011). Antiurolithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 96. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-11-96>
- Khan, A., Khan, S.R., & Gilani, A.H. (2012). Studies on the *in vitro* and *in vivo* antiurolithic activity of *Holarrhena antidysenterica*. *Urological Research*, 40(6), 671-681. <http://doi.org/10.1007/s00240-012-0483-1>

- Laikangbam, R., & Damayanti-Devi, M. (2012). Inhibition of calcium oxalate crystal deposition on kidneys of urolithiatic rats by Hibiscus sabdariffa L. extract. *Urological Research*, 40(3), 211-218. <http://doi.org/10.1007/s00240-011-0433-3>
- Liu, J., Cao, Z., Zhang, Z., Zhou, S., & Ye, Z. (2007). A Comparative Study on Several Models of Experimental Renal Calcium Oxalate Stones Formation in Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 27(1), 83-87. <http://doi.org/10.1007/s>
- López, M., & Hoppe, B. (2010). History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatric Nephrology*, 25(1), 49-59. <http://doi.org/10.1007/s00467-008-0960-5>
- Martínez-Pérez, R. (2012). Revisión del tratamiento farmacológico de la urolitiasis. *Farmacéuticos de Atención Primaria*, 10(1), 18-24. [http://doi.org/10.1016/S2172-3761\(12\)70052-3](http://doi.org/10.1016/S2172-3761(12)70052-3)
- Mattle, D., & Hess, B. (2005). Preventive treatment of nephrolithiasis with alkali citrate—a critical review. *Urological Research*, 33(2), 73-79. <http://doi.org/10.1007/s00240-005-0464-8>
- Moe, O.W., Pearle, M.S., & Sakhaee, K. (2011). Pharmacotherapy of urolithiasis: evidence from clinical trials. *Kidney International*, 79(4), 385-392. <http://doi.org/10.1038/ki.2010.389>
- Morales-Sánchez, V., Osuna-Fernández, H.R., Brechú-Franco, A., Laguna-Hernández, G., & Vargas-Solís, R. (2015). Evaluación del efecto antiurolítico del fruto de Parmentiera aculeata en rata Wistar. *Botanical Sciences*, 93(2), 1-6. <http://doi.org/10.17129/botsci.99>
- Pareta, S.K., Patra, K.C., Mazumder, P.M., & Sasmal, D. (2011). Prophylactic Role of Boerhaavia diffusa in Ethylene Glycol Induced Calcium Oxalate Urolithiasis, 17(2).
- Patel, B.A., Patel, P.U., & Patel, R.K. (2011). *In vitro* evaluation of antilithiatic activity on Tectona grandis Linn seeds. *Journal of Pharmacy Research*, 4(6), 1699–1700.

- Patel, B., Patel, P., & Patel, R. (2011). Effect of different extracts from *Celosia argentea* on calcium and phosphate inhibition *in vitro*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 337-339.
- Patel, P.K., Patel, M.A., Vyas, B.A., Shah, D.R., & Gandhi, T.R. (2012). Anti-urolithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 160-170. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.043>
- Patel, V.B., Patel, D.G., Makwana, A.G., Patel, J.M., & Brahmabhatt, M.R. (2010). Comparative study of *Rivea hypocrateriformis*, *Cynodon dactylone* and *Balanite aegypticae* using antilithiatic activity *in vitro*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(12), 85-87.
- Pérez-Hernández, R.A., Leos-Rivas, C., Oranday-Cárdenas, A., Hernández-Luna, C.E., Sánchez-García, E., & Rivas-Morales, C. (2015). Efecto *in vitro* en la inhibición del proceso de nucleación en litiasis renal, capacidad de captura de radicales libres, actividad antimicrobiana y tóxica del extracto metanólico de *Berberis trifoliata*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 46(1), 70-76.
- Phatak, R.S., & Hendre, A.S. (2015). In-vitro Antiurolithiatic Activity of *Kalanchoe pinnata* Extract, 7(2), 275-279.
- Rajeshwari, P., Rajeshwari, G., Jabbirulla, S.K., & Vardhan, I.V. (2013). Evaluation of invitro anti-urolithiasis activity of *Convolvus arvensis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 599-601.
- Rathod, V.D., Fitwe, P., Sarnaik, D., & Kshirsagar, S.N. (2013). Research Article. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 21(2), 16-19.
- Riella, M.C., Meneses da Silva, J.A., & Correia, M.I.T.D. (2003). Nutrición y litiasis renal. In *Nutrición y riñón* (3a Reimpre, p. 225). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Saha, S., & Verma, R.J. (2013). Inhibition of calcium oxalate crystallisation *in vitro* by an extract of *Bergenia ciliata*. *Arab Journal of Urology*, 11(2), 187-192. <http://doi.org/10.1016/j.aju.2013.04.001>

- Sasikala, V., Radha, S.R., & Vijayakumari, B. (2013). *In vitro* evaluation of rotula aquatica lour. For antiurolithiatic activity. *Journal of Pharmacy Research*, 6(3), 378-382. <http://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.02.026>
- Singh, P.K., Patil, C.R., Harlalka, G.V. & Gaud, N.P. (2010). Zinc disc implantation model of urinary bladder calculi and humane endpoints. *Laboratory Animals*, 44(3), 226-30. <http://doi.org/10.1258/la.2010.009084>
- Vargas, R.S., Perez, R.M. G., Perez, S.G., Zavala, M.A.S., & Perez, C.G. (1999). Antiurolithiatic activity of Raphanus sati 6 us aqueous extract on rats, 68, 335-338.
- Zaidi, M., Medina-Escobedo, M., Real de León, E., & Orozco-Rivadeneira, S. (2002). Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. *Salud Pública de México*, 44(6), 541-545. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342002000600006>



## ACTIVIDAD NEFROPROTECTORA

---

**Paula Cordero-Pérez, Liliana Torres-González,  
Eduardo Cienfuegos-Pecina**

Unidad de Hígado, Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[paucordero@yahoo.com.mx](mailto:paucordero@yahoo.com.mx), [lilitorresgtz@yahoo.com](mailto:lilitorresgtz@yahoo.com),  
[e\\_cienfuegos@hotmail.com](mailto:e_cienfuegos@hotmail.com)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.321>

Cordero-Pérez, P., Torres-González, L., & Cienfuegos-Pecina, E. (2016). Actividad nefroprotectora. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 177-214.

## Resumen

En el área de la investigación y desarrollo de fármacos el estudio etnobotánico es una actividad importante ya que se afirma que aproximadamente 79% de los productos farmacéuticos aprobados de 1981-2010 proceden principalmente de las plantas. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas.

En México, como en la mayor parte del mundo, se ha demostrado un incremento importante en la prevalencia e incidencia de la enfermedad renal crónica. Esta enfermedad se considera una pandemia que afecta aproximadamente al 10% de la población adulta en diferentes partes del mundo. Sin que existan cifras establecidas de incidencia neta de esta enfermedad, de acuerdo con las últimas estadísticas establecidas por el Instituto Mexicano del Seguro Social, se estima una incidencia de pacientes con enfermedad renal crónica de 377 casos por millón de habitantes y prevalencia de 1,142. La terapia con mayor frecuencia de uso es la sustitutiva, aunque un bajo porcentaje de pacientes la recibe. Por ello, se buscan y ensayan diversas estrategias médicas para tratar esta enfermedad y las investigaciones están orientadas principalmente en la obtención nuevas drogas nefroprotectoras e hipoglucemiantes que puedan ayudar al control de la enfermedad. Las investigaciones de plantas para el tratamiento de la enfermedad renal generalmente se realizan en animales de laboratorio con inducción de daño agudo, principalmente a través de compuestos nefrotóxicos o daño por isquemia-reperusión. Sin embargo, pocos estudios clínicos y toxicológicos han sido realizados para evaluar el potencial efecto nefroprotector de las plantas.

En este capítulo se describe la revisión de la búsqueda bibliográfica de plantas con actividad nefroprotectora, la cual fue realizada en libros, artículos en revistas indexadas y no indexadas. Las bases de datos consultadas fueron: PubMed, Medrigraphic, Imbiomed, Scifinder y ScienceDirect, utilizando los siguientes términos: actividad nefroprotectora, actividad renoprotectora, daño renal agudo, plantas nefroprotectoras, plantas isquemia-reperusión, en combinación con extractos de plantas; esto durante el período 1985 a 2015.

Se encontró que los principales inductores de daño renal agudo fueron: gentamicina, cisplatino, nitrilotriacetato de hierro y el daño por isquemia-reperusión.

Estos modelos de daño fueron realizados principalmente en animales de experimentación, utilizando en la mayoría de ellos a ratas y ratones. Los principales mecanismos nefroprotectores descritos fueron la reducción de los niveles séricos de creatinina y de urea, y de los niveles urinarios de proteínas (albúmina y proteínas totales); además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo, tales como el malondialdehído; aunado a una restauración de la actividad de enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido, glutatión peroxidasa, siendo todos estos mediadores evaluados en suero y tejido. Los principales grupos fitoquímicos reportados con actividad nefroprotectora fueron del tipo alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles, glicósidos y terpenos.

### **Palabras clave**

Actividad nefroprotectora de plantas, actividad renoprotectora, daño renal agudo, isquemia-reperfusión.

## 7.1. Introducción

El estudio etnobotánico es una actividad importante en el área de la investigación y desarrollo de fármacos puesto que algunos reportes afirman que aproximadamente 79% de los productos farmacéuticos aprobados de 1981-2010 proceden de fuentes naturales, principalmente de las plantas (Cragg & Newman, 2013). En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente diversos grupos étnicos lo conservan. Desde hace más de 30 años ha surgido la necesidad de integrar las medicinas tradicionales dentro de los sistemas oficiales para mejorar la calidad de vida de los pacientes esto por razones de orden cultural y económico (Huerta, 1997).

Trabajos recientes han descrito que ciertos metabolitos secundarios (aceites esenciales, taninos, flavonoides, entre otros) poseen actividad farmacológica para el tratamiento de cáncer, enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, cardiovasculares y diabetes, entre otras (Noriega-Cisneros et al., 2012).

México posee una rica tradición en el empleo de las plantas medicinales entre sus varias prácticas curativas populares como se describe en el Códice Badiano, es una obra que consta de más de 150 plantas nativas de México y donde se constata su uso medicinal (Valverde, 1984). Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (Huerta, 1997; Lozoya & Symposium, 2008).

## 7.2. Enfermedad renal en México

En México, como en la mayor parte del mundo, se ha demostrado un incremento importante en la prevalencia e incidencia de la enfermedad renal crónica. En el año 2002, la National Kidney Foundation, en las guías K/DOQI, definió a la enfermedad renal crónica como la disminución de la función renal expresada por una TFG menor de 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>SC o como daño renal durante más de tres meses, manifestada en forma directa por alteraciones histológicas en la biopsia renal o en forma indirecta por marcadores de daño renal (National Kidney Foundation, 2002; Papadakis, McPhee & Martínez, 2009). En la actualidad se considera una pandemia que afecta, aproximadamente, al 10% de la población adulta en diferentes partes del mundo (National Kidney Foundation, 2002). Sin que existan cifras establecidas de incidencia neta de esta enfermedad, de acuerdo con las últimas estadísticas establecidas por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se estima una incidencia

de pacientes con enfermedad renal crónica de 377 casos por millón de habitantes y prevalencia de 1,142. En la actualidad existen alrededor de 52,000 pacientes en terapias sustitutivas, de los que 80% se atienden en esta institución (Martínez-Ramírez, Cueto-Manzano, Rojas-Campos & Cortés-Sanabria, 2011; Méndez-Durán, Méndez-Bueno, Tapia-Yáñez, Montes & Aguilar-Sánchez, 2010). Se registró un incremento de 92 pacientes por millón de habitantes (ppmh) en 1999 a 400 ppmh en el año 2008. La principal causa de enfermedad crónica en México es la diabetes mellitus. La Secretaría de Salud informó en 2009, que sólo 22% de los pacientes que requieren terapia de reemplazo renal en realidad la reciben (National Kidney Foundation, 2002).

En la actualidad se buscan y ensayan diversas estrategias médicas, mediante una combinación de la dieta, educación, ejercicio físico, inmunoterapia e incluso trasplante renal y pancreático; no obstante, la investigación está orientada principalmente en la obtención nuevas drogas nefroprotectoras e hipoglucemiantes que puedan ayudar al control de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro país como en otros países con un nivel socioeconómico semejante, un sector amplio de la población no tiene acceso a estos modernos esquemas de tratamiento, por las limitaciones económicas, surgiendo entonces la fitoterapia o medicina natural como una alternativa al tener la ventaja de ser más económica (Hunt, Arar & Akana, 2000)

Las investigaciones de plantas para el tratamiento de la enfermedad renal generalmente se realizan en animales de laboratorio con inducción de daño agudo, principalmente a través compuesto neurotóxicos o daño por isquemia-reperusión. Sin embargo, pocos estudios clínicos y toxicológicos han sido realizados para evaluar el potencial efecto nefroprotector de las plantas.

En este capítulo se describe la revisión de la búsqueda bibliográfica que fue realizada en libros, en artículos de revistas indexadas y no indexadas. La búsqueda se realizó en las siguientes bases de datos: PubMed, Medtrigraphic, Imbiomed, Scifinder y ScienceDirect, utilizando los siguientes términos: actividad nefroprotectora, actividad renoprotectora, daño renal agudo, plantas nefroprotectoras, plantas isquemia-reperusión, en combinación con extractos de plantas; esto durante el período 1985 a 2015.

### **7.3. Plantas estudiadas con actividad nefroprotectora**

En la Tabla 1 se agrupan las publicaciones científicas de plantas estudiadas por más de dos décadas, para evaluar la actividad nefroprotectora en modelos *in vivo*, las dosis utilizadas, las determinaciones realizadas, así como los resultados obtenidos.

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Achyrocline satureioides</i> (Compositae)	Extracto hidroalcohólico de hojas y tallo (400 mg/kg cada uno) v.o.	Diuresis renal por 5% de agua v.o. medición cada 20 min hasta 2 h.	Orina Sodio: Valores normales Potasio: Valores normales	(Rocha et al., 1994)
<i>Alisma orientalis</i> (Alismataceae)	Extracto diferencial con acetato de etilo, 5 mL/kg/d v.o. por 4 sem	Urolitiasis por etilenglicol al 1% y vitamina 1-alfa-hidroxi-D3 v.o en ratas Wistar	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓ Orina de 24h: Calcio y oxalatos ↓ Tejido renal: Oxalato de Calcio ↓ RNAm de osteopontina ↓	(Mi et al., 2005)
<i>Alisma orientalis</i> (Alismataceae)	Extracto hidroalcohólico, 1 mL/kg/d v.o. por 28 d	Urolitiasis por etilenglicol al 1% y cloruro de amonio al 2% v.o. en ratas Wistar	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓ Orina de 24h: Calcio y oxalatos ↓ Tejido renal: Oxalato de Calcio ↓ RNAm de bikunina ↓	(Cao et al., 2004)
<i>Allium paradoxum</i> (Amaryllidaceae)	Extracto con metanol: agua (80:20) de parte aérea a dosis 200 mg/kg/d/10 d i.p.	Gentamicina 200 mg/k/d i.p./8 d a ratones NMRI.	Plasma: Urea ↓, Creatinina ↓	(S. F. Nabavi et al., 2012)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Extracto oleoso a dosis de 100 mg/kg/d/una sem	Nitritotriacetato de Hierro (Fe-NTA) a 9 mg Fe/kg en ratas Wistar.	Sero: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: Peroxidación de lípidos ↓, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , GSH ↑, GSH reductasa ↑, GSH-S-transferasa ↑, G6PDH ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑	(Iqbal & Athar, 1998)
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Extracto acuoso a dosis de 1 mL/kg/dos ocasiones	Nefrectomía derecha y al día 15 isquemia por 45 min y 6 h de reperusión en ratas Wistar.	Sero: BUN ↓, Creatinina ↓ Tejido: E.R.O. ↓, MDA ↓, GSH ↑, MPO ↓ Colágeno tisular ↓	(Kabasakal et al., 2005)
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Extracto de ajo añejo a dosis 1.2 mL/cada 12 h/6 d	Gentamicina 70 mg/Kg/cada 12 h/4 d en ratas Wistar.	Sero: BUN ↓, Creatinina ↓, NAG ↓ Orina: Volumen urinario ↓ Proteínas en orina ↓ Tejido renal: SOD ↑, CAT N.S., GSH peroxidasa ↑, GSH reductasa ↑	(Maldonado et al., 2003)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Dieta 2% ajo/6 d	Gentamicina 75 mg/kg/cada 12 h/6 d en ratas Wistar.	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓ Orina: N-acetil-β-D-glucosaminidasa ↓ Tejido renal: MDA ↓, SOD ↑, GSH peroxidasa ↑, CAT.N.S.	(Pedraza-Chaverri et al., 2000)
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Extracto acuoso 125 mg/kg	Naftaleno en ratones Balb/c.	Suero: AST ↓, ALT ↓, BUN ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: GSH ↑, MDA ↓, MPO ↓ Colágeno tisular ↓	(Omurtag et al., 2005)
<i>Boerhaavia diffusa</i> (Nyctaginaceae)	Extracto metanólico de raíz, 2 mL/kg/d por 15 d	Pielonefritis aguda por inoculación de <i>Escherichia coli</i> en niño de ratas Wistar	Orina: Conteo bacteriano ↓ Tejido: Formación de abscesos ↓, Disminución de cambios inflamatorios	(Singh et al., 1988)
<i>Brassica nigra</i> (Brassicaceae)	Extracto metanólico de hojas, 200 y 400 mg/kg v.o. por 2/d	D-galactosamina a 500 mg/kg v.i. por 24 h en ratas Wistar	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico ↓ Tejido renal: SOD ↑, MDA ↓, GSH peroxidasa ↑, GSH ↑, MPO ↓, ACP ↓, Catepsina D ↓ Reducción de la degeneración de las células tubulares epiteliales	(Rajamurugan et al., 2012)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Butea monosperma</i> (Fabaceae)	Extracto etanólico de planta completa, 200 y 400 mg/kg v.o. por 8 d	Gentamicina a 100 mg/kg i.p. por 8 d	Extracto: Fitoquímico: Flavonoides, fenoles y alcaloides Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, BUN ↓ Orina: Creatinina ↓ Tejido renal: Disminución de la lesión del lumen tubular	(Sonkar et al., 2014)
<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	Extracto acuoso y metanólico de hojas (300 mg/Kg/7 d) v.o.	Gentamicina (80 mg/kg) i.p. en conejos blancos de Nueva Zelanda.	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Anwar Ibrahim & Noman Albadani, 2014)
<i>Caria papaya</i> Linn (Caricaceae)	Extracto acuoso a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg/7 d	CCl <sub>4</sub> 20% en aceite de oliva i.p. a dosis de 1.5 mL/kg en ratas Wistar.	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico ↓	(Olajunju et al., 2009)
<i>Cassia auriculata</i> (Fabaceae)	Extracto etanólico a dosis 600 mg/kg/10 d	Cisplatino 5 mg/kg i.p. o gentamicina subcutánea 40 mg/Kg/d por 13 d en ratas Wistar.	Extracto Captura de NO + Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: Disminución de daño tisular	(Annie, Rajagopal, & Malini, 2005)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Cassia fistula</i> (Fabaceae)	Extracto hidroalcohólico de fruto, 200, 400, 600 y 800 mg/kg v.o. por 10 d	Bromobenceno (460 mg/kg) en ratón albino v.o. 2 h después del extracto	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: Disminución de necrosis	(Kalantari et al., 2011)
<i>Ceratonia siliqua</i> (Leguminosae)	Extracto etanólico a dosis de 100 y 200 mg/kg oral una h antes, 24 h y 48 h después de cisplatino.	Cisplatino 10 mg/Kg vía i.p. dosis única en ratón albino.	Plasma: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: GSH ↑ CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, MDA ↓, GSH transferasa ↑, Catepsina D ↓, Fosfatasa ácida ↓, DNasa II ↓, RNasa II ↓	(Ahmed, 2010)
<i>Ceratonia siliqua</i> (Leguminosae)	Extracto de acetato de etilo (250 mg/kg) v.i. por 8 d	CCl <sub>4</sub> (1 ml/kg) v.o. por 24 h en ratas Wistar	Extracto Flavonoides totales: 193.3 mg equivalentes de quercetina/g DPPH: IC <sub>50</sub> 1.8 mg/mL HPLC/MS: fenoles, flavonoles, flavonol glicosilado, iso flavona Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: CAT Valores normales GSH peroxidasa Valores normales SOD Valores normales MDA ↓, Observación de tejido normal	(Hsouma et al., 2014)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Citharexylum spinosum</i> (Verbenaceae)	Extracto de cloroformo de las hojas, 100 y 200 mg/kg/d por 2 sem	CCl <sub>4</sub> (2 ml/kg/día) i.p. por 2 sem y sacrificio 24 h después de la última dosis	Extracto Fitoquímico: Fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides, saponinas. Contenido total de flavonoides: 127 mg equivalentes de rutina/g Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, Urobilinogeno ↓, Nitrito ↓ Orina: Depuración de creatinina ↑ Proteínas ↓, Albúmina ↓ Tejido renal: CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, SOD ↑, GSH ↑, MDA ↓ Tejido normal de riñon	(Khan & Siddique, 2012)
<i>Clerodendron tibotomum</i> (Lamiaceae)	Extracto acuoso, 0.1 y 0.5 g/kg i.v, flujo de 1 mL/min medido cada 15 min hasta 75 min	Daño por 5% de fenol en etanol en ratas Sprague-Dawley y perros	Tejido renal: Tasa de filtración glomerular ↑, Presión sanguínea ↓ Orina: Excreción de sodio ↑	(Lu, Miura, Yukimura, & Yamamoto, 1994)
<i>Coptidis japonica</i> (Ranunculaceae)	Extracto acuoso a dosis 62.5 y 125 mg/kg/d/ 10 o 30 d	Isquemia bilateral renal/60 min y reperusión/6 y 24 h a ratas Wistar.	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, MDA ↓ Tejido renal: GSH ↑, GSH oxidasa ↓, SOD ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa N.S.	(Cho, Yokozawa, Rhee, & Park, 2004)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Costus afer</i> (Costaceae)	Extracto acuoso de hojas, 375, 750 y 1125 mg/kg/d por 7 d	Nefrotoxicidad por gentamicina 90 mg/kg/d i.p. por 7 d.	Extracto Análisis fitoquímico: Alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles, glicósidos y terpenos. Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, Sodio ↓, Potasio ↑ Tejido renal: Disminución del daño	(Ezejiyor, Onish, & Orisakwe, 2014)
<i>Crataeva nurvala</i> (Cappariaceae)	Extracto acuoso de corteza, 80 mg/kg por 10 d	Urolitiasis por glicolato v.o. por 40 d en ratas Wistar	Orina: Excreción de sodio ↑ Excreción de magnesio ↓ Tejido renal: Calcio ↓, Fósforo ↓, Oxalato ↓	(Varalakshmi, Shamila, & Latha, 1990)
<i>Crocos sativus</i> L. (Iridaceae)	Extracto acuoso a dosis 50, 200 y 400 mg/kg/d	Isquemia renal izquierda/60 min, y 90 min. Reperusión en ratas Wistar.	Extracto FRAP ↑ Medición de sulfhidrilos totales ↑ Tejido renal: MDA ↓	(Hosseinzadeh, Sadeghnia, Ziaee, & Danaee, 2005)
<i>Croton zambesicus</i> (Euphorbiaceae)	Extracto etanólico de raíz, 27, 54 y 81 mg/kg v.o. por 8 d	Nefrotoxicidad por gentamicina 100 mg/kg i.p. por 8 d en ratas Wistar	Suero: Creatinina ↓ Dependiente de dosis Urea ↓ Dependiente de dosis Ácido úrico N.S., Sodio N.S., Potasio N.S., Cloro N.S. Tejido renal: Reducción de la degeneración glomerular, del infiltrado inflamatorio celular, de la dilatación de capilares	(Okokon, Nwafor, & Noah, 2011)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Cupressus macrocarpa</i> (Cupressaceae)	Extracto de Cupresulflavona, 40, 80 y 160 mg/kg v.o. por 5 d	CCl <sub>4</sub> a 0.5 mL/kg i.p. en ratas albino Swiss, evaluado a las 24 h	Suero: Creatinina ↓, Urea ↓, Ácido úrico ↓ Tejido renal: SOD ↑, GSH ↑, MD ↓ Reducción de la agregación de células inflamatorias en túbulos y degeneración de las células tubulares	(Khattab, Massoud, Jad, Bekhit, & El-Faham, 2015)
<i>Dioscorea alata</i> (Dioscoreaceae)	Extracto acuoso a dosis de 1000 mg/kg	Etanol 5000 mg/kg i.p. en ratas Wistar.	Suero: ALT ↓, AST ↓, GGT ↓, BUN ↓, Creatinina ↓	(Lee et al., 2002)
<i>Diospyros lotus</i> (Ebenaceae)	Extracto acuoso, 250 mg/kg i.p. por 8 d	Nefrotoxicidad por gentamicina, 100 mg/kg/d i.p. por 8 d en ratón albino NMRI.	Extracto DPPH: IC <sub>50</sub> 13.3±0.05 mg/mL Quelante de ion hierro IC <sub>50</sub> : 42±2.54 mg/mL, Quelante del ON IC <sub>50</sub> : 160.25±6.61 mg/mL Suero: BUN ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico N.S., Sodio N.S, Potasio N.S.	(Nabavi et al., 2012)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Elaeocarpus ganitrus</i> (Elaeocarpaceae)	Extracto etanólico de semillas, 100, 200 y 400 mg/kg/6 d v.o. con gentamicina	Gentamicina 100 mg/kg i.p. por 6 d en ratas Wistar, 24 h de última dosis sacrificio	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓, Albúmina ↑ Ácido úrico ↓ Orina: Albúmina ↓, Ácido úrico ↑ Tejido renal: SOD ↑, GSH ↑, CAT ↑ Incremento del índice fagocítico y adhesión neutrofílica.	(Kakali, Alla, Kshirsagar, Kumar, & Mutha, 2014) Kakali, et al., 2014
<i>Erycibe obtusifolia</i> (Convolvulaceae)	Extracto acuoso a dosis 10, 20 y 30 mg/kg i.p.	No se realizó daño renal a ratones cepa ICR.	Tejido renal: MDA N.S.	(Hsu, Chen, Yang, & Lin, 1999)
<i>Eugenia jambolana</i> (Myrtaceae)	Extracto acuoso (200 mg) por 40 d	Estreptozotocina a dosis de 150 mg/Kg i.p. en ratones albinos	Orina: Albúmina ↓, Volumen urinario ↓ Suero: Creatinina N.S.	(Grover, Vats, Rathi, & Dawar, 2001)
<i>Fragopyrum esculentum</i> (Polygonaceae)	Extracto acuoso a dosis 100 y 200 mg/kg/d	Heminefrectomía derecha, e isquemia de la arteria renal izquierda/45 min en ratas Wistar.	Tejido renal: SOD ↑, GSH-peroxidasa ↑, CAT ↑ Suero: MDA ↓, BUN ↓, Creatinina ↓	(Yokozawa, Fujii, Kosuna, & Nonaka, 2001)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Ficus racemosa</i> (Moraceae)	Extracto metanólico a dosis 200 y 400 mg/Kg/5 d (estrés oxidativo) y 2 veces/sem/16 sem (Carcinogénesis)	[ <sup>3</sup> H]timidina y 9 mg Fe/kg de Fe-NTA i.p. (estrés oxidativo). Dietilnitrosamina (DEN) 200 mg/kg dosis única y 9 mg Fe/kg de Fe-NTA/2 veces /sem/16 sem. (Carcinogénesis).	Tejido renal: GSH ↑, GSH-S-transferasa ↑, GSH reductasa ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, G6PDH ↑, Quinona reductasa ↑, Xantina oxidasa ↓, MDA ↓, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓, GGT ↓ Carcinogénesis ↓ Incorporación de [ <sup>3</sup> H]timidina ↓ Suero, BUN ↓, Creatinina ↓	(N. Khan & Sultana, 2005a)
<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	Extracto a dosis 50 mg/kg	Heminefrectomía derecha/reposo/ 2 sem. e isquemia renal/45 min. y 6 h de reperusión en ratas Wistar.	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓, TNF-α ↓, LDH ↓ Tejido renal: MDA ↓, GSH ↑, MPO ↓ Especies reactivas de oxígeno ↓ Colágeno tisular ↓	(Şener et al., 2005)
<i>Glycine max</i> (Fabaceae)	Dieta 20% de soya	Puromicín aminonucleósido a dosis de 50, 40, 40 y 25 mg/Kg/6 sem. i.v. en las semanas 0, 2, 4 y 6 respectivamente en ratas Wistar.	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓, Colesterol ↓ Orina: Proteínas totales ↓ Tejido renal: CAT NS, GSH-peroxidasa NS, SOD NS.	(Pedraza-Chaverri et al., 2004)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Harungana madagascariensis</i> (Hypericaceae)	Extracto a dosis 100, 200 y 500 mg/kg	Acetaminofén 800 mg/kg/24 h (aguda) y por 14 d (repetida) en ratas Wistar.	Suero (ambas dosis): BUN ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico ↓ Tejido renal: preservación de los glomérulos y la cápsula de Bowman circundante y túbulos ligeramente hinchados	(A. A. Adeneye et al., 2008)
<i>Heliotropium eichmulli</i> (Boraginaceae)	Extracto metanólico, 200 y 400 mg/kg/d v.o. por 7 d, al 4 d se indujo nefrotoxicidad	Cisplatino única dosis de 16 mg/kg i.p. en ratón albino Swiss y 72 h después sacrificio	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: MDA ↓, SOD ↑, CAT ↑ Histología: Necrosis tubular ↓	(Sharma & Goyal, 2012)
<i>Hemidesmus indicus</i> (Apocynaceae)	Extracto acuoso a dosis 90 mg/kg/d	Sulfato de gentamicina 90 mg/kg i.m. /6 d y el séptimo se administró el extracto en ratas Wistar.	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓, GGT ↓, Potasio N.S., Sodio N.S., Cloro N.S., AST ↓, ALT ↓, FA ↓, Bilirrubina N.S., Albumina: N.S. Colesterol ↓, Triglicéridos ↓ Orina: Proteínas totales ↓	(Kotnis, Patel, Menon, & Sane, 2004)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Hibiscus sabdariffa</i> (Malvaceae)	Extracto acuoso y metanólico (250 mg/Kg/7d) v.o.	Gentamicina (80 mg/kg) v.i. en conejos blancos de Nueva Zelanda.	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ No inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Anwar Ibrahim & Noman Albadani, 2014)
<i>Hypophila spinosa</i> (Acanthaceae)	Extracto metanólico de planta completa, 250 y 500 mg/kg v.o. por 10 d y posterior daño con cisplatino	Cisplatino a una sola dosis de 7.5 mg/kg v.i. en ratas Wistar, 72 h después sacrificio.	Extracto Análisis fitoquímico: Fenoles, esteroides, alcaloides, flavonoides, triterpenos Suero: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: GSH ↑, SOD ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, MDA ↓ Disminución de Necrosis tubular	(Ingale, Thakurdesai, & Vyawahare, 2013)
<i>Juglans sinensis</i> (Juglandaceae)	Extracto acuoso a dosis 0.1 g/Kg/d/ 7 d	Cloruro de mercurio 10 mg/Kg s.c. en conejos Nueva Zelanda.	Función renal: Tasa de filtración glomerular ↑, Creatinina sérica ↓, Sodio en orina ↓ Función antioxidante Producción de MDA ↓	(Ahn, Song, Kim, & Kim, 2002)
<i>Leea asiatica</i> (Vitaceae)	Extracto metanólico de planta completa, 150 y 300 mg/kg v.o. por 5 d	Cisplatino, 20 mg/kg v.i. en ratas albino Wistar, 24 h después sacrificio	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico ↓, Albúmina ↑, Proteínas totales ↑ Tejido renal: MDA ↓	(Sen, De, Devanna, & Chakraborty, 2013)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Mentha piperita</i> (Lamiaceae)	Extracto etanólico de hojas, 200 mg/kg/d v.o. por 21 d.	Gentamicina 80 mg/kg v.i.m. en conejos por 21 d.	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓, Ácido úrico ↓, Sodio N.S., Potasio ↑, Calcio ↑ Orina: Volumen ↑, Creatinina ↑, Proteínas ↓, FA ↑, LDH ↓ del daño renal inducido por gentamicina	(Ullah, Khan, Khan, Asif, & Ahmad, 2014)
<i>Mercurialis perfoliata</i> (Mercuriales)	Extracto acuoso a dosis 50 mg/kg	Isquemia renal izquierda/45 min. en ratas Sprague-Dawley.	Tasa de producción de orina ↓ Tasa de filtración glomerular ↓ Relación orina/plasma de inulina N.S.	(Tunón, Bohlin, & Öjteg, 1994)
<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	Extracto acuoso (200 mg)	Estreptozotocina a dosis de 150 mg/Kg i.p. en ratones albinos	Orina: Albúmina ↓, Volumen urinario ↓ Suero: Creatinina N.S.	(Grover et al., 2001)
<i>Momordica grosvenori</i> (Cucurbitaceae)	Extracto acuoso del fruto, 150 mg/kg/d y 300 mg/kg/d por 8 sem.	Alloxan (200 mg/kg) v.i. en ratones macho Balb/c	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓ Tejido renal: MDA ↓, GSH ↑, Mn-SOD ↑, GSH-peroxidasa N.S., HO-1 ↑, RNAm HO-1 ↑, RNAm Mn-SOD ↑ Estructuras renales similares a los ratones no diabéticos.	(Song et al., 2007)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Moringa oleifera</i> (Moringaceae)	Extracto hidroalcohólico de las hojas, 150 y 300 mg/kg/d i.p. por 10 d	Gentamicina (80 mg/kg/día) i.p. por 10 d	Suero: (dosis 150 y 300 mg/kg) Creatinina ↓, Urea ↓ Tejido renal: MDA ↓ 150 mg/kg Disminuyó la necrosis tubular (+) 300 mg/kg Disminuyó la necrosis tubular (++)	(Quebrao et al., 2013)
<i>Mucuna pruriens</i> (Fabaceae)	Extracto etanólico (200 mg) por 40 d	Estreptozotocina a dosis de 150 mg/Kg i.p. en ratones albinos	Orina: Albúmina ↓, Volumen urinario ↓ Suero: Creatinina N.S.	(Grover et al., 2001)
<i>Murraya koenigii</i> (Rutaceae)	Extracto acuoso de hojas, 200 mg/kg/d y 400 mg/kg/d v.o. por 30 d.	Estreptozotocina (70 mg/kg) i.p. en ratas Sprague-Dawley	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓ Plasma: Poder antioxidante reductor de hierro ↑ Glóbulos rojos: GSH peroxidasa ↓ Tejido renal: Regeneración de la expansión de la matriz mesengial y de la membrana basal glomerular	(Yankuzo, Ahmed, Santosa, Akter, & Talib, 2011)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Nigella sativa</i> (Ranunculaceae)	Extracto oleoso a dosis de 0.5, 1 y 2 mL/Kg/d	Gentamicina 80 mg/kg/d i.m. en Ratas Wistar.	Plasma: Urea ↓, Creatinina ↓ Tejido renal: GSH ↑ Nivel antioxidante total ↑	(Ali, 2004)
<i>Nymphaea alba</i> (Nymphaeaceae)	Extracto metanólico a dosis de 100 y 200 mg/kg/d por 5 d	Nitritriacetato de hierro (Fe-NTA), 9 mg/kg de Fe) en ratas Wistar (estrés oxidativo) Dietilnitrosamina 200 mg/kg y 9 mg Fe/kg de Fe-NTA i.m./ 2 veces a la sem/ 16 sem en ratas Wistar (Modelo de carcinógenesis)	Enzimas tisulares: GSH ↑, GSH-S-transferasa ↑, GSH reductasa ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, G6PDH ↑, Quinona reductasa ↑, Xantina oxidasa ↓, MDA ↓, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓, GGT ↓, Carcinógenesis ↓, Incorporación de [ <sup>3</sup> H]timidina ↓ Suero: BUN ↓, Creatinina ↓	(N. Khan & Sultana, 2005b)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Parmychnia argentea</i> (Illecebraceae)	Extracto butanólico (10 y 20 mg/kg/d) y acuoso (250 y 500 mg/kg/d) de la parte aérea, por 28 d.	Litiasis por oxalato de sodio (7 mg/100 mg) i.p. en ratas Wistar Albino y evaluación de cristales urinarios después de 6 h	Sero: Urea: valores normales con extracto butanólico y solo a dosis de 500 mg/kg con extracto acuoso Ácido úrico N.S., Creatinina N.S., Magnesio N.S., Calcio N.S., Potasio ↓ en todos los tratamientos, solo con extracto acuoso restauración a valores normales, Sodio N.S. Tejido renal: No hubo depósitos de cristales, disminución de necrosis y poco depósito de basófilos.	(Bouamani, Henchiri, Migianu-Griffoni, Aouf, & Lecouvey, 2010)
<i>Petalium murex</i> (Pedaliaceae)	Extracto etanólico a dosis de 250 mg/kg	Cisplatino 5mg/kg en ratas Wistar.	Sero: BUN ↓, Creatinina ↓	(Shelke et al., 2009)
<i>Peltiphyllum peltatum</i> (Saxifragaceae)	Extracto metanólico, 10 y 20 mg/Kg i.p. por 7 d antes de la intoxicación	Fluoruro de sodio (600 ppm./7 d) en ratas Wistar	Sero Urea ↓, Creatinina ↓, BUN ↓, Ácido úrico ↓, Calcio ↓, Fosfatos ↓ Tejido renal: MDA ↓, CAT ↑, SOD Retorno a nivel normal a dosis de 20 mg/kg GSH ↑	(Nabavi et al., 2013)

Continúa

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Phoenix dactylifera</i> (Arecaceae)	Extracto acuoso de fruto, 4 mL/kg/d v.o. por 30 d	Ácido dicloroacético en agua <i>ad-libitum</i> , 0.5 y 2 g/L por 2 meses en ratas Wistar	Extracto DPPH: Fuerte actividad antioxidante HPLC: 20 compuestos fenólicos y un flavonoide Plasma: Urea ↓, Creatinina ↓ Ácido úrico ↓ Tejido renal: MDA ↓, CAT ↑, SOD Retorno a nivel normal, GSH peroxidasa Retorno a nivel normal, GSH Retorno a nivel normal Reducción del daño en glomérulo y capsula de Bowman	(A. F. Ahmed et al., 2015)
<i>Phyllanthus amarus</i> (Euphorbiaceae)	Extracto acuoso de la parte aérea, a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg/d v.o. 1 h antes del daño por 14 d	Acetaminofen (200 mg/kg/d) i.p. por 14 d Gentamicina (40 mg/kg/d) i.p. por 14 d	Acetaminofen + Dosis de extracto Suero: Creatinina ↓ dosis dependiente BUN ↓ dosis dependiente Tejido renal: Disminuyo la tubulonefritis y la infiltración linfocitaria Gentamicina + Dosis de extracto Suero: Creatinina ↓ dosis dependiente BUN ↓ dosis dependiente Tejido renal: Disminuyo la proliferación mesengial global y la reducción de la capsula de Bowman's	(Adejuwon Adewale Adeneye & Benebo, 2008)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Piper cubeba</i> (Piperaceae)	Fruto seco a dosis de 810, 1220 mg/kg/d v.o. por 14 d pre y post-daño	Gentamicina (80 mg/kg/d) i.m. por 7 d	Suero: (Pre y post-daño a ambas dosis) Creatinina ↓, Urea ↓ La mayor reducción se observó con pre-tratamiento a las dosis evaluadas Tejido renal: (Pre y post-daño a ambas dosis) Disminución de degeneración tubular epitelial y de evidencia de descamación tubular epitelial La mayor disminución de las lesiones se observó con pre-tratamiento a las dosis evaluadas	(Ahmad, Jahan, & Ahmad, 2012)
<i>Portulaca pilosa</i> (Portulacaceae)	Extracto hidroalcohólico de hojas y tallo (400 mg/kg cada uno) v.o.	Diuresis renal por 5% de agua v.o. medición cada 20 min hasta 2 h.	Orina: Sodio valores normales, Potasio ↑	(Rocha et al., 1994)
<i>Pueraria tuberosa</i> (Fabaceae)	Fracción polar de tubérculos de la planta, 1, 2 y 4 g de polvo en 18 g de biscocho	Cisplatino i.p. 8 mg/kg por 72 h	Suero: (dosis de 4g) Creatinina ↓, BUN ↓ Tejido renal: (dosis de 4 g) MDA ↓, SOD ↓, GSH ↑	(Tripathi, Nagwani, Mishra, Jha, & Rai, 2012)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Punica granatum</i> (Lythraceae)	Extracto diferencial con acetato de etilo de hojas, 50, 100 y 200 mg/kg v.o. por 28 d	Estreptozotocina 65 mg/kg i.p. en ratas Wistar	A dosis de 100 y 200 mg/kg Suero: Creatinina ↓, BUN ↓, Urea ↓, Proteínas totales ↑ Orina: Proteínas totales ↓, Tasa de filtración glomerular ↑, Albúmina ↓ Tejido renal: CAT ↓, SOD ↓, GSH ↑ Disminuye la progresión de glomerulosclerosis, dilatación tubular e infiltración celular	(Ankita, Deepthi, & Nilam, 2015)
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Scrophulariaceae)	Extracto acuoso de las raíces a dosis de 200 mg/kg/d	Isquemia renal bilateral por 45 min en ratas Sprague-Dawley	Orina: Tasa de excreción de orina ↓, Sodio ↑, Potasio N.S., Cloro N.S., Osmolaridad ↑, TH <sub>2</sub> O: ↑, Aclaramiento de la creatinina ↑ Tejido renal: AQP-2 ↑, Na,K-ATPasa ↑, Subunidades α <sub>1</sub> y β <sub>1</sub> de la HO-1 ↓	(Kang, Sohn, Moon, Lee, & Lee, 2005)
<i>Tecoma stans</i> (Bignoniaceae)	Extracto de acetato de etilo a partir de las flores, 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg por 8 d.	Gentamicina (80 mg/kg/día) i.p. en ratas albino	Suero: (todas las dosis) Creatinina ↓, BUN ↓, Ácido úrico ↓, Urea ↓ Tejido renal Disminución de degeneración tubular epitelial con o sin evidencia de descamación tubular epitelial	(Raju, Kavimani, Uma Maheshwara rao, Sreeramulu Reddy, & Vasanth Kumar, 2011)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Tectona grandis</i> (Lamiaceae)	Extracto etanólico de corteza, 50, 100 y 200 mg/kg/d vo. por 6 semanas	Alloxan (140 mg/kg) i.p. en ratas Wistar. 48 h después sacrificio	Suero: (a dosis de 100 y 200 mg/kg) Albúmina ↑, Creatinina ↓, Proteínas totales ↑ Orina: Albúmina ↓, Proteínas totales ↓ Tejido renal: Colesterol ↑, Triglicéridos ↑, Ausencia de lesiones escleróticas, las cuales son producidas en condiciones diabéticas	(Ghaisas, Navghare, Takawale, Zoipe, & Deshpande, 2010)
<i>Thespesia populnea</i> (Malvaceae)	Extracto metanólico de hojas, 5 mg/kg i.p. por 10 d	Cisplatino (6 mg/kg) i.p. en ratas Sprague Dawley	Suero: ALT ↓, AST ↓, Bilirrubina ↓, Urea ↓, Creatinina ↓	(Guruvayoorappan & Míka, 2013)
<i>Tinospora cordifolia</i> (Menispermaceae)	Extracto acuoso de (400 mg)	Estreptozotocina a dosis de 150 mg/Kg i.p. en ratones albinos	Orina: Albúmina ↓ Volumen urinario ↓ Suero: Creatinina No hubo cambio significativo	(Grover et al., 2001)
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	Extracto metanólico a dosis de 100 mg/kg/día/7 d y 100 mg/kg tras 2 h de la administración del etilenglicol	2 ml/kg/d de etilenglicol por 7 d en ratones albinos.	Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, LDH ↓ Tejido renal: SOD ↑, CAT ↑, GSH-peroxidasa ↑, GSH ↑, MDA ↓	(Mohanasundari, Sabesan, & Sethupathy, 2005)

*Continúa*

## Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	Extracto acuoso de las semillas a dosis de 5 y 10 mg/kg/d	Isquemia renal bilateral por 60 min en ratas Wistar.	Suero: BUN ↓, Creatinina ↓ MDA ↓ Tejido renal: SOD ↑, CAT ↑, GSH-peroxidasa ↑	(Nakagawa, Yokozawa, Satoh, & Kim, 2005)
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	Extracto acuoso de hojas, 100 mg/kg/día v.o. por 17 d	CCl <sub>4</sub> (1.25 mL/kg) i.p. en ratas Wistar por 48 h	Extracto Análisis fitoquímico: Flavonoides, proantocianidinas, flavonoles glicosidos. DPPH IC <sub>50</sub> : 13.4±0.05 mg/mL Suero: Urea ↓, Creatinina ↓, Ácido úrico ↓, Calcio ↓, Albúmina ↑ Tejido renal: MDA ↓, Grupos sulfhidrilo no proteicos Moderado ↑ Histología: Corrección del daño renal por mejoramiento en arquitectura tubular y glomerular así como reducción de células inflamatorias	(El Arem et al., 2014)
<i>Wilmania somnifera</i> (Solanaceae)	Extracto de las raíces a dosis de 250 mg/kg/d por 40 d	Carbendazima a dosis de 400 mg/Kg en ratas Wistar.	Tejido renal: Se observó disminución en el daño tisular	(Akbarsha, Vijendrakumar, Kadalmani, Giriya, & Faridha, 2000)

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)	Polvo de la raíz de la planta, 250 y 500 mg/kg v.o. por 8 d	Nefrotoxicidad por bromobenceno 10 mmol/kg v.o. en ratas Wistar	<p>Suero</p> <p>Creatinina Niveles normales, Urea Niveles normales, Ácido úrico Niveles normales, Colesterol Niveles normales</p> <p>Triglicéridos Niveles normales</p> <p>Orina:</p> <p>Creatinina Niveles normales</p> <p>Urea Niveles normales</p> <p>Ácido úrico Niveles normales</p> <p>Tejido renal:</p> <p>MDA ↓</p> <p>SOD Niveles normales</p> <p>CAT Niveles normales</p> <p>GSH peroxidasa Niveles normales</p> <p>NAG ↓, Catepsina D ↓, Isocitrato deshidrogenasa Niveles normales, Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa Niveles normales, Succinato deshidrogenasa Niveles normales, Citocromo c oxidasa: Niveles normales, NADH deshidrogenasa Niveles normales</p> <p>Disminución de infiltrado celular peritubular</p>	(Vedi, Rasool, & Sabina, 2014)

*Continúa*

Continuación

Nombre de la planta (familia)	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental de daño renal	Resultados (comparación contra el control positivo de daño)	Referencia
<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)	Extracto acuoso de toda la planta, 350 mg/kg/día por 15 d v.o.	Cisplatino (5 mg/kg) por 5 d i.p. en ratones BALB/c	Suero: Creatinina ↓, BU ↓ Tejido renal: Morfología normal con glomérulos intactos y túbulos proximales y distales bien definidos	(Sachdeva, Sehgal, & Kaur, 2013)
<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Extracto de acetato de etilo 6.25, 12.5, 25 mg/kg v.o. por 5 d	Gentamicina (100 mg/kg/d) i.p. en ratas Wistar por 7 d	Suero: Creatinina ↓, BUN ↓, Nitrito ↓ Orina: Depuración de creatinina ↓, Proteínas Normalización de proteína Tejido renal: MDA ↓, Nitrito ↓, GSH ↓ SOD ↓, RNAm FNT $\alpha$ ↓, RNAm IFN $\gamma$ ↓, RNAm IL-1 $\beta$ tendencia de disminución sin cambio significativo, RNAm IL-2 tendencia de disminución sin cambio significativo	(Rodrigues et al., 2014)

Abreviaturas: RNAm, ácido ribonucleico mensajero; FNT- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; IFN- $\gamma$ , interferón gamma; IL-, interleucina; SOD, super óxido dismutasa; GSH, glutatión; MDA, malondialdehído; BUN, nitrógeno de la urea; NAG, N-acetil glucosamina; CAT, catalasa; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; LDH, lactato deshidrogenasa; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; FA, fosfatasa alcalina AQP-2, acuaporina 2; HO-1, hem oxigenasa 1; T<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O, reabsorción de agua libre el túbulos colectores; HPLC, cromatografía de líquidos de alta resolución; MS, espectrometría de masas; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; Mn-SOD, superóxido dismutasa dependiente de manganeso; CCl<sub>4</sub>, tetracloruro de carbono; FRAP, poder antioxidante reductor del hierro; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; NO, óxido nítrico; ACP, proteína de adhesión celular; MPO, mieloperoxidasa; s.c., subcutánea; i.p., intraperitoneal; v.o., vía oral; i.m., intramuscular; ppm, partes por millón; N.S., no significativo.

Tabla 1. Plantas con actividad nefroprotectora

## 7.4. Conclusión

De la revisión realizada en los artículos se encontró que los principales inductores de daño renal agudo fueron: gentamicina, cisplatino, nitrilotriacetato de hierro y el daño por isquemia-reperfusión. Estos modelos de daño fueron realizados principalmente en animales de experimentación, utilizando en la mayoría de ellos a ratas y ratones. Los principales mecanismos nefroprotectores descritos fueron la reducción de los niveles séricos de creatinina y de urea, y de los niveles urinarios de proteínas (albúmina y proteínas totales); además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo, tales como el malondialdehído; esto aunado a una restauración de la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido, siendo estos marcadores evaluados en suero y tejido. Los principales grupos fitoquímicos reportados con actividad nefroprotectora fueron del tipo alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles, glicósidos y terpenos.

## Referencias

- Adeneye, A.A., & Benebo, A.S. (2008). Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 318-323. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.025>
- Adeneye, A.A., Olagunju, J.A., Benebo, A.S., Elias, S.O., Adisa, A.O., Idowu, B.O. et al. (2008). Nephroprotective effects of the aqueous root extract of *Harungana madagascariensis* (L.) In acute and repeated dose acetaminophen renal injured rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(1), 6-14.
- Ahmad, Q.Z., Jahan, N., & Ahmad, G. (2012). Nephroprotective effect of *Kababchini* (*Piper cubeba*) in gentamycin-induced nephrotoxicity. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation Saudi Arabia*, 23, 773-781. <http://doi.org/10.4103/1319-2442.98159>
- Ahmed, A.F., Al-Yousef, H.M., Al-Qahtani, J.H., Al-Said, M.S., Ashour, A.E., Al-Sohaibani, M. et al. (2015). Hepatorenal protective effect of Antistax<sup>®</sup> against chemically-induced toxicity. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 1), S173-181. <http://doi.org/10.4103/0973-1296.157726>

- Ahmed, M.M. (2010). Biochemical studies on nephroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) growing in Egypt. *Nature and Science*, 8(3), 41-47.
- Ahn, C.B., Song, C.H., Kim, W.H., & Kim, Y.K. (2002). Effects of *Juglans sinensis* Dode extract and antioxidant on mercury chloride-induced acute renal failure in rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), 45-49. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00124-1](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00124-1)
- Akbarsha, M.A., Vijendrakumar, S., Kadalmani, B., Girija, R., & Faridha, A. (2000). Curative property of *Withania somnifera* Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat. *Phytomedicine*, 7(6), 499-507. [http://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80036-7](http://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80036-7)
- Ali, B.H. (2004). The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *The American journal of Chinese medicine*, 32(1), 49-55. <http://doi.org/10.1142/S0192415X04001710>
- Ankita, P., Deepti, B., & Nilam, M. (2015). Flavonoid rich fraction of *Punica granatum* improves early diabetic nephropathy by ameliorating proteinuria and disturbed glucose homeostasis in experimental animals. *Pharmaceutical biology*, 53(1), 61-71. <http://doi.org/10.3109/13880209.2014.910533>
- Annie, S., Rajagopal, P.L., & Malini, S. (2005). Effect of *Cassia auriculata* Linn. Root extract on cisplatin and gentamicin-induced renal injury. *Phytomedicine*, 12(8), 555-560. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.11.010>
- Anwar-Ibrahim, D., & Noman-Albadani, R. (2014). Evaluation of the potential nephroprotective and antimicrobial effect of *camellia sinensis* leaves versus *hibiscus sabdariffa* (*in vivo* and *in vitro* studies). *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/389834>
- Bouanani, S., Henchiri, C., Migianu-Griffoni, E., Aouf, N., & Lecouvey, M. (2010). Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1), 38-45. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.056>
- Cao, Z., Liu, J., Zhou, S., Wu, W., Yin, C., & Wu, J. (2004). The effects of the active constituents of *Alisma orientalis* on renal stone formation and

- bikunin expression in rat urolithiasis model. *Zhonghua yi xue za zhi*, 84(15), 1276-1279.
- Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhee, S.H., & Park, K.Y. (2004). The role of Coptidis Rhizoma extract in a renal ischemia-reperfusion model. *Phytomedicine*, 11(7-8), 576-584. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.07.005>
- Cragg, G.M., & Newman, D.J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670-3695. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- El Arem, A., Thouri, A., Zekri, M., Saafi, E.B., Ghrairi, F., Zakhama, A., & Achour, L. (2014). Nephroprotective effect of date fruit extract against dichloroacetic acid exposure in adult rats. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 177-184. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.023>
- Ezejiolor, A.N., Orish, C.N., & Orisakwe, O.E. (2014). Costus afer Ker Gawl leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 8(4), 310-313.
- Ghaisas, M.M., Navghare, V.V., Takawale, A.R., Zope, V.S., & Deshpande, A.D. (2010). Antidiabetic and nephroprotective effect of tectona grandis Linn. in alloxan induced diabetes. *Ars Pharmaceutica*, 51(4), 195-206.
- Grover, J.K., Vats, V., Rathi, S.S., & Dawar, R. (2001). Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 233-238. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00246-X](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00246-X)
- Guruvayoorappan, C., & Mika, D. (2013). The effect of Thespesia populnea on cisplatin induced nephrotoxicity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 9(1), 50. <http://doi.org/10.4103/0973-1482.110362>
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ziaee, T., & Danaee, A. (2005). Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 387-393.

- Hsouna, A. Ben, Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Jaoua, S., & Feki, A.E. (2011). Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3183-3191. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.034>
- Hsu, H.Y., Chen, J.Y., Yang, J.J., & Lin, C.C. (1999). Evaluation of the antioxidant activities of *Erycibe obtusifolia*. *Am J Chin Med*, 27(1), 117-122. <http://doi.org/S0192415X99000148> [pii]
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *Biodiversitas*, 12, 1-7.
- Hunt, L.M., Arar, N.H., & Akana, L.L. (2000). Herbs, Prayer, and Insulin Use of Medical and Alternative Treatments by a Group of Mexican American Diabetes Patients. *J Fam Pract*, 49(3), 216-223.
- Ingale, K.G., Thakurdesai, P.A., & Vyawahare, N.S. (2013). Protective effect of *Hygrophila spinosa* against cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Indian journal of pharmacology*, 45(3), 232-236. <http://doi.org/10.4103/0253-7613.111909>
- Iqbal, M., & Athar, M. (1998). Attenuation of iron-nitritotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food and Chemical Toxicology*, 36(6), 485-495. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00008-8](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00008-8)
- Kabasakal, L., Sehirlı, O., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N., & Sener, G. (2005). Protective effect of aqueous garlic extract against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 319-326. <http://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.319>
- Kakalij, R.M., Alla, C.P., Kshirsagar, R.P., Kumar, B.H., & Mutha, S.S. (2014). Ameliorative effect of *Elaeocarpus ganitrus* on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 46(3), 298-302. <http://doi.org/10.4103/0253>
- Kalantari, H., Jalali, M., Jalali, A., Salimi, A., Alhalvachi, F., Varga, B. et al. (2011). Protective effect of *Cassia fistula* fruit extract on bromobenzene-induced nephrotoxicity in mice. *Human & experimental toxicology*, 30(10), 1710-1715. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327110396532>

- Kang, D.G., Sohn, E.J., Moon, M.K., Lee, Y.M., & Lee, H.S. (2005). Rehmannia glutinose ameliorates renal function in the ischemia/reperfusion-induced acute renal failure rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(9), 1662-1667. <http://doi.org/10.1248/bpb.28.1662>
- Khan, M.R., & Siddique, F. (2012). Antioxidant effects of Citharexylum spinosum in CCl 4 induced nephrotoxicity in rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(4), 349-355. <http://doi.org/10.1016/j.etp.2010.09.009>
- Khan, N., & Sultana, S. (2005a). Chemomodulatory effect of Ficus racemosa extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*, 77(11), 1194-1210. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.041>
- Khan, N., & Sultana, S. (2005b). Inhibition of potassium bromate-induced renal oxidative stress and hyperproliferative response by Nymphaea alba in Wistar rats. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 20(3), 275-283. <http://doi.org/10.1080/14756360400028119>
- Khattab, S.N., Massoud, M.I., Jad, Y.E. S., Bekhit, A.A., & El-Faham, A. (2015). Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside. *Food Chemistry*, 173, 979-985. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.093>
- Kotnis, M.S., Patel, P., Menon, S.N., & Sane, R.T. (2004). Renoprotective effect of Hemidesmus indicus, a herbal drug used in gentamicin-induced renal toxicity. *Nephrology*, 9(3), 142-152. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2004.00247.x>
- Lee, S.-C., Tsai, C.-C., Chen, J.-C., Lin, C.-C., Hu, M.-L., & Lu, S. (2002). The evaluation of reno- and hepatoprotective effects of huai-shan-yao (Rhizome Dioscoreae). *The American journal of Chinese medicine*, 30(4), 609-616. <http://doi.org/10.1142/S0192415X02000624>
- Lozoya, X., & Symposium, C.F. (2008). Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs. En *Ethnobotany and the Search for New Drugs* (p. 290). John Wiley & Sons.

- Lu, G.W., Miura, K., Yukimura, T., & Yamamoto, K. (1994). Effects of extract from *Clerodendron trichotomum* on blood pressure and renal function in rats and dogs. *J Ethnopharmacol*, 42(2), 77-82. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90100-7](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(94)90100-7)
- Maldonado, P.D., Barrera, D., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M. E., & Pedraza-Chaverri, J. (2003). Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sciences*, 73(20), 2543-2556. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00609-X](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00609-X)
- Martínez-Ramírez, H.R., Cueto-Manzano A.M., Rojas-Campos, E., Cortés-Sanabria, L. (2011). Estrategias para la prevención , diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica temprana en primer nivel de atención. *El Residente*, VI(1), 44-50.
- Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J.F., Tapia-Yáñez, T., Montes, A.M., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7-11. [http://doi.org/10.1016/S1886-2845\(10\)70004-7](http://doi.org/10.1016/S1886-2845(10)70004-7)
- Mi, Q.W., Cao, Z.G., Liu, J.H., Wu, J.Z., Yin, C. P., Zhou, S.W. et al. (2005). Effects of active fraction of *Alisma orientalis* on osteopontin expression in renal tissue of urolithiasis model rat with calcium oxalate stone. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 36, 1827-1830.
- Mohanasundari, M., Sabesan, M., & Sethupathy, S. (2005). Renoprotective effect of grape seeds extract in ethylene glycol induced nephrotoxic mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(4), 356-359.
- Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Moghaddam, A.H., Naqinezhad, A., Bigdellou, R., & Mohammadzadeh, S. (2012). Protective effects of *Allium paradoxum* against gentamicin-induced nephrotoxicity in mice. *Food & function*, 3(1), 28-29. <http://doi.org/10.1039/c1fo10173k>
- Nabavi, S.M., Habtemariam, S., Nabavi, S.F., Sureda, A., Daglia, M., Moghaddam, A.H. et al. (2013). Protective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress in rat's kidney. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 372(1-2), 233-239. <http://doi.org/10.1007/s11010-012-1464-y>

- Nakagawa, T., Yokozawa, T., Satoh, A., & Kim, H.Y. (2005). Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51(4), 283-286. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.51.283>
- National Kidney Foundation. (2002). Part 4. Definition and Classification of Stages of Chronic Kidney Disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(2), S46-S75. <http://doi.org/10.1053/ajkd.2002.30943>
- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Vila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R. et al. (2012). Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry Research International*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/603501>
- Okokon, J.E., Nwafor, P.A., & Noah, K. (2011). Nephroprotective effect of *Croton zambesicus* root extract against gentamicin-induced kidney injury. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(12), 969-972. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60228-9](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60228-9)
- Olagunju, J.A., Adeneye, A.A., Fagbohunka, B.S., Bisuga, N.A., Ketiku, A.O., Benebo, A.S. et al. (2009). Nephroprotective activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn. in carbon tetrachloride induced renal injured wistar rats: A dose- and time-dependent study. *Biology and Medicine*, 1(1), 11-19.
- Omurtag, G.Z., Guranlioglu, F.D., Sehirli, O., Arbak, S., Uslu, B., Gedik, N. et al. (2005). Protective effect of aqueous garlic extract against naphthalene-induced oxidative stress in mice. *J Pharm Pharmacol*, 57(5), 623-630. <http://doi.org/10.1211/0022357055939>
- Ouedraogo, M., Lamien-Sanou, A., Ramde, N., Ouedraogo, A.S., Ouedraogo, M., Zongo, S.P. et al. (2013). Protective effect of *Moringa oleifera* leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 65(3), 335-339. <http://doi.org/10.1016/j.etp.2011.11.006>
- Papadakis, M.A., McPhee, S.J., & Martínez, M.E.A. (2009). *Diagnostico clinico y tratamiento*. McGraw-Hill/Interamericana.

- Pedraza-Chaverri, J., Barrera, D., Hernández-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Cruz, C., Murguía, F. et al. (2004). Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sciences*, 74(8), 987-999. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.045>
- Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silvestre, M.D.L.Á., Hernández-Pando, R. et al. (2000). Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: Relation to antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(7), 602-611. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00354-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00354-3)
- Rajamurugan, R., Suyavaran, A., Selvaganabathy, N., Ramamurthy, C.H., Reddy, G.P., Sujatha, V. et al. (2012). Brassica nigra plays a remedy role in hepatic and renal damage. *Pharmaceutical biology*, 50(12), 1488-1497. <http://doi.org/10.3109/13880209.2012.685129>
- Raju, S., Kavimani, S., Uma Maheshwara Rao, V., Sreeramulu Reddy, K., & Vasanth Kumar, G. (2011). Floral extract of *Tecoma stans*: A potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity *in vivo*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9), 680-685. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60173-9](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60173-9)
- Rocha, M.J.A., Fulgencio, S.F., Rabetti, A.C., Nicolau, M., Poli, A., Simoes, C.M.O., & Ribeiro-do-Valle, R.M. (1994). Effects of hydroalcoholic extracts of *Portulaca pilosa* and *Achyrocline satureioides* on urinary sodium and potassium excretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 43(3), 179-183. [http://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90040-X](http://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90040-X)
- Rodrigues, F.A.P., Prata, M.M.G., Oliveira, I.C.M., Alves, N.T.Q., Freitas, R.E.M., Monteiro, H.S.A. et al. (2014). Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 1872-1878. <http://doi.org/10.1128/AAC.02431-13>
- Sachdeva, H., Sehgal, R., & Kaur, S. (2013). Studies on the protective and immunomodulatory efficacy of *Withania somnifera* along with cisplatin against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 112(6), 2269-2280. <http://doi.org/10.1007/s00436-013-3387-2>

- Sen, S., De, B., Devanna, N., & Chakraborty, R. (2013). Cisplatin-induced nephrotoxicity in mice: protective role of *Leea asiatica* leaves. *Renal failure*, 35(10), 1412-1417. <http://doi.org/10.3109/0886022X.2013.829405>
- Şener, G., Şener, E., Şehirli, Ö., Ögünç, A.V., Çetinel, Ş., Gedik, N. et al. (2005). Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacological Research*, 52(3), 216-222. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.006>
- Sharma, S.K., & Goyal, N. (2012). Protective effect of *Heliotropium eichwaldi* against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao = Journal of Chinese Integrative Medicine*, 10(5), 555-560. <http://dx.doi.org/10.3736/jcim20120511>
- Shelke, T.T., Kothai, R., Adkar, P.P., Bhaskar, V.H., Juvale, K.C., Kamble, B.B. et al. (2009). Nephroprotective activity of ethanolic extract of dried fruits of *Pedalium murex* linn. *Journal of Cell and Tissue Research*, 91(1), 1687-1690.
- Singh, A., Singh, R.H., Singh, R.G., Misra, R., Vrat, S., Prakash, M. et al. (1988). Effect of *Boerhaavia diffusa* Linn (Punarnava) in experimental acute pyelonephritis in albino rats. *Indian Drugs*, 26, 10-13.
- Song, F., Qi, X., Chen, W., Jia, W., Yao, P., Nussler, A.K. et al. (2007). Effect of *Momordica grosvenori* on oxidative stress pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice: Involvement of heme oxygenase-1. *European Journal of Nutrition*, 46(2), 61-69. <http://doi.org/10.1007/s00394-006-0632-9>
- Sonkar, N., Ganeshpurkar, A., Yadav, P., Dubey, S., Bansal, D., & Dubey, N. (2014). An experimental evaluation of nephroprotective potential of *Butea monosperma* extract in albino rats. *Indian journal of pharmacology*, 46(1), 109-112. <http://doi.org/10.4103/0253-7613.125190>
- Tripathi, Y.B., Nagwani, S., Mishra, P., Jha, A., & Rai, S.P. (2012). Protective effect of *Pueraria tuberosa* DC. Embedded biscuit on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Journal of Natural Medicines*, 66(1), 109-118. <http://doi.org/10.1007/s11418-011-0559-1>

- Tunón, H., Bohlin, L., & Öjteg, G. (1994). The effect of *Menyanthes trifoliata* L. on acute renal failure might be due to PAF-inhibition. *Phytomedicine*, 1(1), 39-45. [http://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80021-8](http://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80021-8)
- Ullah, N., Khan, M., Khan, T., Asif, A., & Ahmad, W. (2014). *Mentha piperita* in nephrotoxicity - a possible intervention to ameliorate renal derangements associated with gentamicin. *Indian Journal of Pharmacology*, 46(2), 166. <http://doi.org/10.4103/0253-7613.129309>
- Valverde, J.L. (1984). The aztec herbal of 1552. Martin de la Cruz' «Libellus de medicinalibus indorum herbis»; context of the sources on nahualt materia medica. *Veröffentlichungen Der Internationalen Gesellschaft Fur Geschichte Der Pharmazie E. V.*, 53, 9-30.
- Varalakshmi, P., Shamila, Y., & Latha, E. (1990). Effect of *Crataeva nurvala* in experimental urolithiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(3), 313-321. [http://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90082-5](http://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90082-5)
- Vedi, M., Rasool, M., & Sabina, E.P. (2014). Protective effect of administration of *Withania somifera* against bromobenzene induced nephrotoxicity and mitochondrial oxidative stress in rats. *Renal Failure*, 36(7), 1095-1103. <http://doi.org/10.3109/0886022X.2014.918812>
- Yankuzo, H., Ahmed, Q.U., Santosa, R.I., Akter, S.F.U., & Talib, N.A. (2011). Beneficial effect of the leaves of *Murraya koenigii* (Linn.) Spreng (Rutaceae) on diabetes-induced renal damage *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(1), 88-94. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.020>
- Yokozawa, T., Fujii, H., Kosuna, K., & Nonaka, G. (2001). Effects of buckwheat in a renal ischemia-reperfusion model. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(2), 396-400. <http://doi.org/10.1271/bbb.65.396>

## ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

---

**David Mizael Ortíz-Martínez<sup>1</sup>, Paula Cordero-Pérez<sup>2</sup>,  
Catalina Leos-Rivas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio Química Analítica Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Unidad de Hígado, Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[paucordero@yahoo.com.mx](mailto:paucordero@yahoo.com.mx), [dmizael\\_om@hotmail.com](mailto:dmizael_om@hotmail.com),  
[catalina.leosrs@uanl.edu.mx](mailto:catalina.leosrs@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.342>

Ortíz-Martínez, D.M., Cordero-Pérez, P., & Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antidiabética. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 215-268.

## Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento que afecta 382 millones de personas a nivel mundial de acuerdo a la Federación Internacional de la diabetes. Existen principalmente dos tipos de diabetes; la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2), siendo la DM2 la causante de aproximadamente el 90% de los casos. La DM1 se denomina también insulino dependiente o de inicio juvenil causada por una reacción autoinmune donde el sistema inmunitario del cuerpo ataca a las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. Las personas con este tipo de diabetes necesitan inyectarse insulina diariamente con el fin de controlar los niveles de glucosa en la sangre. La DM2 es una compleja alteración metabólica caracterizada por una combinación de resistencia a la insulina y alteración en la secreción de la misma. No existe el fármaco ideal para tratar la DM que sea capaz de normalizar la glucemia sin efectos secundarios como hipoglucemias e incremento de peso y que además logre disminuir la morbimortalidad cardiovascular y mantener la integridad y el funcionamiento normal de las células pancreáticas. Se han utilizado una gran cantidad de plantas medicinales empíricamente como hipoglucemiantes con muy buenos resultados, ya que contienen compuestos bioactivos para el control de esta enfermedad, algunas de estas ya se han validado científicamente.

En la revisión realizada se encontró que los principales inductores de diabetes experimental fueron la estreptozotacina, el alloxan y una dieta alta en grasa, mientras que los controles farmacéuticos más utilizados fueron la glibenclamida y la metformina. Estos modelos de daño principalmente fueron realizados en animales de experimentación con ratas y ratones. Los principales mecanismos hipoglucemiantes encontrados fueron la inhibición de enzimas como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa; así como la reducción en los niveles de glucosa sérica, enzimas hepáticas, perfil de lípidos, insulina y glucógeno hepático fueron los parámetros con mayor frecuencia para evaluar la actividad de los extractos con potencial hipoglucemiante; además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) y una restauración de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) y actividad antioxidante a través del DPPH. Los principales metabolitos secundarios reportados con actividad hipoglucemiante fueron: taninos, flavonas, triterpenoides, esteroides, saponinas y alcaloides entre otros.

## Palabras clave

Actividad antidiabética, diabetes mellitus, anti-hiperglucémico, plantas medicinales.

## 8.1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento que afecta 382 millones de personas a nivel mundial de acuerdo a la Federación Internacional de la diabetes, y se estima que para el año 2035 se incremente a 592 millones de casos. Existen muchos fármacos para el control de la hiperglucemia en la DM, sin embargo no existe el fármaco ideal, capaz de normalizar la glucemia sin efectos secundarios como hipoglucemias e incremento de peso y que además logre disminuir la morbimortalidad cardiovascular y mantener la integridad y el funcionamiento normal de las células pancreáticas (Ascaso, 2014). Existen principalmente dos tipos de diabetes; la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), siendo la DM2 la causante de aproximadamente el 90% de los casos.

La DM1 se denomina también insulino dependiente o de inicio juvenil. Es causada por una reacción autoinmune donde el sistema inmunitario del cuerpo ataca a las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. Las personas con este tipo de diabetes necesitan inyectarse insulina diariamente con el fin de controlar los niveles de glucosa en la sangre.

La DM2 es una compleja alteración metabólica caracterizada por una combinación de resistencia a la insulina, que es literalmente una baja sensibilidad de uno o múltiples tejidos hacia la insulina y alteración en la secreción de la misma (Ascaso, 2014). La cascada de señalización de la insulina está presente en otros tejidos además de los clásicos: islotes de las células  $\beta$ , células endoteliales y neuronas (Janani & Ranjitha Kumari, 2015), uno de los tejidos con mayor importancia en este contexto es el tejido adiposo compuesto en su mayoría por adipocitos, los cuales son células dinámicas sensibles a la insulina que tienen propiedades endocrinas y contribuyen a la homeostasis energética del cuerpo, en un principio se creía que solo eran reservorios de lípidos, pero son en realidad células productoras de proteínas y sitio de localización de factores de transcripción que participan activamente en la homeostasis energética (Esteve Ràfols, 2014; Richard et al., 2014). PPAR $\gamma$  es una de las proteínas de mayor importancia en DM ya que es el regulador maestro en la diferenciación adipocitaria e incremento en el número de adipocitos sensibles a la insulina, además la activación de PPAR $\gamma$  en adipocitos maduros regula varios genes involucrados en la cascada de señalización de la insulina y en el metabolismo de glucosa y de lípidos (Janani & Ranjitha Kumari, 2015).

Se han utilizado una gran cantidad de plantas medicinales empíricamente como hipoglucemiantes con muy buenos resultados, ya que contienen compuestos bioactivos para el control de esta enfermedad, algunas de estas ya se han validado científicamente.

En este trabajo se realizó una búsqueda de las plantas que se han utilizado para el tratamiento de la diabetes y se han evaluado por ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla 1).

## 8.2. Ensayos para evaluar la actividad antidiabética

### 8.2.1. Ensayos *in vivo*

En investigación de diabetes se han utilizado diversos modelos animales para experimentación con el objetivo de simular las condiciones del proceso diabético en humanos, sin embargo, a pesar de la posibilidad de utilizar animales como perros, chimpancés y otros organismos complejos; los modelos de estudio animal más utilizados son los murinos.

A continuación se enlistan los modelos murinos más utilizados para experimentación en diabetes: ratón Ob/Ob, ratón db/db, ratón KK, ratón Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), ratón CBA/Ca, ratón obeso de Nueva Zelanda, rata Zucker(fa/fa), rata Goto Kakizaki, rata OLETF (Otsoku Long-Evans Tokushima), rata Torri diabética y rata *Psammomys obesus*.

#### 8.2.1.1. Inducción de diabetes en modelos animales

Se puede inducir diabetes mellitus experimental en animales de laboratorio de forma química, quirúrgica y por manipulación genética/inmunológica. Los métodos para la inducción de diabetes experimental son los siguientes: pancreatometomía en perros, inducción con Aloxano, inducción con Estreptozotocina, inducción con hormonas, inducción con virus, inducción de deficiencia de insulina con anticuerpos y otros agentes diabetogénicos. Los animales genéticamente modificados serían: ratas con desarrollo espontáneo de diabetes, ratones con desarrollo espontáneo de diabetes, hámster chino, animales transgénicos y otras especies con síntomas diabéticos heredados.

La inducción química de diabetes es el método más empleado. Las dosis recomendadas son las siguientes: Usando Alozano en ratón se recomiendan 100 mg/kg peso corporal (pc) vía intra-peritoneal (ip), en ratas se recomiendan 150 mg/kg pc vía ip; con Estreptozotocina se recomiendan dosis de 60 mg/kg pc vía ip para ratón y rata (Radenkovi, Stojanovi & Prostran, 2016).

#### 8.2.1.2. *Determinación del efecto anti-hiperglucémico*

Es posible determinar en modelos animales si alguna muestra o producto es capaz de prevenir la hiperglucemia post-prandial, con el objetivo de evitar que los niveles de glucosa en sangre se eleven a concentraciones peligrosas. Consiste básicamente en inducir un estado diabético con un agente químico al modelo animal y aplicar a distintas concentraciones la muestra antes de recibir una carga de carbohidratos y medir los niveles de glucosa en sangre para verificar si se logró impedir un incremento de glucosa en el organismo. Para estos ensayos se utiliza normalmente la sucrosa como fuente de carbohidratos (Hussin, Vitor, Joaquin, Clerigo & Paano, 2016; Juárez-Reyes et al., 2015; Ovalle-Magallanes, Medina-Campos, Pedraza-Chaverri & Mata, 2015).

Para inducir diabetes, los animales se tratan con una inyección intra-peritoneal de Estreptozotocina (la dosis depende del modelo animal) disuelta en buffer de citrato (pH 4.5) en condiciones de ayuno. Los niveles sanguíneos de glucosa se monitorean hasta el día 7, hasta que los niveles de glucemia alcancen valores de un individuo diabético. Individuos hiperglucémicos son separados en grupos de acuerdo a la cantidad de tratamientos que se desee probar, aplicando dichos tratamientos vía oral o intragástrica usando solución salina como vehículo. A todos los animales se les priva de alimento durante 4 h antes del experimento con acceso libre al consumo de agua, se registran los niveles de glucosa basal y se procede a la aplicación de tratamientos. Los niveles de glucosa se monitorean tomando muestras de sangre por punción de la cola del animal y midiendo con un glucómetro. El grupo control vehículo recibe solución salina como tratamiento, al grupo control positivo se le aplica acarbosa 5 mg/kg pc (puede variar según el modelo animal), también se requiere de un grupo control normoglucémico y el resto se divide en grupos prueba para la aplicación de las muestras problema a distintas concentraciones. Es recomendable realizar pruebas de tolerancia a la muestra problema, para verificar las dosis que pueden ser tóxicas para el modelo de estudio que se elija. Una vez aplicados los tratamientos,

incluidos los controles; se administra una carga de sucrosa a 2.5 g/kg pc (puede variar según el modelo animal) vía oral exactamente 30 min después de la administración de tratamientos. Después se miden los niveles de glucosa en sangre de todos los grupos a los 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 1440 min posteriores a la administración de la sucrosa. En comparaciones estadísticas entre los tratamientos para verificar si existe una disminución significativa en los niveles de glucosa de los grupos control con el resto de los grupos (J. Chen, Wu, Zou & Gao, 2016; Setyaningsih, Bintang & Madina, 2015; Singh et al., 2011; P. R. Verma, Itankar & Arora, 2013).

### 8.2.1.3. Evaluación del efecto hipoglucémico

La disminución en los niveles de insulina en sangre debido a la deficiente secreción, así como el uso ineficiente de la misma; puede provocar un incremento de los niveles de glucosa en sangre a concentraciones muy peligrosas que ponen en riesgo el buen funcionamiento de diversos órganos. Por tanto, la búsqueda de nuevos productos que tengan un efecto hipoglucemiante ha cobrado con el paso del tiempo, una gran importancia como alternativa para hacerle frente a la diabetes mellitus. Las pruebas del efecto hipoglucémico *in vivo* de algún producto se hacen usando modelos animales como las ratas o ratones. A continuación se describe un método usado por diversos autores.

Se separan individuos en diferentes grupos para aplicarles distintos tratamientos. Teniendo un grupo control normoglucémico (recibe únicamente el vehículo, 5 mL/kg pc de solución salina), un grupo normoglucémico de referencia (recibe glibenclamida 5 mg/kg pc), grupos normoglucémicos (recibe productos a probar a diferentes concentraciones) grupo hiperglucémico control (recibe vehículo, 5 mL/kg pc de solución salina), grupo control hiperglucémico (glibenclamida 5 mg/kg pc) y otro grupo hiperglucémico (recibe productos a probar a diferentes concentraciones).

#### 8.2.1.3.1. Estudio en fase aguda

Dieciséis horas previas al experimento, los grupos de ratas se mantienen en ayuno con acceso libre a agua. Antes de comenzar se miden el peso y los niveles de glucosa en sangre. Las muestras de sangre se obtienen de la vena caudal a las 0, 1, 3, 5 y 7 h después de aplicar los respectivos tratamientos a cada grupo, con

ayuda de un glucómetro. Se calculan los porcentajes de variación de glucemia de cada grupo en relación al nivel inicial (0 h), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glucemia fase aguda} = \frac{(G_x - G_0)}{G_0} \times 100 \quad (1)$$

*Ecuación 1. Porcentaje de variación de glucemia fase aguda*

Donde:

$G_0$  es el valor inicial de glucemia y  $G_x$  es el valor de glucemia a las horas 1, 3, 5 y 7 respectivamente.

#### 8.2.1.3.2. Estudio en fase sub-aguda

Los tratamientos se administran durante 5 d consecutivos. Los niveles de glucosa en sangre se determinan 1 h después de que los tratamientos se administran y el peso corporal se registra antes de la administración. Se calculan los porcentajes de variación de glucemia de cada grupo en relación al día inicial de experimentación, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glucemia fase sub aguda} = \frac{(\text{Día } x - \text{Día } 1)}{\text{Día } 1} \times 100 \quad (2)$$

*Ecuación 2. Porcentaje de variación de glucemia*

Donde:

$\text{Día } 1$  es el valor inicial de glucemia y  $\text{Día } x$  es el valor de glucemia al día 1,2, 3, 4 y 5 respectivamente (Ovalle-Magallanes et al., 2015; Torres-Piedra et al., 2010).

#### 8.2.1.4. Estudio de regeneración pancreática

Cuando el organismo se encuentra afectado por un proceso diabético, el páncreas es el órgano que quizá tiene mayor importancia si se toma en cuenta que este es el encargado de la secreción de insulina. En la diabetes tipo 1 y 2, la co-

rrrecta producción y secreción de insulina se encuentra alterada, es por esto que en la investigación encaminada para mejorar el estado diabético, la reparación del tejido pancreático en un objetivo primordial, ya que logrando restablecer o mejorar la función del tejido pancreático se puede llegar a restablecer los niveles de glucosa sanguínea. En la actualidad se realizan metodologías para probar el efecto de algunos productos sobre el páncreas, a nivel histológico, enzimático y en la producción de insulina.

La metodología para el estudio de regeneración pancreática con ratas es la siguiente:

#### 8.2.1.4.1. Estudio en fase aguda

Las ratas diabéticas se dejan en ayuno toda la noche y se dividen en grupos de 3 a 6 individuos. Uno de los grupos será un grupo control, el cual recibirá como tratamiento solamente el vehículo (agua destilada 10 mL/kg pc), otro grupo recibirá una dosis de insulina (4 IU/kg pc), el resto de los grupos recibirán los productos a probar, administrando vía oral con una jeringa. Después de la administración de tratamientos, la actividad antidiabética se evalúa tomando muestras de sangre a las 0, 1, 3, 5 y 24 h.

#### 8.2.1.4.2. Estudio en fase sub-crónica

De igual forma que en el estudio en fase aguda, se utilizan individuos diabéticos y se dividen en distintos grupos. Se aplican los mismos tratamientos vía oral durante 21 d. Se mide el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre en condiciones de ayuno en el día 0, 7, 14 y 21 del estudio. Finalmente, en el día 21, se colectan muestras de sangre del plexo retro-orbital y las ratas se sacrifican, se retira el páncreas y se lavan con solución fisiológica para el estudio histopatológico.

### **Procesamiento del tejido**

El páncreas removido se lava para eliminar los ganglios linfáticos, se pesa y se fija durante 1 h en formalina al 10% y se deshidratan en un gradiente de alcohol. Los tejidos se embeben en parafina. Cada muestra se secciona con un micrótopo (4  $\mu$ m de espesor) a lo largo de su longitud para evitar cualquier

sesgo debido a la distribución de los islotes o composición celular. Para cada páncreas, se escogen al azar 10 secciones y se tiñen con hematoxilina y eosina para examen histológico. Se determina el perímetro, tamaño y número de islotes por sección de cada muestra con un microscopio y un programa de análisis de imágenes histológicas. Las laminillas se examinan en incrementos de  $1.0 \times 1.5$  mm, resultando en la evaluación de  $70 \pm 5$  campos por laminilla. Para evaluar los tamaños de los islotes, estos se pueden clasificar como pequeños (perímetro  $< 500 \mu\text{m}$ ), medianos (perímetros entre  $500\text{-}1000 \mu\text{m}$ ), grandes (perímetros entre  $1000\text{-}1500 \mu\text{m}$ ) extra grandes (perímetros entre  $1500\text{-}2000 \mu\text{m}$ ) y extra-extra grandes (perímetros entre  $2000\text{-}2500 \mu\text{m}$ ) (Hossain et al., 2014; Kazeem et al., 2015; Verma et al., 2013).

### 8.3. Ensayos *in vitro*

#### 8.3.1. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -amilasa

El control del incremento de los niveles de glucosa en sangre es de vital importancia tanto en pacientes diabéticos como en personas con un alto riesgo de padecer esta enfermedad. Para que la glucosa ingrese al flujo sanguíneo y se concentre a niveles que ponen en riesgo la integridad del organismo, es esencial la actividad fisiológica de dos enzimas clave en el metabolismo de los carbohidratos:  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

La enzima  $\alpha$ -amilasa salival y pancreática hidroliza las moléculas de almidón para producir oligosacáridos y disacáridos. La mayor parte de la digestión de carbohidratos se lleva a cabo en el borde en cepillo del intestino delgado por parte de la  $\alpha$ -glucosidasa (Bekir, Cazaux, Mars & Bouajila, 2016). Por tanto, la búsqueda de nuevos productos con enfoque en la inhibición de estas enzimas ha conducido al desarrollo de técnicas *in vitro* e *in vivo* relativamente sencillas. Actualmente se utiliza la acarbosa como fármaco para inhibir estas enzimas en pacientes diabéticos.

El ensayo de inhibición de  $\alpha$ -amilasa requiere de tres elementos principalmente; enzima ( $\alpha$ -amilasa), sustrato (almidón) y tratamiento (muestra, producto a probar). El método más utilizado es el del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), este reactivo funciona interrumpiendo la reacción enzima-sustrato, además funciona como un indicador (amarillo a naranja), el producto de la reacción se calienta a

95° C; a mayor intensidad de color mayor liberación de producto por lo tanto mayor actividad enzimática. De esta forma es posible medir la actividad de la enzima indirectamente.

Es esencial proporcionar las condiciones adecuadas para realizar el ensayo de acuerdo a los requerimientos de la enzima, por lo que la reacción, la suspensión enzimática y la solución del sustrato se hacen en una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 100 mM pH 6.9 (Sui, Zhang & Zhou, 2016). Los tratamientos se suspenden en la misma solución amortiguadora y correr un tratamiento control.

El procedimiento para el ensayo se ha descrito básicamente de la misma manera por muchos autores, pero modificando las cantidades. Una de las metodologías utilizadas es la siguiente: se hace una mezcla que contenga 25 µL de la suspensión enzimática y 25 µL del tratamiento a distintas concentraciones (producto a probar, control negativo y acarbosa como control positivo) esta mezcla se incuba por 10 min/37°C y se adicionan 50 µL de la suspensión de almidón para incubar nuevamente por 10 min/37°C. Se interrumpe la reacción agregando 100 µL de DNS y calentando por 5 min/95°C. Se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm y se determina el % de inhibición con la siguiente ecuación (Dehghan, Sarrafi & Salehi, 2016; Holmes, Aydin, Jensen & Williamson, 2015; C. Liu, Wang, Lu & Chiang, 2014).

$$\% \text{ de inhibición de } \alpha \text{ amilasa} = \frac{(Abs \text{ control} - Abs \text{ muestra})}{Abs \text{ control}} \times 100 \quad (3)$$

*Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de α-amilasa*

Donde:

*Abs muestra* es la absorción de luz por parte del producto de reacción en presencia de la muestra.

*Abs control* es la absorción de luz por parte del producto de reacción sustituyendo la muestra por solución amortiguadora.

Las concentraciones de la muestra probadas y los porcentajes de inhibición se analizan con ayuda de un paquete estadístico para determinar la concentración

inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) que es la cantidad de producto probado que es necesario para inhibir en un 50% la actividad de la enzima (Dehghan et al., 2016).

### 8.3.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa

El ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa también depende de tres elementos principalmente, al igual que se describe anteriormente para  $\alpha$ -amilasa; enzima, sustrato y tratamiento. En este caso como la  $\alpha$ -glucosidasa hidroliza azúcares más simples, el sustrato requerido para la prueba debe ser algún disacárido u oligosacárido. El ensayo más utilizado para determinar la capacidad de alguna muestra para inhibir  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*, es el método donde se usa *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) como sustrato. Al ser un sustrato cromogénico, la actividad de la enzima se evidencia presentándose una coloración amarilla (*p*-nitrofenol) en la mezcla de reacción, a mayor coloración mayor actividad enzimática.

La suspensión enzimática, la solución de pNPG y las soluciones de los tratamientos se preparan en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM a pH 6.9. A continuación se describe el procedimiento del ensayo con algunas modificaciones. Se colocan 25  $\mu$ L de una suspensión enzimática preparada previamente, se mezcla con 25  $\mu$ L de una solución del tratamiento (producto y controles), se incuba por 10 min/37°C; posteriormente se adicionan 50  $\mu$ L de la suspensión de pNPG y se procede a incubar nuevamente por 10 min/37°C, se interrumpe la reacción agregando 50  $\mu$ L de carbonato de sodio 0.2 M (J. Chen et al., 2016; Dehghan et al., 2016; C. Liu et al., 2014; Majouli et al., 2015; Singh et al., 2011). Finalmente se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm y se determina el % de inhibición con la siguiente ecuación (C. Liu et al., 2014).

$$\% \text{ de inhibición de } \alpha \text{ glucosidasa} = \frac{(Abs \text{ control} - Abs \text{ muestra})}{Abs \text{ control}} \times 100 \quad (4)$$

*Ecuación 4. Porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa*

Dónde:

*Abs muestra* es la absorción de luz por parte del producto de reacción en presencia de la muestra.

*Abs control* es la absorción de luz por parte del producto de reacción sustituyendo la muestra por solución amortiguadora.

Las concentraciones de la muestra probadas y los porcentajes de inhibición se analizan con ayuda de un paquete estadístico para determinar la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) que es la cantidad de producto probado que es necesario para inhibir en un 50% la actividad de la enzima.

Es posible determinar en un ensayo enzimático, el tipo de inhibición que presenta algún producto o muestra capaz de reducir la actividad de una enzima. Esto se hace mediante el análisis de la gráfica de Lineweaver–Burk, en donde se realizan cinéticas enzimáticas con concentraciones crecientes del sustrato y en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. Se calcula la constante de inhibición  $k_i$  usando las pendientes o interceptos «y» en la gráfica de Lineweaver–Burk. La  $k_i$  expresa la constante de equilibrio para la unión de enzima-inhibidor (Majouli et al., 2015).

### **8.3.3. Otros ensayos**

Existen estudios *in vitro* para la búsqueda de nuevos agentes antidiabéticos, además de los ensayos enzimáticos previamente descritos; los cuales buscan analizar los efectos de algún tratamiento en la producción de proteínas que ayuden al restablecimiento del metabolismo de lípidos y carbohidratos sobre diferentes cultivos celulares. El enfoque se encuentra principalmente sobre cultivos de células adipocitarias, células musculares y pancreáticas. En estas células se busca básicamente incrementar el consumo de glucosa, secreción de insulina en el caso de las células  $\beta$  pancreáticas, estimular el reconocimiento y uso adecuado de la insulina y en general el buen funcionamiento de las vías de señalización involucradas en el metabolismo de carbohidratos. Algunos de estos ensayos son: análisis del consumo de glucosa, ensayos de secreción de insulina y estudios de diferenciación celular. Las técnicas de biología molecular y proteómica como el análisis de expresión de genes usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, los micro-arreglos, ELISA, western blot y otras técnicas de inmuno histoquímica son ejemplos de herramientas muy útiles para la búsqueda de novedosos agentes con potencial uso como tratamiento en contra de la diabetes mellitus.

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Actinidia kolomikta</i>	Extracto etanólico	Ratas normales	Inhibición de maltasa intestinal IC <sub>50</sub> de 1.83 y sucraza intestinal con IC <sub>50</sub> de 1.03 mg/mL Suero: GLUC↓	Fenoles totales (80.49 ± 0.05 mg GAE/g extracto) y flavonoides totales (430.69 ± 0.91 mg RE/g extracto)	(Hu et al., 2015)
<i>Aerva lanata</i>	Extracto metanólico 10 y 20 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Sangre: Glucosa↓	Alcaloides derivados de canthin-6-ona	(Agrawal, Sethiya & Mishra, 2013)
<i>Aegle tamilnadensis</i>	Extracto de acetato de etilo	Ensayo <i>in vitro</i>	Inhibición de α-glucosidasa IC <sub>50</sub> de 100 µg/mL		(Pratap, Nishanth, Manju, Abdul & Dileep, 2015)
<i>Alpinia nigra</i>	Extracto orgánico	Ensayo <i>in vitro</i>	Inhibición de α-glucosidasa	Diterpenos I: (E)-labda-8(17), 12-diene-15, 16-dial and II: (E)-8β, 17-epoxylabd-12-ene-15, 16-dial from A	(Ghosh & Rangan, 2015)
<i>Anacardium humile</i>	Extracto acuoso	Ratas diabéticas inducidas con aloxano	Sangre: Glucosa ↓, ALT ↓, CT ↓		(Urzéda et al., 2013)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Anisopus mannii</i>	Extracto metanólico 400 mg/kg	Ratones diabéticos inducidas con alloxan	Sangre: Glucosa ↓, Urea ↓, Creatinina: AST ↓, ALT ↓, BT ↓	Saponinas	(Zaruwa et al., 2012)
<i>Anoda cristata</i>	Extractos acuoso y orgánico	Ratones hiperglicémicos inducidos con STZ	Extractos y compuestos Glucosa ↓	Acacetina Diosmetina	(Juárez-Reyes et al., 2015)
<i>Amaranthus roxburghii</i>	Extractos de 100 y 300 mg/kg	Ratones diabéticos inducidas con STZ	Sangre: Glucosa ↓, AST ↓, ALT ↓, MDA ↓, CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓ Tejido: SOD ↑, Glucogeno hepático ↑, Menor lesión en páncreas e hígado		(J-G. Zhang, Liu, Liu, Li & Yi, 2015)
<i>Amaranthus spinosus</i>	Extracto metanólico	Ensayo <i>in vitro</i>	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> de 6.52 $\mu$ M/mL.	1.14E, 18E, 22E, 26E) - methyl nonacosate-14, 18, 22, 26 tetraenoate 2. $\beta$ -sitosterol	(Mondal, Guria & Maity, 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Armenia casibirica</i>	Fración de un polisacárido crudo (APPS)	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa <i>in vitro</i>	Fración APPS1-2 mostro una buen actividad con un $IC_{50}$ de 6.06 mg/mL	Glycoconjugado 25.93 kDa. Formado de ramnosa, glucosa, manosa y galactosa, Rx relativa de 1,34: 2,01: 0,48: 0,35M.	(Cui, Gu, Wang, Ouyang & Wang, 2015)
<i>Bauhinia malabarica</i>	Extracto de hojas	Actividad inhibitoria de la $\alpha$ -glucosidasa vía Rx enzimática	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa $IC_{50}$ de $745.08 \pm 11.15 \mu\text{g/mL}$		(Dej-Adisai & Pitakbut, 2015)
<i>Beta vulgaris</i>	Extracto acuoso 50 mg/kg	Ratones tratados con el extracto	Papel de acetil colina y GLP-1 en actividad secretora de insulina de <i>B. vulgaris</i> . Aumento captación de glucosa en músculo esqueléticos y la síntesis de glucógeno, papel en la actividad antihiper glucémico de <i>B. vulgaris</i>		(Kabir et al., 2015)
<i>Brassica oleracea</i>	Extracto metanólico	Conejos diabéticos inducidas con STZ	Sangre: Glucosa $\downarrow$ , CT $\downarrow$ , LDL-C $\downarrow$ , HDL-C $\uparrow$		(Assad, Khan & Feroz, 2014)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Buddleja polystachya</i>	Extracto en acetato de etilo 500 mg/kg (i.p.).	Disminución de glucosa en ratón albino Swiss	Actividad antiinflamatoria Actividad hipoglucemiante	phenolicfattyacideste, 1'(4-hydroxyphenyl) ethanolester of docosanoic (1), uvaol (2), sakuranetin (3), kumatakenin (5), cirsimaritin (6), 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone (7), oleanolicacid (8), herbacetin 3,7,8-trimethyl ether (9), ursolicacid (10), verbascoside (11), linarin (12), luteolin 7-O-β-D-glucoside (13), luteolin 7-(6»-caffeoyl)-O-β-D-glucopyranoside (14), luteolin (15), and 6-O-α-L-(4'-O-trans-cinnamoyl) rhamnopyranosyl-catalpo	(Al Ati et al., 2015)
<i>Bumelia sartorum</i>	Extracto acuoso	Ratones normoglicemicos	Sangre: Glucosa ↓ Tejido: SERCA ↓		(Ruela et al., 2013)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Extracto hexánico 200 y 400 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Sangre: Glucosa ↓, Insulina ↑ Índice de sensibilidad a la insulina ↑, CT ↓, TG ↓, LDL-C ↓, Peroxidación de lípidos ↓		(Gutierrez & Flores, 2014)
<i>Cassipouia puberrima</i>	Extracto de hojas	Actividad inhibitoria de la $\alpha$ -glucosidasa vía Rx Ez	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> 436.97 ± 9.44 $\mu$ g/mL		(Dej-Adisai & Pitakbut, 2015)
<i>Caralluma tuberculata</i>	Extractos metanólico, cloroformico y butanólico	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, Mejora tolerancia a glucosa Insulina ↑		(Abdel-Sattar, Abdallah, Kheir, Abdel-Naim & Shehata, 2013)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Castanea mollissima</i>	Extracto alcohólico al 90%	Ensayos biológicos	Disminución de complicaciones antidiabéticas	Kaempferol, kaempferol-3-O-[6"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-[6"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-galactopyranoside, kaempferol-3-O-[2"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-[2"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-[2"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-[2"-O-(E)-p-coumaroyl]- $\beta$ -D-galactopyranoside, casuarinin, casuarinin castalagin	(L. Zhang et al., 2014)
<i>Caltharanthus roseus</i>	Compuesto	Actividad hipoglucemiantes en células $\beta$ -TC6 y C2C12	Vindogentianina $\downarrow$ glucosa en $\beta$ -TC6 y células C2C12 mediante la inducción de mayor captación de glucosa y la inhibición significativa <i>in vitro</i> PTP-1B. Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> $\downarrow$ de $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa	Vindogentianina, vindolina, vindolicina, vindolicina, vindolinina, perivina, serpentina	(Fiong et al., 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Centella asiatica</i>	Extracto de 1000 y 2000 mg/4 mL/Kg	Ensayo <i>in vitro</i> y rata hiperlipidémica inducidas con emulsión de lípidos	Inhibición lipasa, inhibición de $\alpha$ -glucosidasa Sangre: Glucosa ↓, TG ↓, CT ↓, ALT y AST: NS		(Supkamonseni, Thinkratok, Meksunyen & Srisawat, 2014)
<i>Cáiba pentandra</i>	Extractos acuoso y metanólico	Ensayos <i>in vitro</i>	Extracto Consumo de glucosa por el hígado ↑, DPPH EC <sub>50</sub> 87.84 y 54.77 Peroxidación lipídica +		(Fofie et al., 2014)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Extracto acuoso	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Potencial antioxidante, efecto hipoglucémico, efecto hipolipidémico	procianidinas oligoméricas	(Im et al., 2014)
<i>Citrullus colocynthis</i>	Extractos etanólico, metanólico y acuoso de 10 a 500 mg/kg	Ratas diabéticas	Sangre: Glucosa ↓		(Shi, Karim, Wang, Zhao & Murtaza, 2014)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Chlorophytum borivilianum</i>	Extracto acuoso 250 y 500 mg/kg/d	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, HbA1c ↓ TG ↓, CT ↓, Insulina ↑ Peroxidación Lipídica ↑, SOD, catalasa y GPx ↓		(Giribabu, Kumar, Rekha, Muniandy & Salleh, 2014)
<i>Chrysobalanus icaco</i>	Extracto acuoso 100, 200, y 400mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con alloxan	Sangre: Glucosa ↓, Actividad antioxidante +	tanninos, flavonas, triterpenoides, esteroides, saponinas, alcaloides	(Barbosa et al., 2013)
<i>Coptis chinensis</i>	Extracto		Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa	coptisina, epi berberina, jatrorrhizina, berberina, palmatina.	(H. Zhou et al., 2014)
<i>Coptis chinensis</i>	Extracto	Ensayo <i>in vitro</i>	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> 3.528 mg/mL	Coptisina, epiberberina, jatrorrhizina y berberina	(Ge et al., 2014)
<i>Cornus officinalis</i>	Extracto etanólico	Ratones diabéticos	Sangre: Glucosa ↓, inhibición de $\alpha$ -glucosidasa, alta actividad de captura de especies reactivas de oxígeno	loganina, morronisida, actidoursolico	(He et al., 2016)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Costus speciosus</i>	Extracto etanólico 20, 400 y 600 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Extracto 400 y 600 mg/kg Glucosa ↓, Insulina ↑, Glucocinasa ↑ (GK), Aldolasa ↑, Piruvato quinasa (PK) ↑, Succinato deshidrogenasa (SDH) ↑, Glucógeno sintasa ↑, Mayor nivel de expresión del receptor de la insulina A (IRA), GK, PK, SDH y proteína del transporte de la glucosa.		(Ali, Almaghrabi & Affi, 2014)
<i>Cucumis propheterum</i>	Extracto acuoso 0.02-0.1 mg/mL	Ensayo <i>in vitro</i>	Extracto. DPPHIC <sub>50</sub> = 73 µg/mL, Radical superóxido IC <sub>50</sub> = 101 µg/mL, α-amilasa IC <sub>50</sub> = 20.6 µg/mL, α-glucosidasa IC <sub>50</sub> = 73 µg/mL		(Gawli & Lakshmidevi, 2015)
<i>Daphniphyllum macropodium</i>	Compuesto	Ensayos <i>in vitro</i> y Ratas diabéticas inducidas con STZ	Induce diferenciación de preadipocitos 3T#-L1 de ratón, PPARγ↑, Expresión RNAm receptor × hepático↑ Sangre: Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓	1. 5,7-dihidroxi cromona	(Koo, Kwak & Kang, 2014)

*Continúa*

Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Derris reticulata</i>	Extracto acuoso	Línea celular de <i>Rattus norvegicus</i> (rata) con diabetes inducida con alloxan	Extracto DPPH IC <sub>50</sub> 12.7 ± 0.5 mg/mL, flavonoides 78,84 ± 0,01 mg GAE/g de extracto contenido catequina/g de extracto 54,72 ± 1,81. ABTS 515.05 ± 0,13 µg/mL, DPPH 239.85 ± 0,13 µg/mL FRAP 0.23 ± 0.05 µmol Fe <sup>2+</sup> /mg extracto seco α-glucosidase IC <sub>50</sub> 917.29 ± 0.13 mg/mL	Terpenoides, flavonoides, saponinas y taninos	(Kumkrai, Weerantanapan & Chudapongse, 2015)
<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	Extracto acuoso	Ratas diabéticas inducidas con alloxan	Sangre: Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓, HDLc, VLDLc ↓ Tejido: SOD ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑, GSH reductasa ↑, G6PDH ↑		(Oloyede, Bello, Ajiboye & Salawu, 2015)
<i>Distylium racemosum</i>	Extracto metanólico	Actividad inhibitoria de la α-glucosidasa	Inhibición de α-glucosidasa IC <sub>50</sub> de 22.6 ± 1.9 µg/mL.		(Prihantini, Tachibana & Itoh, 2014)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Dracaena cochinchinensis</i>	Resina roja	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Sangre Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓ Estrés oxidativo ↓, Actividad antiinflamatoria (IL-6, FNT-a y PCR)	Flavonoides	(Chen et al., 2013)
<i>Elaeocarpus sylhetris</i>	Extracto metanólico	Actividad inhibitoria de la $\alpha$ -glucosidasa	Extracto DPPH IC <sub>50</sub> 12.7 ± 0.5 mg/mL, Poder reductor (491.1 ± 6.3 mg QE g(-1) extracto seco), Peróxido de hidrogeno (IC <sub>50</sub> 65.6 ± 0.4 mg/mL, $\beta$ -caroteno (IC <sub>50</sub> 5.1 ± 1.9 mg/mL)	Contenido fenólico fue alto para ácido gallico, quercetina y rutina	(Prihantini et al., 2014)
<i>Epaltes dinaricata</i>	Extracto de Acetato de Etilo	Actividad inhibitoria de la $\alpha$ -glucosidasa	Extracto Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> de 525.20 ± 2.37 $\mu$ g/mL, DPPH IC <sub>50</sub> 560 ± 2.02 mg/mL, ON IC <sub>50</sub> 648.20 ± 2.09 mg/mL, SO <sub>2</sub> ON, IC <sub>50</sub> 361.14 ± 1.45 mg/mL	21 compuestos principalmente 2-butenamida, N-(4-fluorofenil)-3-metil transcinnamyltiglatosilano y tricolorocyclohexylsilano (36.86%).	(Glorybai, Kannan, Arasu, Al-Dhabi & Agastian, 2015)
<i>Forselia hamiltonii</i>	Extracto metanólico 300 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con alloxan	Suero: Glucosa ↓ Extracto: actividad anti-lipoxi-genasa +		(Hayat et al., 2014)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Ficus amplicissima</i>	Extracto metanólico 50 mg/kg, 100 mg/kg y 150 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓, Glucogeno hepático ↑, Peroxidación lipídica ↑		(Arunachalam & Parimelazhagan, 2013)
<i>Ficus deltoidea</i>	Extracto acuoso	Ensayos <i>in vitro</i>	Extracto: Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> de 73.33 ± 4.99 $\mu$ g/mL, Fenoles 121.62 ± 4.86 mg/g de extracto		(Misbah, Aziz & Aminudin, 2013)
<i>Galega officinalis</i>	Extracto de la planta	Ratas diabéticas inducidas con STZ en ratas	Leucocitos: E.R.O. ↓ Sangre: SOD ↑, CAT ↑, GSH peroxidasa ↑		(Lupak et al., 2015)
<i>Ginkgo biloba</i>	Extracto metanólico hojas amarillas 13.8 mg/mL, y verdes 40 mg/mL	Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> $\alpha$ -glucosidasa	Inhibition de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> de 13.6 y 13.4 $\mu$ g/mL respectivamente	Ácido ginkgólico	(Sukito & Tachibana, 2014)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Glycine max</i>	Extracto de acetato de etilo	Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> $\alpha$ -glucosidasa y ratones C57BL/6J diabéticos por dieta alta en grasa	Sangre: Glucosa↓, HbA1c↓, Insulina↓		(Kim et al., 2014)
<i>Gmelina arborea</i>	Extracto acuoso 250 y 500 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓ Peso corporal ↓ Consumo de alimento y agua ↓		(Kulkarni & Veeranjanyulu, 2013)
<i>Gouania iongapala</i>	Extracto metanólico 50, 100 y 150mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con alloxan	Suero: Glucosa ↓ 62.0, 74.8 y 75.0%, MDA ↓, SOD ↑		(Ezeja, Anaga & Asuzu, 2015)
<i>Gynura procumbens</i>	Extracto etanol-agua (95, 75, 50, 25 y 0%)	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓	Ácido clorogénico, rutina, astragalina kaempferol-3-O-rutinosido	(Algarini et al., 2013)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Hoslandia opposita</i>	Extracto oleoso 110 y 220 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con alloxan	Suero: Glucosa ↓ Tejido: Glucógeno hepático ↑arquitectura ligeramente distorsionada de células β de los islotes pancreáticos		(Akolade, Usman, Okereke & Muhammad, 2014)
<i>Impatiens balsamina</i>	Extracto etanólico del que se aislan 18 compuestos	Actividad antifibrosis hepática contra las células hepáticas murinas estrelladas (t-HSC/CI-6) y actividad antidiabética en contra de α-glucosidasa	Los compuestos 7, 8, 9 mostraron actividad inhibitoria sobre (t-HSC/CI-6) con IC <sub>50</sub> de 42,12, 109, y 34,04 μg/mL, respectivamente. Los compuestos 4,7 (IC <sub>50</sub> de 0, 72 μg/mL) 8,10,11, 17 y 18 inhibición de α-glucosidasa	Methyl 2-O-(4-hydroxybenzoyl)-4-O-β-D-glucopyranosyl-6hydroxyphenyl-acetato, butoxy 2-O-(4 hydroxyben-zoyl)-4,6 dihydroxy-phenyl-acetato. 6-O pcou-maroyl)-β-D-gluco-pyranosyl-2-O-(4-hydroxy-benzoyl)-4-O-β-Dglucopyra-nosyl-6 hydroxy-phenylacetato. Acido 4-O-β-Dglucopyra-nosyl-2,6 dihydroxy-phenyl-acetic, kaempferol, querce-tina, dihydromyri-cetina, myricetina	(Li et al., 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Ixeris gracilis</i>	Extracto metanólico al 80% (250-1000 mg/Kg)	Ratones normoglicémicos	Suero: Glucosa ↓, Mejora tolerancia a la glucosa Extracto: Radicales libres (IC <sub>50</sub> 57.544 µg/mL), polifenoles (76.269 ± 0.204 mg GAE/g peso seco glicógeno hepático : SOD ↑, GSH peroxidasa ↑, Mejora los niveles de FNT alfa		(Syiem & Warri, 2015)
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Extracto crudo	Diabetes mellitus tipo 2 en ratón	Suero: Glucosa ↓, Mejora tolerancia a la glucosa	Flavanona	(Granados, Balcazar, Guillén & Echeverri, 2015)
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Fracción diclorometano 5 y 10 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, HbA1c ↓, Insulina ↓, PL ↓		(Patil, Dongare, Kulkarni, Joglekar & Arvindekar, 2013)
<i>Khaya senegalensis</i>	Extractos de acetato de etilo, etanol y agua	Ensayo <i>in vitro</i>	Inhibición de α-glucosidasa IC <sub>50</sub> 2.89 ± 0.46 µg/mL Inhibición de α-amilasa IC <sub>50</sub> 97.51 ± 5.72 µg/mL	cromonas, p-aminofenol y 3-etil-5- (3-etil- (3H) benzotiazol-2-ildien) -2- (p-tolil vinilo-imino) -4-tiazoli-dinona	(Ibrahim, Koorbanally & Islam, 2014)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Merremia emarginata</i>	Extracto metanólico a 100, 200 y 400 mg/kg	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Sangre: Glucosa ↓, BUN ↓, CREAT ↓, Insulina ↑, Proteínas ↑, Hemoglo-bina ↑, HbA1C ↓ Extracto Hexoquinasa ↑, Fructosa 1-6 bifosfatasa ↓, Glucosa 6 fosfatasa ↓ Tejido: Regeneración de células β del páncreas.		(Gandhi & Sasikumar, 2012)
<i>Morus Alba</i>	Extracto 1g/kg/d	Ratas diabéticas con STZ	Sangre: Glucosa ↓, Insulina ↑ Extracto: Glucocinasa ↑		(Nazari, Hajizadeh, Mahmoodi, Mirzaei & Hassanshahi, 2013)
<i>Nerium oleander</i>	Extracto metanólico 50 y 200 mg/kg	Ratones diabéticos con alloxan	Suero: Glucosa ↓ (73.78%), Mejora tolerancia a la glucosa, CT ↓, TG ↓ Extracto: Peroxidación de lípidos ↓, Normalización del glicógeno hepático		(Dey et al., 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Nigella sativa</i>		Pacientes con diabetes tipo 2	Glucosa ( $180 \pm 5.75$ a $180 \pm 5.59$ en control vs $195 \pm 6.57$ a $172 \pm 5.83$ grupo con NS), HbA1c ( $8.2 \pm 0.12$ a $8.5 \pm 0.14$ control vs $8.6 \pm 0.13$ a $8.2 \pm 0.14$ en NS), TBARS ( $48.3 \pm 6.89$ a $52.9 \pm 5.82$ en control vs $54.1 \pm 4.64$ a $41.9 \pm 3.16$ en NS)		(Kaarabi et al., 2015)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Fraciones: Og1-S (300 mg/kg), Og1-A (240 mg/kg) aOg1-B (80 mg/kg)	Ratones diabéticos con STZ	Fraciones redujeron la glicemia: 63%, 76% y 60% (en 120 min) respectivamente.	Acido L-caftarico, Acido L-chicorico, Eugenyl- $\beta$ -D-glucopyranosido, Vicenina-2 (4)	(Casanova et al., 2014)
<i>Otostegia aucheri</i>	Extracto metanólico	Ratas diabéticas con STZ	Extracto DPPH ( $IC_{50}$ 2.23 $\mu$ g/ml) Suero: Glucosa $\downarrow$		(Rashid, Murtaza, Khan & Mir, 2014)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Origanum vulgare</i>	Extracto metanólico	Ratones C57BL/6 diabéticos con STZ	Extracto Atenuación de respuesta proinflamatoria mediada por células T17 Incrementa una respuesta antiinflamatoria por células T2. Incrementa una Preservación de células $\beta$ <i>in vitro</i> de la apoptosis bloqueando la caspasa	Ácido rosmarínico	(Vujcic et al., 2015)
<i>Otostegia integrifolia</i>	Extracto hidroalcohólico 100, 200 y 400 mg	Ratas Wistar diabéticas inducidas con STZ ((antidia-betes) y ratón Swiss albino (hipoglucemiantes))	Suero (antidiabetes): Glucosa ↓ (Extracto 100 y 200 mg/kg) Suero (hipoglucemiantes): Glucosa ↓ (Extracto 200 mg/kg)		(Shewamene, Abdelwuhab & Birhanu, 2015)
<i>Passiflora nitida</i>	Extracto hidroetanólico	Ensayo <i>in vitro</i> y ratones diabéticos con alloxan	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa IC <sub>50</sub> 6.78 $\mu$ g/mL Inhibición de $\alpha$ glucosidasa IC <sub>50</sub> de 93.36 $\mu$ g/mL, Glucosa ↓, CT ↓, TBARS ↓		(Montefusco-Pereira et al., 2013)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Penthorum chinense</i>	Extracto a dosis de 150 y 300 mg/kg/d	Ratas Wistar diabéticas inducidas con STZ	Suero: HbA1c ↓, TG ↓, CT ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑, Insulina ↑, Mejora la curva de tolerancia a la glucosa	Polifenoles: Pinocembrin-7-O-[4'',6''-hexahydroxydiphenoyl]-β-d-glucosa. Pinocembrin-7-O-[3''-O-galloyl-4'',6''-hexahydroxydiphenoyl]-β-d-glucosa. Thonningianina A	(Huang et al., 2015)
<i>Piper longum</i>	Extracto acuoso 200 mg/kg	Ratas Wistar diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, HbA1c ↓, TG ↓, CT ↓, LDL-C ↓, HDL-C ↑		(Nabi et al., 2013)
<i>Pliosipalus curviflorus</i>	Extracto y suspensión de nanopartículas	Ratas Wistardiabéticas inducidas con STZ	Suero (antidiabetes) Glucosa ↓, Resistencia a insulina ↓, Actividad antioxidante positiva		(Aldawsari, Hanafy, Labib & Badr, 2014)

*Continúa*

Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Polygonatum odoratum</i>	Extracto de acetatoetil-éter-metanol-agua		Compuestos 2 y 4 presentaron una inhibición de $\alpha$ -glucosidasa $IC_{50}$ de 2.3 y 2.7 $\mu$ g/ml respectivamente	N-cis-feruloyloctopamina (1); N-trans-p coumaroyloctopamina, N-trans-feruloyloctopamina, N-trans-p-coumaroyl-tyramina, N-trans-feruloyltyramina, (3R)-5,7-dihydroxyl-3-(2',4'-dihydroxyl-benzyl)-chroman-4-ona,(3R)-5,7-dihydroxyl-6-methyl-3-(4'-hydroxylbenzyl)-chroman-4-ona (7), (3R)-5,7-dihydroxyl-6-methyl-8-methoxyl-3-(4'-hydroxylbenzyl)-chroman-4-ona, (3R)-5,7-dihydroxyl-6,8-dimethyl-3-(4'-hydroxylbenzyl)-chroman-4-ona	(Zhou et al., 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Portulaca oleracea</i>	Extracto	Células HepG2 y Ratones C57BL/6J diabéticas con STZ	Células: Incremento el consumo de glucosa extracelular Suero: Glucosa ↓, Mejora la CTG, Incrementa insulina ↑ (p<0.05) Incrementa actividad antioxidante (p<0.01)		(Gu et al, 2015)
<i>Phyllanthus amarus</i>	Extracto 200 y 400 mg/kg	Ratas diabéticas con alloxan	Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓	Flavonoides y compuestos fenólicos	(Adedapo & Ofuegbe, 2014)
<i>Pterocarpus marsipium</i>	Extracto etanólico 100 mg/kg	Ratas diabéticas con STZ	Suero: Glucosa ↓, Mejora la CTG ↓, Insulina ↑	Fenoles, C-glicosidos	(Mishra et al, 2013)
<i>Pueraria lobata</i>		Ratones diabéticos con STZ	Suero: Glucosa ↓, Insulina ↑, Participación de la proteína intrapancreática de sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1) y factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), mRNA de receptor de insulina esquelético muscular (InsR) y PPAR ↑	Puerarina	(Wu et al, 2013)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Rhododendron arboreum</i>	Extracto etanólico	Ratas normales y diabéticas con STZ	Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, HbA1c ↓, Creatinina ↓, Urea ↓, Insulina ↑, CT ↓, TG ↓, LDL ↓, VLDL ↓		(N. Verma, Amresh, Sahu, Rao & Singh, 2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Extracto acuoso 200 mg/kg	Ratas diabéticas con STZ	Suero (hipoglucemiante): AST ↓, ALT ↓, FA ↓, Albumina ↑, PT ↑		(Ramadan, Khalil, Danial, Alnahdi & Ayaz, 2013)
<i>Salacia chinensis</i>	Extracto Acuoso de 0.25 y 0.50%	Modelo de Diabetes tipo 2 en ratón	Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, HbA1c ↓ Extracto Inhibición de $\alpha$ glucosidasa (IC <sub>50</sub> = 3.9-4.9 $\mu$ M para maltasa)	Salacinol, Kotalanol, neokotalanol	(Morikawa et al., 2015)
<i>Sarandra glabra</i>	Polisacárido de la planta 150, 300 y 600 mg/kg	Ratones diabéticos inducidas con STZ	Inhibición de $\alpha$ glucosidasa con IC <sub>50</sub> 87.06 $\pm$ 11.76 $\mu$ g/mL Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓ Ácidos grasos libres ↓ Actividad hexoquinasa ↑, Actividad piruvato quinasa ↑		(W. Liu, Zheng, Zhang, Yao & Gao, 2014)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Extracto	Inhibición de $\alpha$ -glucosidase <i>in vitro</i>	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa	Baicaléina, wogonina, chrysin, oroxylin	(Yang, Luo & Kong, 2015)
<i>Semecarpus amacardium</i>	Extracto etanólico 100, 200 y 400 mg	Ratas Long Evans diabéticas inducidas con alloxan (120 mg/kg)	Suero: AST ↓, ALT ↓, CT ↓, TG ↓, LDL ↓ Tejido: Glucogeno hepático ↑ Extracto DPPH IC <sub>50</sub> 72.24 mg/mL	Esteroides, triterpe-noides, flavonoides, glucósidos, saponinas y taninos	(J. Wang et al., 2015)
<i>Senna surattensis</i>	Extracto etanólico	Modelo de rata con hemidiafragma y ensayos <i>in vitro</i>	Suero: Glucosa ↓ Extracto Maltasa IC <sub>50</sub> 209.15 mg/mL, Sucrasa IC <sub>50</sub> 366.44mg/mL, $\alpha$ -amilasa IC <sub>50</sub> 123.95 mg/mL, Fenoles 98 mg de pirocatecol/mg		(Thilagam, Parimaladevi, Kumarappan & Mandal, 2013)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Sida cordata</i>	Extracto con acetato de etilo	Ratas diabéticas con alloxan	Suero: Glucosa ↓, CT ↓, TG ↓ Extracto TBARS ↑, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑, Nitritos ↑, Glutatio <sup>n</sup> ↑		(Shah & Khan, 2014)
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Extracto acuoso 0.76 g/kg	Ratas diabéticas con STZ	Suero (hipoglucemiante): Glucosa, CT ↓, VLDL-C ↓, LDL-C ↓, TG ↓, ALT ↓, HDL, LDH, Urea y creatinina NS		(Oliveira, Braga & Fernandes, 2013)
<i>Smilax aristolochifolia</i>	Extracto y compuesto	Modelo animal	Suero: Glucosa ↓, TG ↓ Resistencia a la insulina ↓, Citocinas proinflamatorias ↓	N-trans-feruloyl tiramina	(Amaro et al., 2014)
<i>Stenochlaena palustris</i>	Extracto metanólico	Actividad inhibitoria de glucosidasa	Extracto DPPH IC <sub>50</sub> 7.7 mg/mL Peróxido de hidro-geno (IC <sub>50</sub> 838 mg/mL), FT correlacionó con actividad antioxidante (r = 0.76), AH correlacionó con actividad antiglicosidasa (r = 0.86)	Fenoles totales (FT) y ácido hydroxy-cinnamico (AH)	(Chai, Kwek, Ong & Wong 2015)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Sweria corymbosa</i>	Extracto de éter de petróleo y acetato de etilo a 50 mg/kg	Ratas diabéticas con STZ	Suero: Glucosa ↓, HbA1c ↓, ALT ↓, AST ↓, FA ↓, BUN, CREAT ↓, insulina ↑, CT, TG, VLDL-C ↓ y HDL-C ↑	1.- 1, 2, 8-trihidroxi-6-metoxi xantonas (1) 2.- 1, 2-dihidroxi-6-metoxi-xantonas 8-O-β-D-xilopiranosil (2) cts	(Mahendran et al., 2014)
<i>Sweria kouitchensis</i>	Extracto etanólico	Ratones normoglicémicos y estudios <i>in vitro</i>	Extracto Inhibición de α-glu-cosidasa, inhibición de α-amilasa, Secreción de insulina ↑		(Wan et al., 2013)
<i>Sweria kouitchensis</i>	Fracción butanólica	Ensayo <i>in vitro</i>	Compuestos 2, 4, 5, 6, 11, 12 y 13 Inhibición de α-glu-cosidasa (IC <sub>50</sub> 126–451 μM)	Diez nuevos glicósidos de xantonas, Kouitchensidos (1-10)	(Wan et al., 2013)
<i>Symplocos cochinchinensis</i>	Extracto etanólico	Ensayos <i>in vitro</i>	Extracto Inhibición de α-glu-cosidasa (IC <sub>50</sub> 82,07 ± 2,10 mg/mL), Captación de glucosa dependiente de insulina ↑, T ↓	β-sitosterol, glucósido de floretrina 2, ácido oleanólico	(Antu et al., 2014)
<i>Telitaria occidentalis</i>	Extracto acuoso	Ensayo <i>in vitro</i>	Extracto Inhibición de α-glu-cosidasa Inhibición de α-amilasa		(Oboh, Akinyemi & Ademiluyi, 2012)

*Continúa*

## Continuación

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Terminalia chebula</i>	Ácido chebulagico	Adipocitos	Mejora de señalización PPAR, mejora adipogénesis, incrementa la expresión de GLUT4, Incrementa la secreción de adiponectina, incrementa la expresión de mRNA del gen diana de PPAR/C/EBP- $\alpha$ en adipocitos.	Ácido chebulagico	(Shyni et al., 2014)
<i>Terminalia paniculata</i>	Extracto acuoso	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, HbA1c ↓, AST ↓, ALT ↓, Creatinina ↓, Urea ↓ Hemoglobina ↑, Insulina ↑, PT ↑		(Ramachandran, Rajasekaran, & Manisenthilkumar, 2012)
<i>Trigonella foenum</i>	Extracto	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero (hipoglucemiante): Glucosa ↓, TG ↓, CT ↓, Insulina ↑		(Swaroop et al., 2014)

Planta	Tipo y dosis de extracto	Modelo experimental	Resultados (contra el control positivo de daño)	Compuestos aislados	Referencia
<i>Turbinaria ornata</i>	Extracto metanólico y extracto con acetona	Ensayos <i>in vitro</i>	$\alpha$ -amilasa ( $IC_{50}$ , 250.9 g/mL), $\alpha$ -glucosidasa (535.6 g/mL), dipeptidil peptidasa-4 (55.2 mg/mL)	hentriacontane, z, z-6, 28-heptatriacontadien-2-ona, 8-heptadeceno y 1-heptacosanol	(Umnikrishnan, Suthindhiran & Jayasri, 2014)
<i>Vaccinium bracteatum</i>	Polisacárido	Ratas diabéticas inducidas con STZ	Suero: Glucosa ↓, Insulina ↑		(L. Wang et al., 2013)

Abreviaturas: STZ, streptozotocina; RNAm, ácido ribonucleico mensajero; FNT- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; IL, interleucina; SOD, superóxido dismutasa; GSH, glutatión; MDA, malondialdehído; BUN, nitrógeno de la urea; CREAT, creatinina; CAT, catalasa; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HbA1C, hemoglobina glucosilada; LDH, lactato deshidrogenasa; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartatoaminotransferasa; FA, fosfatasa alcalina; LDL-C, lipoproteínas de baja densidad; HDL-C, lipoproteínas de alta densidad VLDL-C, lipoproteínas de muy baja densidad; PT, protinas totales; PL, perfil de lípidos G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno; MPO, mieloperoxidasa; TBARS, especies reactivas de ácido tiobarbitúrico;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno; FT, fenoles totales; CTG, curva de tolerancia a la glucosa; GLP, péptido ligado a glucagón; SO radical superóxido; ON oxido nítrico; SERCA sarco/retículo endoplasmico Ca+2-ATP asa; N.S., no significativo, ↑ Incremento; ↓ disminución, Rx reacción.

Tabla 1. Plantas con actividad hipoglucemiante evaluadas en diferentes modelos experimentales

## 8.4. Conclusión

En la revisión realizada se encontró que los principales inductores de diabetes experimental fueron la estreptozotacina, el alloxan y una dieta alta en grasa, mientras que los controles farmacéuticos más utilizados fueron la glibenclamida y la metformina. Estos modelos de daño principalmente fueron realizados en animales de experimentación con ratas y ratones. Los principales mecanismos hipoglucemiantes encontrados en esta revisión fueron la inhibición de enzimas como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa; así como la reducción en los niveles de glucosa sérica, enzimas hepáticas, perfil de lípidos, insulina y glucógeno hepático fueron los parámetros con mayor frecuencia para evaluar la actividad de los extractos con potencial hipoglucemiante; además de la disminución de diversos mediadores de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) y una restauración de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) y actividad antioxidante a través del DPPH.

Los principales metabolitos secundarios reportados con actividad hipoglucemiante fueron: taninos, flavonas, triterpenoides, esteroides, saponinas y alcaloides entre otros.

## Referencias

- Abdel-Sattar, E.A., Abdallah, H.M., Khedr, A., Abdel-Naim, A.B., & Shehata, I.A. (2013). Antihyperglycemic activity of *Caralluma tuberculata* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 111-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.060>
- Adedapo, A.A., & Ofuegbe, S.O. (2014). The evaluation of the hypoglycemic effect of soft drink leaf extract of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25(1), 47-57. <http://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0033>
- Aftab-Hossain, M.A, Mostofa, M., Abdul-Awal M., Haque-Chowdhury, E., & Hasan-Sikder, M. (2014). and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with aqueous extracts of *Momordica charantia* (karela) fruits. *Histomorphological*, 4(Suppl 2). [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60710-6](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60710-6)

- Agrawal, R., Sethiya, N.K., & Mishra, S.H. (2013). Antidiabetic activity of alkaloids of *Aerva lanata* roots on streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes in rats. *Pharmaceutical biology*, 51(5), 635-642. <http://doi.org/10.3109/13880209.2012.761244>
- Akolade, J.O., Usman, L.A., Okereke, O.E., & Muhammad, N.O. (2014). Antidiabetic potentials of essential oil extracted from the leaves of *Hoslundia opposita* Vahl. *Journal of Medicinal Food*, 17(10), 1122-1128. <http://doi.org/10.1089/jmf.2013.0118>
- Al Ati, H.Y., Fawzy, G.A., El Gamal, A.A., Khalil, A.T., El Din El Tahir, K., Abdel-Kader, M.S., & Gilani, A.-H. (2015). Phytochemical and biological evaluation of *Buddleja polystachya* growing in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(4 Suppl), 1533-1540.
- Aldawsari, H.M., Hanafy, A., Labib, G.S., & Badr, J.M. (2014). Antihyperglycemic activities of extracts of the mistletoes *Plicosepalus acaciae* and *P. curviflorus* in comparison to their solid lipid nanoparticle suspension formulations. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 69(9-10), 391-398.
- Algariri, K., Meng, K.Y., Atangwho, I.J., Asmawi, M.Z., Sadikun, A., Murugaiyah, V. et al. (2013). Hypoglycemic and anti-hyperglycemic study of *Gynura procumbens* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 358-366. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60077-5](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60077-5)
- Ali, H.A., Almaghrabi, O.A., & Affi, M.E. (2014). Molecular mechanisms of anti-hyperglycemic effects of *Costus speciosus* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Medical Journal*, 35(12), 1501-1506.
- Amaro, C.A.B., Gonzalez-Cortazar, M., Herrera-Ruiz, M., Roman-Ramos, R., Aguilar-Santamaria, L., Tortoriello, J. et al. (2014). Hypoglycemic and hypotensive activity of a root extract of *Smilax aristolochiifolia*, standardized on N-trans-feruloyl-tyramine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 11366-11384. <http://doi.org/10.3390/molecules190811366>
- Antu, K.A., Riya, M.P., Mishra, A., Anilkumar, K.S., Chandrakanth, C.K., Tamrakar, A.K. et al. (2014). Antidiabetic property of *Symplocos cochinchinensis* is mediated by inhibition of alpha glucosidase and enhanced in-

- ulin sensitivity. *PloS One*, 9(9), e105829. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0105829>
- Arunachalam, K., & Parimelazhagan, T. (2013). Antidiabetic activity of *Ficus amplicissima* Smith. bark extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 302-310. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.004>
- Ascaso, J.F. (2014). Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. *Medicina Clínica*, 143(03), 117-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.041>
- Assad, T., Khan, R.A., & Feroz, Z. (2014). Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic activity of methanol extract of *Brassica oleracea*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(9), 648-653. [http://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60099-6](http://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60099-6)
- Barbosa, A.P.O., Silveira, G.O., de Menezes, I.A. C., Rezende-Neto, J.M., Bitenfurt, J.L.C., Estavam, C.D.S. et al. (2013). Antidiabetic effect of the *Chrysobalanus icaco* L. aqueous extract in rats. *Journal of Medicinal Food*, 16(6), 538-543. <http://doi.org/10.1089/jmf.2012.0084>
- Bekir, J., Cazaux, S., Mars, M., & Bouajila, J. (2016). *In vitro* anti-cholinesterase and anti-hyperglycemic activities of flowers extracts from seven pomegranate varieties. *Industrial Crops and Products*, 81, 176-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.066>
- Casanova, L.M., da Silva, D., Sola-Penna, M., de Magalhães-Camargo, L.M., de Moura-Celestrini, D., Tinoco, L.W. et al. (2014). Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from *Ocimum gratissimum* leaf extract in a biomonitoring *in vivo* study. *Fitoterapia*, 93, 132-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.12.024>
- Chai, T.-T., Kwek, M.-T., Ong, H.-C., & Wong, F.-C. (2015). Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent alpha-glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity. *Food Chemistry*, 186, 26-31. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.099>
- Chen, F., Xiong, H., Wang, J., Ding, X., Shu, G., & Mei, Z. (2013). Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats.

- Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 729-736. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.035>
- Chen, J., Wu, Y., Zou, J., & Gao, K. (2016).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition and anti-hyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, 1488-1494. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.018>
- Cui, J., Gu, X., Wang, F., Ouyang, J., & Wang, J. (2015). Purification and structural characterization of an alpha-glucosidase inhibitory polysaccharide from apricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam.) pulp. *Carbohydrate Polymers*, 121, 309-314. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.065>
- Dehghan, H., Sarrafi, Y., & Salehi, P. (2016). Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 179-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.010>
- Dej-Adisai, S., & Pitakbut, T. (2015). Determination of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28, 1679-1683.
- Dey, P., Saha, M.R., Chowdhuri, S.R., Sen, A., Sarkar, M.P., Haldar, B. et al. (2015). Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant *Nerium oleander* through alloxan induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 128-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.012>
- Esteve Ràfols, M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
- Ezeja, M.I., Anaga, A.O., & Asuzu, I.U. (2015). Antidiabetic, antilipidemic, and antioxidant activities of *Gouania longipetala* methanol leaf extract in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 605-614. <http://doi.org/10.3109/13880209.2014.935864>
- Fofe, C.K., Wansi, S.L., Nguelefack-Mbuyo, E.P., Atsamo, A.D., Watcho, P., Kamanyi, A. et al. (2014). *In vitro* anti-hyperglycemic and antioxidant properties of extracts from the stem bark of *Ceiba pentandra*. *Journal of Com-*

*plementary & Integrative Medicine*, 11(3), 185-193. <http://doi.org/10.1515/jcim-2014-0031>

Gandhi, G.R., & Sasikumar, P. (2012). Antidiabetic effect of *Merremia emarginata* Burm. F. in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4), 281-286. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60023-9](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60023-9)

Gawli, K., & Lakshmidēvi, N. (2015). Antidiabetic and antioxidant potency evaluation of different fractions obtained from *Cucumis prophetarum* fruit. *Pharmaceutical Biology*, 53(5), 689-694. <http://doi.org/10.3109/13880209.2014.937503>

Ge, A., Bai, Y., Li, J., Liu, J., He, J., Liu, E. et al. (2014). An activity-integrated strategy involving ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and fraction collector for rapid screening and characterization of the alpha-glucosidase inhibitors in *Coptis chinensis* Franch. (Huanglian). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 100, 79-87. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.07.025>

Ghosh, S., & Rangan, L. (2015). Molecular docking and inhibition kinetics of alpha-glucosidase activity by labdane diterpenes isolated from tora seeds (*Alpinia nigra* B.L. Burtt.). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1477-1489. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-1366-4>

Giribabu, N., Kumar, K.E., Rekha, S.S., Muniandy, S., & Salleh, N. (2014). *Chlorophytum borivilianum* root extract maintains near normal blood glucose, insulin and lipid profile levels and prevents oxidative stress in the pancreas of streptozotocin-induced adult male diabetic rats. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1172-1184. <http://doi.org/10.7150/ijms.9056>

Glorybai, L., Kannan K.B., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., & Agastian, P. (2015). Some biological activities of *Epaltes divaricata* L. An *in vitro* study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14, 18. <http://doi.org/10.1186/s12941-015-0074-4>

Granados, S., Balcázar, N., Guillén, A., & Echeverri, F. (2015). Evaluation of the hypoglycemic effects of flavonoids and extracts from *Jatropha gossypifolia* L. *Molecules*, 20(4), 6181-6193. <http://doi.org/10.3390/molecules20046181>

- Gu, J.-F., Zheng, Z.-Y., Yuan, J.-R., Zhao, B.-J., Wang, C.-F., Zhang, L. et al. (2015). Comparison on hypoglycemic and antioxidant activities of the fresh and dried *Portulaca oleracea* L. in insulin-resistant HepG2 cells and streptozotocin-induced C57BL/6J diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 214-223. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.002>
- Gutierrez, R.M.P., & Flores, J.M.M. (2014). Effect of Chronic Administration of Hexane Extract of *Byrsonima Crassifolia* Seed on B-Cell and Pancreatic Oxidative Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11(2), 231-236. <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v11i2.1>
- Hayat, M.M., Sarwar, S., Anjum, S., Uzair, M., Farhan-Rasheed, H.M., Jabeen, Q. et al. (2014). Anti-diabetic and spasmolytic potential of *Farsetia hamiltonii* Royle from Cholistan desert. *Journal of Ethnopharmacology*, 156, 347-352. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.038>
- He, K., Song, S., Zou, Z., Feng, M., Wang, D., Wang, Y. et al. (2016). The Hypoglycemic and Synergistic Effect of Loganin, Morroniside, and Ursolic Acid Isolated from the Fruits of *Cornus officinalis*. *Phytotherapy Research: PTR*, 30(2), 283-291. <http://doi.org/10.1002/ptr.5529>
- Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J.M., & Williamson, G. (2015). Inhibition of human  $\alpha$ -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 19, 723-732. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.003>
- Hu, X., Cheng, D., Wang, L., Li, S., Wang, Y., Li, K. et al. (2015). Evaluation of anti-hyperglycemic effect of *Actinidia kolomikta* (Maxim. etRur.) Maxim. root extract. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(3 Suppl), 1135-1140.
- Huang, D., Jiang, Y., Chen, W., Yao, F., Huang, G., & Sun, L. (2015). Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 256-263. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.014>
- Hussin, F.R.M., Vitor, R.J.S., Joaquin, J.A.O., Clerigo, M.M., & Paano, A.M. C. (2016). Anti-hyperglycemic effects of aqueous *Lenzites betulina* extracts from the Philippines on the blood glucose levels of the ICR mice (*Mus mus-*

- culus). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 155-158. <http://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.013>
- Ibrahim, M.A., Koorbanally, N.A., & Islam, M.S. (2014). Antioxidative activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes (alpha-glucosidase and alpha-amylase) by *Khaya senegalensis*. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 64(3), 311-324. <http://doi.org/10.2478/acph-2014-0025>
- Im, K., Issac, A., Nm, J., Ninan, E., Maliakel, B., & Kuttan, R. (2014). Effects of the polyphenol content on the anti-diabetic activity of *Cinnamomum zeylanicum* extracts. *Food & Function*, 5(9), 2208-2220. <http://doi.org/10.1039/c4fo00130c>
- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B.D. (2015). PPAR gamma gene - A review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E. et al. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 36-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.052>
- Kaatabi, H., Bamosa, A.O., Badar, A., Al-Elq, A., Abou-Hozafa, B., Lebda, F. et al. (2015). *Nigella sativa* improves glycemic control and ameliorates oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: placebo controlled participant blinded clinical trial. *Plos One*, 10(2), e0113486. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113486>
- Kabir, A.U., Samad, M. Bin, Ahmed, A., Jahan, M.R., Akhter, F., Tasnim, J. et al. (2015). Aqueous Fraction of *Beta vulgaris* Ameliorates Hyperglycemia in Diabetic Mice due to Enhanced Glucose Stimulated Insulin Secretion, Mediated by Acetylcholine and GLP-1, and Elevated Glucose Uptake via Increased Membrane Bound GLUT4 Transporters. *Plos One*, 10(2), e0116546. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0116546>
- Kazeem, M.I., Akanji, M.A., & Yakubu, M.T. (2015). Amelioration of pancreatic and renal derangements in streptozotocin-induced diabetic rats by polyphenol extracts of Ginger (*Zingiber officinale*) rhizome. *Pathophysiology*. <http://doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.08.004>

- Kim, U.H., Yoon, J.H., Li, H., Kang, J.H., Ji, H.S., Park, K.H. et al. (2014). Pterocarpan-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in type 2 diabetic mice. *Molecules*, 19(11), 18493-18510. <http://doi.org/10.3390/molecules191118493>
- Koo, H.J., Kwak, J.H., & Kang, S.C. (2014). Anti-diabetic properties of *Daphniphyllum macropodum* fruit and its active compound. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(8), 1392-1401. <http://doi.org/10.1080/09168451.2014.923289>
- Kulkarni, Y.A., & Veeranjanyulu, A. (2013). Effects of *Gmelina arborea* extract on experimentally induced diabetes. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 602-608. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60104-2](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60104-2)
- Kumkrai, P., Weeranantanapan, O., & Chudapongse, N. (2015). Antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and sub-chronic toxicity of *Derris reticulata* extract: its antidiabetic potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-10. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0552-4>
- Li, Q., Zhang, X., Cao, J., Guo, Z., Lou, Y., Ding, M., & Zhao, Y. (2015). Depside derivatives with anti-hepatic fibrosis and anti-diabetic activities from *Impatiens balsamina* L. flowers. *Fitoterapia*, 105, 234-239. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.007>
- Liu, C., Wang, Y., Lu, H., & Chiang, W. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry*, 4-8. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.009>
- Liu, W., Zheng, Y., Zhang, Z., Yao, W., & Gao, X. (2014). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of *Sarcandra glabra* polysaccharide in type 2 diabetic mice. *Food & Function*, 5(11), 2850-2860. <http://doi.org/10.1039/c4fo00430b>
- Lupak, M.I., Khokhla, M.R., Hachkova, G.Y., Kanyuka, O.P., Klymyshyn, N.I., Chajka, Y.P. et al. (2015). The alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract prevents oxidative stress under experimental diabetes mellitus. *Ukrainian biochemical journal*, 87(4), 78-86. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj87.04.078>

- Mahendran, G., Manoj, M., Muruges, E., Sathish-Kumar, R., Shanmughavel, P., Rajendra Prasad, K.J. et al. (2014). *In vivo* anti-diabetic, antioxidant and molecular docking studies of 1, 2, 8-trihydroxy-6-methoxy xanthone and 1, 2-dihydroxy-6-methoxyxanthone-8-O-beta-D-xylopyranosyl isolated from *Swertia corymbosa*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 21(11), 1237-1248. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.06.011>
- Majouli, K., Hlila, M.B., Hamdi, A., Flamini, G., Jannet, H. Ben et al. (2015). Antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). *Industrial Crops & Products*, 82, 23-28. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.015>
- Misbah, H., Aziz, A.A., & Aminudin, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1-12. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-118>
- Mishra, A., Srivastava, R., Srivastava, S. P., Gautam, S., Tamrakar, A. K., Maurya, R. et al. (2013). Antidiabetic activity of heart wood of *Pterocarpus marsupium* Roxb. and analysis of phytoconstituents. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(5), 363-374.
- Mondal, A., Guria, T., & Maity, T.K. (2015). A new ester of fatty acid from a methanol extract of the whole plant of *Amaranthus spinosus* and its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 600-604. <http://doi.org/10.3109/13880209.2014.935863>
- Montefusco-Pereira, C.V., de Carvalho, M.J., de Araujo Boleti, A.P., Teixeira, L.S., Matos, H.R., & Lima, E.S. (2013). Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1367-1378. <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0271-6>
- Morikawa, T., Akaki, J., Ninomiya, K., Kinouchi, E., Tanabe, G., Pongpiriyadacha, Y. et al. (2015). Salacinol and related analogs: New leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the Thai traditional natural medicine *Salacia chinensis*. *Nutrients*, 7(3), 1480-1493. <http://doi.org/10.3390/nu7031480>

- Nabi, S.A., Kasetti, R.B., Sirasanagandla, S., Tilak, T.K., Kumar, M.V.J., & Rao, C. A. (2013). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Piper longum root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 37. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-37>
- Nazari, M., Hajizadeh, M.R., Mahmoodi, M., Mirzaei, M.R., & Hassanshahi, G. (2013). The regulatory impacts of Morus Alba leaf extract on some enzymes involved in glucose metabolism pathways in diabetic rat liver. *Clinical Laboratory*, 59(5-6), 497-504.
- Oboh, G., Akinyemi, A.J., & Ademiluyi, A.O. (2012). Inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase activities by ethanolic extract of Telfairia occidentalis (fluted pumpkin) leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 733-738. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60219-6](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60219-6)
- Oche, O., Sani, I., Chilaka, N.G., Samuel, N.U., & Samuel, A. (2014). Pancreatic islet regeneration and some liver biochemical parameters of leaf extracts of Vitex doniana in normal and streptozotocin-induced diabetic albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60220-3](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60220-3)
- Oliveira, G.O., Braga, C.P., & Fernandes, A.A.H. (2013). Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [Smallanthus sonchifolius (Poepp.& Endl.)] treatment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 256-260. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
- Oloyede, H.O.B., Bello, T.O., Ajiboye, T.O., & Salawu, M.O. (2015). Antidiabetic and antidyslipidemic activities of aqueous leaf extract of Dioscoreophyllum cumminsii (Stapf) Diels in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 166, 313-322. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.049>
- Ovalle-Magallanes, B., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., & Mata, R. (2015). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from Swietenia humilis. *Phytochemistry*, 110, 111-119. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.004>
- Patil, S.B., Dongare, V.R., Kulkarni, C.R., Joglekar, M.M., & Arvindekar, A.U. (2013). Antidiabetic activity of Kalanchoe pinnata in streptozotocin-induced

- diabetic rats by glucose independent insulin secretagogue action. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1411-1418. <http://doi.org/10.3109/13880209.2013.794364>
- Pratap, R., Nishanth, S., Manju, S., Abdul, S., & Dileep, B.S. (2015). *In vitro* alpha-glucosidase inhibition, antioxidant, anticancer, and antimycobacterial properties of ethyl acetate extract of *Aegle tamilnadensis* Abdul Kader (Rutaceae) leaf. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 1247-1261. <http://doi.org/10.1007/s12010-014-1335-y>
- Prihantini, A.I., Tachibana, S., & Itoh, K. (2014). Evaluation of antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of some subtropical plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 17(10), 1106-1114. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2014.1106.1114>
- Radenkovi, M., Stojanovi, M., & Prostran, M. (2016). Journal of Pharmacological and Toxicological Methods Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art, 78, 13-31. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Ramachandran, S., Rajasekaran, A., & Manisenthilkumar, K.T. (2012). Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4), 262-268. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60020-3](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60020-3)
- Ramadan, K.S., Khalil, O.A., Danial, E.N., Alnahdi, H.S., & Ayaz, N.O. (2013). Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(4), 779-783. <http://doi.org/10.1007/s13105-013-0253-8>
- Rashid, R., Murtaza, G., Khan, A.K., & Mir, S. (2014). Antioxidant and hypoglycemic effect of *Otostegia aucheri* methanolic extract in streptozotocin-induced diabetic male long-Evans rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 71(4), 631-635.
- Richard, A.J., Burris, T.P., Sanchez-Infantes, D., Wang, Y., Ribnicky, D.M., & Stephens, J.M. (2014). Artemisia extracts activate PPARgamma, promote adipogenesis, and enhance insulin sensitivity in adipose tissue of obese mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(7-8 Suppl), S31-6. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2014.02.013>

- Ruela, H.S., Sabino, K.C.C., Leal, I.C.R., Landeira-Fernandez, A.M., de Almeida, M.R.A., Rocha, T.S.M. et al. (2013). Hypoglycemic effect of *Bumelia sartorum* polyphenolic rich extracts. *Natural Product Communications*, 8(2), 207-210.
- Setyaningsih, I., Bintang, M., & Madina, N. (2015). Potentially Antihyperglycemic from Biomass and Phycocyanin of *Spirulina Fusiformis* Voronikhin by *in Vivo* Test. *Procedia Chemistry*, 14, 211-215. <http://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.030>
- Shah, N.A., & Khan, M.R. (2014). Antidiabetic effect of *Sida cordata* in alloxan induced diabetic rats. *BioMed Research International*, 2014, 671294. <http://doi.org/10.1155/2014/671294>
- Shewamene, Z., Abdelwuhab, M., & Birhanu, Z. (2015). Methanolic leaf extract of *Otostegia integrifolia* Benth reduces blood glucose levels in diabetic, glucose loaded and normal rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-7. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0535-5>
- Shi, C., Karim, S., Wang, C., Zhao, M., & Murtaza, G. (2014). A review on antidiabetic activity of *Citrullus colocynthis* Schrad. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 71(3), 363-367.
- Shyni, G.L., Kavitha, S., Indu, S., Arya, A. Das, Anusree, S.S., Vineetha, V.P. et al. (2014). Chebulagic acid from *Terminalia chebula* enhances insulin mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes via PPARgamma signaling pathway. *BioFactors (Oxford, England)*, 40(6), 646-657. <http://doi.org/10.1002/biof.1193>
- Singh, S., Jaiswal, N., Sharma, A., Fatima, S., Sharma, R., Rahuja, N. et al. (2011). A convenient synthesis of novel pyranosyl homo-C-nucleosides and their antidiabetic activities. *Carbohydrate Research*, 346(10), 1191-1201. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.006>
- Sui, X., Zhang, Y., & Zhou, W. (2016). *In vitro* and *in silico* studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Journal of Functional Foods*, 21, 50-57. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.042>
- Sukito, A., & Tachibana, S. (2014). Potent alpha-glucosidase inhibitors isolated from *Ginkgo biloba* leaves. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(11), 1170-1178. <http://doi.org/10.3923/pjbs.2014.1170.1178>

- Supkamonseni, N., Thinkratok, A., Meksuriyen, D., & Srisawat, R. (2014). Hypo-lipidemic and hypoglycemic effects of *Centella asiatica* (L.) extract *in vitro* and *in vivo*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(10), 965-971.
- Swaroop, A., Bagchi, M., Kumar, P., Preuss, H.G., Tiwari, K., Marone, P.A., & Bagchi, D. (2014). Safety, efficacy and toxicological evaluation of a novel, patented anti-diabetic extract of *Trigonella Foeniculum* seed extract (Fenfu). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24(7), 495-503. <http://doi.org/10.3109/15376516.2014.943443>
- Syiem, D., & Warjri, P. (2015). Antidiabetic, antioxidant, and TNF-alpha lowering properties of extract of the traditionally used plant *Ixeris gracilis* in alloxan-induced diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 494-502. <http://doi.org/10.3109/13880209.2014.924151>
- Thilagam, E., Parimaladevi, B., Kumarappan, C., & Mandal, S.C. (2013). alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 6(1), 24-30. <http://doi.org/10.1016/j.jams.2012.10.005>
- Tiong, S.H., Looi, C.Y., Arya, A., Wong, W.F., Hazni, H., Mustafa, M.R. et al. (2015). Vindogentianine, a hypoglycemic alkaloid from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). *Fitoterapia*, 102, 182-188. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.019>
- Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-franco, J.L., Webster, S.P. et al. (2010). A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin e nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 b – Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition, 45, 2606-2612. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.049>
- Unnikrishnan, P.S., Suthindhiran, K., & Jayasri, M.A. (2014). Inhibitory potential of *turbinaria ornata* against key metabolic enzymes linked to diabetes. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/783895>
- Urzêda, M.A., Marcussi, S., Silva Pereira, L.L., França, S.C., Pereira, A.M.S., Pereira, P.S. et al. (2013). Evaluation of the hypoglycemic properties of Ana-

- cardium humile aqueous extract. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/191080>
- Verma, N., Amresh, G., Sahu, P.K., Rao, C.V, & Singh, A.P. (2012). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate fraction of *Rhododendron arboreum* Smith flowers in streptozotocin induced diabetic rats and its role in regulating carbohydrate metabolism. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 696-701. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60212-3](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60212-3)
- Verma, P.R., Itankar, P.R., & Arora, S.K. (2013). Evaluation of antidiabetic antihyperlipidemic and pancreatic regeneration , potential of aerial parts of *Clitoria ternatea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(5), 819-829. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500015>
- Vujcic, M., Nikolic, I., Kontogianni, V.G., Saksida, T., Charisiadis, P., Orescanin-Dusic, Z. et al. (2015). Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. *The British Journal of Nutrition*, 113(5), 770-782. <http://doi.org/10.1017/S0007114514004048>
- Wan, L., Chen, C., Xiao, Z., Wang, Y., Min, Q., Yue, Y. et al. (2013). *In vitro* and *in vivo* anti-diabetic activity of *Swertia kouitchensis* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3), 622-630. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.052>
- Wang, J., Nie, Y., Li, Y., Hou, Y., Zhao, W., Deng, J. et al. (2015). Identification of target proteins of mangiferin in mice with acute lung injury using functionalized magnetic microspheres based on click chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10013-10021. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04439>
- Wang, L., Zhang, Y., Xu, M., Wang, Y., Cheng, S., Liebrecht, A. et al. (2013). Antidiabetic activity of *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 317-321. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.028>
- Wu, K., Liang, T., Duan, X., Xu, L., Zhang, K., & Li, R. (2013). Anti-diabetic effects of puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), on streptozotocin-diabetogenic mice through promoting insulin expression and ameliorating metabolic function. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Publis-*

*bed for the British Industrial Biological Research Association*, 60, 341-347. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.077>

Yang, J.-R., Luo, J.-G., & Kong, L.-Y. (2015). Determination of alpha-glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* using liquid chromatography with quadrupole time of flight tandem mass spectrometry coupled with centrifugal ultrafiltration. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(3), 208-214. [http://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30006-6](http://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30006-6)

Zaruwa, M.Z., Manosroi, A., Akihisa, T., Manosroi, W., Rangdaeng, S., & Manosroi, J. (2012). Hypoglycemic activity of the *Anisopus manni* NE Br. methanolic leaf extract in normal and alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 10(1), 37-46.

Zhang, J.-G., Liu, Q., Liu, Z.-L., Li, L., & Yi, L.-T. (2015). Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 180-185. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.050>

Zhang, L., Gao, H., Baba, M., Okada, Y., Okuyama, T., Wu, L. et al. (2014). Extracts and compounds with anti-diabetic complications and anti-cancer activity from *Castanea mollissima* Blume (Chinese chestnut). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1-9. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-422>

Zhou, H., Jiang, T., Wang, Z., Ren, S., Zhao, X., Wu, W. et al. (2014). Screening for potential -alpha -Glucosidase inhibitors in *Coptis chinensis* franch extract using ultrafiltration LC-ESI-MSn. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(6 Suppl), 2007-2012.

Zhou, X., Liang, J., Zhang, Y., Zhao, H., Guo, Y., & Shi, S. (2015). Separation and purification of alpha-glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 985, 149-154. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.030>

## ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* FRENTE A CÉLULAS TUMORALES

---

**Ana Carolina Martínez-Torres, Ashanti Concepción  
Uscanga-Palomeque, Cristina Rodríguez-Padilla**

Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[ana.martinezto@uanl.edu.mx](mailto:ana.martinezto@uanl.edu.mx), [ashanti.uscangapl@uanl.edu.mx](mailto:ashanti.uscangapl@uanl.edu.mx),  
[cristina.rodriguezpd@uanl.edu.mx](mailto:cristina.rodriguezpd@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.318>

Martínez-Torres, A.C., Uscanga-Palomeque, A.C., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 269-312.

## Resumen

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para el tratamiento de diferentes enfermedades. Actualmente, con los avances en diversas áreas de la ciencia, el conocimiento tradicional y popular sobre las plantas medicinales puede ser constatado y validado. Para ello normalmente se busca determinar si estas tienen potencialmente algún efecto deseado contra alguna patología. Dentro de las diversas patologías que afectan al humano se encuentra el cáncer, que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por diversas alteraciones a nivel celular que llevan a un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas, provocando anormalidades en el funcionamiento del organismo. Este grupo de enfermedades se ha vuelto un blanco importante de las investigaciones actuales. Por esta razón, el estudio del efecto de extractos o derivados de plantas que puedan tener un impacto sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales se ha vuelto de vital importancia. Esto con el fin de encontrar diferentes y mejores alternativas antitumorales basadas en derivados de plantas. En este capítulo se presentarán algunos ejemplos de plantas que han mostrado un efecto citotóxico *in vitro* frente a líneas celulares tumorales, además se mencionarán moléculas obtenidas de plantas que son usadas como medicamentos de primera línea contra el cáncer, y finalmente se describirán algunos de los principales métodos que permiten corroborar la citotoxicidad potencial de extractos u otros derivados de plantas sobre células tumorales y sanas. Se espera que al final del capítulo el lector tenga una visión general del interés de estudiar la actividad citotóxica de derivados de plantas sobre células tumorales.

## Palabras clave

Extractos de plantas, muerte celular, cáncer.

## 9.1. Introducción

Desde sus orígenes, el ser humano ha utilizado la naturaleza para cubrir sus necesidades elementales, tales como la producción de alimentos, refugio, ropa, medios de transporte, fertilizantes, saborizantes y medicinas. Las plantas han formado la base de la medicina tradicional, por lo que el uso de estas y los métodos de su aplicación para el tratamiento de ciertas dolencias específicas se han transmitido a través de la palabra, de generación en generación. Con el tiempo, la información sobre la utilización de plantas medicinales se fue registrando en herbarios, lo que permitió tener un mejor registro de las plantas con propiedades de interés para el hombre (Balunas & Kinghorn, 2005). Históricamente, los medicamentos a base de hierbas se utilizaron como tinturas, emplastos, polvos, y té, seguido de formulaciones, y compuestos puros.

Los extractos de plantas medicinales han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad para tratar diferentes dolencias y, a pesar de que algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas han demostrado ser erróneas, la herbolaria medicinal se basa en los hallazgos empíricos de miles de años y ha logrado proporcionar medicamentos valiosos. Entre estos se encuentran los analgésicos (morfina), antitusígenos (codeína), antihipertensivos (reserpina), cardiotónicos (digoxina), antipalúdicos (quinina y la artemisinina), y antineoplásicos (vinblastina y taxol) (Gurib-Fakim, 2006; Ramawat, Dass & Mathur, 2009).

Actualmente, con los avances en botánica, fitoquímica, farmacología, y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas debe ser constatado y validado. Para ello normalmente se busca determinar si estas tienen potencialmente algún efecto deseado contra alguna patología. Dentro de las diversas patologías que afectan al humano se encuentra el cáncer, que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por diversas alteraciones a nivel celular que llevan a un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas (Hanahan & Weinberg, 2011), provocando anormalidades en el funcionamiento del organismo.

Debido a los efectos devastadores del cáncer, esta patología se ha vuelto un blanco importante de las investigaciones actuales. Por esta misma razón, investigaciones en todo el mundo se basan en probar el efecto de extractos o derivados de plantas sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales. Esto con el fin de

encontrar diferentes y mejores alternativas antitumorales basadas en derivados de plantas. Para estos análisis de escaneo, se suelen utilizar líneas celulares tumorales y se analiza si estos derivados de plantas son capaces de afectar su crecimiento, y/o viabilidad. Para ello existen una variedad de pruebas de citotoxicidad disponibles, que se utilizan comúnmente en laboratorios de investigación.

En este capítulo se presentarán algunos ejemplos de plantas que han mostrado un efecto citotóxico *in vitro* frente a líneas celulares tumorales, ejemplos de derivados de plantas que son usados como medicamentos de primera línea contra el cáncer, y finalmente se describirán algunos de los principales métodos que permiten corroborar la citotoxicidad potencial de extractos u otros derivados de plantas.

## 9.2. Extractos de plantas con actividad citotóxica

La selección de especies de plantas útiles en el desarrollo de medicamentos puede basarse en dos estrategias principales: la selección aleatoria y los conocimientos médicos tradicionales. Este último enfoque incluye plantas usadas en sistemas organizados de medicina tradicional como la herbolaria, el folclor, y el chamanismo, que han demostrado de manera empírica tener un efecto curativo (Pieters & Vlietinck, 2005).

Los trabajos de Jonathan Hartwell muestran que las plantas han sido empleadas en el tratamiento de enfermedades malignas desde hace 3500 años (Graham, Quinn, Fabricant & Farnsworth, 2000; Hartwell, 1982). Actualmente existen en el mercado 175 medicamentos utilizados contra el cáncer en Estados Unidos de América, de los cuales aproximadamente el 75% son de origen natural (Newman & Cragg, 2007). Además, hoy en día aproximadamente el 25% de todas las recetas médicas contienen uno o más ingredientes activos derivados de plantas (Pan et al., 2013). A continuación resumiremos algunos trabajos en donde se evalúa la actividad citotóxica de los extractos de diversas plantas empleadas en la medicina tradicional de diferentes países alrededor del mundo.

Alonso-Castro y su grupo de investigación, señalan que se han registrado 300 especies de plantas pertenecientes a 90 familias botánicas que son utilizadas para el tratamiento del cáncer, de los cuales sólo 181 han sido analizados experimentalmente en México (Alonso-Castro et al., 2011). Tan sólo 88 extractos

han presentado actividad citotóxica *in vitro*, sobre líneas celulares de cáncer. Un total de 187 compuestos se han aislado, de los cuales 77 (41%) han demostrado citotoxicidad y de los cuales, diecisiete principios activos no se han reportado en otras especies de plantas, haciéndolos atractivos para su investigación como posibles moléculas antineoplásicas (Alonso-Castro et al., 2011). Como ejemplo de estos estudios Mena-Rejon y colaboradores trabajaron con extractos de 9 plantas obtenidas de la península de Yucatán, y empleadas comúnmente por los mayas. Los extractos que obtuvieron fueron retados contra cuatro líneas celulares de cáncer humano: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de laringe (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma escamoso de cérvix (SiHa), y una línea no tumoral, las células de riñón canino (MCDK). De los 16 extractos, 4 mostraron actividad contra células HEP-2; 5 contra células HeLa, 8 contra células SiHa y 4 mostraron efectos citotóxicos tanto en SiHa y HeLa. Ninguno de los extractos ensayados mostró una citotoxicidad significativa en las células KB y solo un extracto mostró alta actividad citotóxica sobre las células no tumorales (MDCK) (Mena-Rejon et al., 2009).

En Sudamérica, un estudio realizado por Laundry de Mesquita y colaboradores en el 2009, investigó el potencial citotóxico de 412 extractos derivados de 50 plantas brasileñas utilizadas en la medicina tradicional, dichos extractos se obtuvieron utilizando etanol, hexano, diclorometano y con una solución hidroetanólica. Estos se probaron contra 4 líneas celulares: carcinoma de colon humano (HCT-8), carcinoma mamario (MDA-MB-435), cerebro (SF-295), y leucemia aguda (HL-60). Sus resultados muestran que de los 412 extractos, 28 presentan un efecto antiproliferativo importante a 50 µg/mL, inhibiendo por lo menos el 85% de la proliferación de las cuatro líneas tumorales (de Mesquita et al., 2009).

En el sur de Asia, un trabajo muestra la actividad citotóxica de 23 extractos metanólicos derivados de 19 plantas medicinales de Bangladesh. La toxicidad fue evaluada tanto en líneas celulares no tumorales (fibroblastos de ratón, NIH3T3, y células de riñón de mono, VERO), como en malignas (Cáncer de mama humano, MCF7 y MDA-MB-231, colon, HT-29, y cáncer gástrico, AGS). En este estudio los extractos de *Aegicera corniculatum* e *Hymenodictyon excelsum* mostraron citotoxicidad no específica, eliminando tanto a células sanas como cancerosas. Mientras los extractos de *Clitoria ternatea*, *Jasminum sambac*, y *Mussaenda glabrata*, entre otras, presentaron citotoxicidad sólo en las líneas malignas (Akter, Uddin, Grice & Tiralongo, 2014).

En Europa, Cattaneo y colaboradores, trabajaron en el 2015 con el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero), donde observaron su potencial quimioprotector y antiproliferativo en células de melanoma, A375. Además, separaron compuestos puros derivados de dicha planta, pero observaron que para lograr el efecto antiproliferativo era necesario el extracto completo, debido a efectos multifactoriales de los componentes (Cattaneo et al., 2015).

También en Sudán, África, un país con una tradición herbolaria reconocida, realizaron un estudio a 35 diferentes especies de plantas (65 extractos crudos). Obteniendo que 3 especies vegetales *Lamsonia inermis*, *Trigonella foenum-graecum* y *Ambrosia maritima* tienen un potencial citotóxico sobre diferentes líneas celulares incluidas células de leucemia (CEM), cáncer de colon (HCT116), células de glioblastoma (U87) y una línea de riñón de embrión humano (HEK293), por lo que los componentes activos de estas plantas pueden ser considerados como candidatos prometedores para el desarrollo de agentes antitumorales (Saeed, Abdelgadir, Sugimoto, Khalid & Efferth, 2015).

Como estos, hay muchos otros ejemplos de investigaciones que son realizadas alrededor del mundo con el fin de encontrar potenciales tratamientos sobre el cáncer, basados también en el estudio de la actividad citotóxica de extractos de plantas, o derivados de estos, sobre diversas líneas celulares tumorales.

El conocimiento de las plantas medicinales y sus propiedades ha sido de gran importancia para el desarrollo de nuevos medicamentos de una sola molécula que son usados en el sistema moderno de la medicina (Ramawat et al., 2009). Esto se ha demostrado por la alta utilización de agentes antitumorales como la vinblastina, la vincristina y el paclitaxel, que son empleados ampliamente como agentes quimioterapéuticos de primera línea frente a diversos tipos de cáncer (Ramawat et al., 2009). A continuación daremos más detalles sobre éstos y otros agentes antineoplásicos.

### **9.3. Derivados de plantas: fármacos con actividad antitumoral**

Para obtener medicamentos seguros, útiles y eficaces, es importante estudiar el efecto citotóxico de plantas con potenciales usos medicinales. A finales del 2013, la FDA había aprobado el uso de 547 productos naturales, incluyendo sus derivados, representando más de un tercio (38%) de todas las nuevas entidades moleculares aprobadas por la FDA (Patridge, Gareiss, Kinch & Hoyer,

2015). Dichos medicamentos incluyen tratamientos para el cáncer, enfermedades neurológicas, cardiovasculares, metabólicas e inmunológicas, y desórdenes genéticos (Patridge et al., 2015). Diez derivados de plantas son fármacos actualmente utilizados clínicamente para varios tipos de cánceres: 1) el Paclitaxel y 2) Docetaxel, obtenidos a partir de especies de *Taxus*; 3) la vinblastina, 4) la vincristina, 5) vindesina y 6) vinorelbina de *Catharanthus roseus*; 7) el topotecan y 8) el irinotecan, obtenidos a partir de *Camptotheca accuminata*; y 9) el etopósido y 10) el tenopósido, obtenidos de *Podophyllum peltatum* (Patwardhan, Warude, Pushpangadan & Bhatt, 2005). A continuación se darán más detalles sobre cada uno de estos fármacos.

El **Paclitaxel (Taxol)** y **Docetaxel (Taxotere)** son diterpenos aislados de la corteza de *Taxus brevifolia*. A pesar de que el interés por este árbol se dio en 1960, ya se conocían las propiedades medicinales del árbol del tejo desde siglos atrás. A este árbol se le denominaba «árbol de la muerte» por sus características venenosas; las tribus norteamericanas las usaban como desinfectante, para provocar el aborto, así como para el tratamiento del cáncer de piel (Nicolaou, Guy & Potier, 1996). En 1964 el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) encontró que un extracto de la corteza *Taxus brevifolia*, era tóxico para los cultivos de células de leucemia. Sin embargo, el aislamiento del compuesto responsable de la citotoxicidad fue realizado en 1967 por Mansuck C. Wani y Monroe E. Wall y lo nombraron Taxol, ya que comparte similitudes químicas con la familia de taxanos, además de que se obtuvo de una planta del género *Taxus* (Orbelies y Kroll, 2004). El mecanismo de acción del paclitaxel y docetaxel, ambos compuestos conocidos como taxanos, consiste en su unión a los microtúbulos, afectando de manera dinámica la división celular e induciendo la muerte de las células en constante replicación (Rowinsky & Donehower, 1995; Tannock & Hill, 1998).

El paclitaxel comenzó a utilizarse en 1993 en el tratamiento del cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi, y cáncer de mama, mientras que el docetaxel se aprobó en Estados Unidos en 1996 para su uso en cáncer de mama (Shu, 1998). Estos fármacos atacan preferentemente a las células cancerosas, ya que se dividen con mayor frecuencia que las no tumorales. Sin embargo, existen células normales con una alta tasa de proliferación, como los linfocitos y los folículos pilosos, que con frecuencia son afectados por el uso de estas terapias. Esta afectación tiene como consecuencia la depresión del sistema inmune, el retraso de las sanciones nerviosas, náuseas y pérdida de cabello (Tannock & Hill, 1998).

La **Vinblastina (Alkaban-AQ, Velban)** y **Vincristina (Oncovir, Vincasar)** se aislaron de una planta usada para el tratamiento de la diabetes: *Catharanthus roseus* (Vinca de rosada) (Cragg et al., 1994). Posteriormente con modificaciones químicas se logró obtener compuestos semisintéticos como la **Vinorelbina (Navelbine)** y **Vindesina (Eldisine)** (Newman, Cragg & Snader, 2000; Newman, Cragg & Snader, 2003; Newman & Cragg, 2007).

La vincristina junto con otros medicamentos se emplea para tratar leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer de cervicouterino, de colon, de mama, entre otros carcinomas (de Moura, de Se Silva, de Oliveira, Diniz & Barbosa-Filho, 2002). La vinblastina se ha empleado para tratar el linfoma de Hodgkin, carioepitelioma y cáncer de ovario (Silva, Moura, Oliveira, Diniz & Barbosa-Filho, 2003). La vinorelbina, se utiliza para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico y para las metástasis de cáncer de mama (Vega-Ávila, Velasco-Lezama & Jiménez-Estrada, 2006), mientras que la vindesina es empleada para tratar leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de mama y de pulmón (Ohta et al., 1993).

Estos compuestos son alcaloides que se unen a la tubulina, evitando la polimerización de los dímeros de tubulina y por ende la formación de los microtúbulos, los cuales son de vital importancia para la formación del huso en la célula que entrará en mitosis. Cuando el complejo tubulina-alcaloide se une a los microtúbulos trae como consecuencia que la célula en división, sea arrestada en la fase M del ciclo celular (Warber, 1999).

La **Camptotecina** fue aislada de la *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino, sus extractos fueron investigados en la década de los 50 como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona (Cragg et al., 1994), observándose que el principio activo era la camptotecina (Oberlies & Kroll, 2004). Sin embargo, debido a la alta toxicidad de la sal sódica de la camptotecina, la evaluación clínica de este extracto fue suspendida (Newman et al., 2000). Y fue hasta 1985 que el interés por esta molécula se retomó debido a que su mecanismo de acción que involucra a la topoisomerasa I, una enzima encargada del relajamiento del ADN durante la replicación (Cragg & Newman, 2004). Esta molécula fue modificada químicamente y se obtuvieron distintos compuestos químicos como el **Topotecan (Hycamtin)**, aprobado posteriormente para el tratamiento contra el cáncer de ovario en 1996 en Estados Unidos (Shu, 1998), el **Irinotecan (Camptosar)**, usado en Japón desde 1994 y posteriormente aprobado en EUA en 1996, para tratar el cáncer colorrectal, ovario, y pulmón (Oberlies & Kroll,

2004; Shu, 1998). Otros compuestos derivados de la camptotecina son el 9-amino camptotecina (9-AC) y 9-nitro-camptotecina (9-NC) los cuales presentaron un mayor efecto citotóxico que la irinotecan y la topotecan (Shu, 1998), pero los estudios clínicos de fase dos en los que se emplea la 9-aminocamptotecina no mostraron actividad en contra de cáncer colorectal ni de pulmón (Takimoto & Thomas, 2000). Por otro lado la 9-nitro-camptotecina ha sido probada en pacientes con sarcoma avanzado y cordoma (fase II), donde se obtuvo que 9-NC tiene actividad modesta en el retraso de la progresión en pacientes con cordoma metastásico, y está asociado con toxicidad moderada y muestra pocos beneficios en pacientes con sarcoma de tejidos blandos avanzado (STB) y tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (Chugh, 2005). Por lo que tan solo el irinotecan y el topotecan son los únicos derivados de la camptotecina, que se emplean clínicamente (Takimoto & Thomas, 2000).

Estos estudios corroboraron que el bloqueo de la actividad de la topoisomerasa I puede ser usado como blanco terapéutico, ya que esta enzima se ha encontrado sobreexpresada en los tumores malignos (Husain, Mohler & Seigler, 1994). La camptotecina y sus análogos (CPT's) actúan al enlazarse con el ADN-Topo I, lo que estabiliza dicho complejo divisible, evitando así la liberación del ADN y por lo tanto la replicación (Fan, Weinstein, Kohn, Shi & Pommier, 1998).

El **Etopósido** y **Tenipósido** son derivados semisintéticos provenientes de un lignano conocido como podofilotoxina 1, extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. Estos fármacos resultan útiles en el tratamiento de neoplasias como linfomas, leucemias agudas, sarcoma de Kaposi asociado a al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, y cánceres de pulmón, ovario, testículo, vejiga, y cerebro (Xiao et al., 2004). La podofilotoxina 1 es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina y es empleado como tratamiento tópico para verrugas genitales causadas por algunos tipos de virus del papiloma humano (VPH) y otras verrugas externas, este compuesto se comercializa bajo el nombre de Condylox (gel) y Wartec (solución o crema) (Xu, Lv & Tian, 2009). El etopósido y tenipósido actúan como inhibidores de la topoisomerasa II, una enzima nuclear que resuelve diversos problemas topológicos del ADN, los cuales surgen en procesos biológicos involucrados en la división celular, tales como transcripción, recombinación-replicación y reparación cromosómica (Alton y Harris, 1993). Tanto el etopósido como el tenipósido han sido sometidos a modificaciones estructurales, esto para mejorar su eficiencia clínica así como para superar algunos problemas asociados a su uso como el desarrollo de resistencias, mielosupresión, y baja biodispo-

nibilidad por vía oral. Algunos productos generados son TOP53, GL331, y el etopofos (Abad-Reyes et al., 2008).

Los compuestos anteriormente mencionados son un claro ejemplo de la utilización de derivados de plantas como tratamientos efectivos contra neoplasias. Esto incentiva la búsqueda de otros derivados de plantas que permitan la caracterización y utilización de nuevas moléculas útiles para el tratamiento del cáncer. Para el estudio de estos efectos es importante verificar si estos inducen la muerte de la célula. Antes se buscaba que estos fueran capaces de inducir apoptosis, sin embargo ahora se sabe que existen diversos tipos de muerte celular, de formas novedosas y útiles para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer resistentes a las terapias convencionales. A continuación se detallará como diferenciar una célula muerta de una célula viva y se presentan los principales tipos de muerte conocidos.

#### **9.4. Muerte celular: Un objetivo clave de extractos de plantas con actividad antitumoral**

La muerte celular es un proceso altamente complejo, mediante el cual la célula activa su propia maquinaria y se autodestruye. Como se menciona anteriormente, las células cancerosas tienen defectos a nivel celular que las vuelven resistentes a este proceso fisiológico y juegan un papel crucial en el crecimiento tumoral. Por esta razón, el estudio de la muerte celular se ha vuelto de gran interés, con el fin de poder reactivar este proceso alterado en las células de cáncer. A través de estos últimos años se han adquirido conocimientos que permiten una mejor comprensión de los procesos que la célula lleva a cabo para autodestruirse. El análisis de la muerte celular ha ido mejorando con la adquisición de nuevos y mejores datos generados a partir de los avances tecnológicos en la microscopía, citología, inmunología, biología molecular, bioquímica, entre otras ramas de las ciencias naturales.

Desde un punto de vista conceptual, la muerte celular, puede ser definida como la degeneración permanente de las funciones celulares vitales. Sin embargo, el límite preciso entre una alteración reversible en la homeostasis y una pérdida irreversible de las actividades celulares es difícil de identificar. Para ello el Comité de Nomenclatura de la muerte celular (NCCD) (Galluzzi et al., 2012) propuso tres criterios para identificar a las células muertas, y cuatro procesos celulares que son considerados puntos no reversibles de una célula moribunda (Tabla 1).

<b>Criterios morfológicos y moleculares para identificar a una célula muerta</b>	<b>La pérdida de la integridad de la membrana plasmática,</b> llevando a la destrucción de la identidad celular
	<b>La fragmentación de la célula</b> (incluido su núcleo)
	<b>La fagocitosis de la célula,</b> por células dotadas con actividad fagocítica
<b>«Puntos de no regreso» que identifican a una célula moribunda</b>	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial
	Permeabilización de la membrana mitocondrial
	Exposición extracelular de fosfatidilserina

Tabla 1. Criterios establecidos por el Comité de Nomenclatura de la muerte celular para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda

Se considera que una célula está comprometida a morir, cuando reúne al menos dos puntos de no regreso al mismo tiempo. Si sólo uno de ellos es detectado, la célula podría evadir la muerte, por lo que es importante evaluar al menos dos de estos parámetros. Por otro lado, si la célula cumple con al menos uno de los 3 criterios que identifican a una célula muerta, se puede asegurar que la célula ha perdido sus funciones vitales.

Dependiendo del mecanismo de muerte celular activado por un agente citotóxico, la muerte puede ser clasificada en muerte celular accidental (MCA) y muerte celular regulada (MCR) (Galluzzi et al., 2014). La MCA es un tipo de muerte prácticamente instantánea, causada por agravios severos, físicos (altas temperaturas o presiones), químicos (detergentes potentes o variaciones en el pH) o mecánicos, insensibles a cualquier tipo de intervención farmacológica o genética. Este proceso no involucra la activación de la maquinaria celular y, aunque puede ocurrir *in vivo* (por ejemplo en traumatismos severos), no puede ser prevenida ni modulada. Esto implicaría la falta de selectividad y daño en tejidos sanos circundantes. Por otro lado, la MCR involucra la activación de una maquinaria molecular codificada genéticamente. Además, este proceso generalmente culmina en la eliminación fisiológica por fagocitosis de la célula muerta o moribunda, debido a la exposición extracelular de fosfatidilserina en la membrana plasmática, evitando daños colaterales causados por la inducción de este proceso. Por estas razones es

importante discernir si la muerte celular inducida por algún derivado de planta induce MCA o MCR, ya que las consecuencias fisiológicas de estos dos tipos de muerte son muy diferentes.

La comprensión de ciertas características de los procesos de muerte nos ayuda a entenderlos mejor y por lo tanto a saber cómo explotarlos en situaciones en que las células sufren de su desregulación, como en el caso del cáncer. A continuación se describen brevemente tres de los tipos principales de MCR.

- **Apoptosis:** Es el tipo de MCR más estudiado, y se manifiesta morfológicamente por la formación de ampollas en la membrana, la activación de caspasas (cisteín-proteasas de muerte), la condensación nuclear y picnosis, la reducción del volumen citoplasmático, y la fragmentación nuclear y celular (Galluzzi et al., 2012). La activación bioquímica de la apoptosis se produce a través de dos vías generales: la vía intrínseca, que lleva a la activación de la caspasa 9 y la vía extrínseca, proveniente de la activación de los receptores de muerte de la superficie celular, y que resulta en la activación de la caspasa 8 o 10. Estas convergen en la activación de las caspasas efectoras, 3, 6, y/o 7, que llevan al corte de sustratos que dan a la célula moribunda sus características morfológicas distintivas (Kroemer et al., 2009).
- **Autofagia:** La muerte por autofagia es un proceso en el cual el citoplasma y los organelos son secuestrados masivamente en vesículas con doble membrana, que luego son fusionadas con lisosomas, llevando a la degradación del contenido dentro de estos autofagolisosomas. Este proceso tiene funciones homeostáticas y de biosíntesis, y ocurre durante el desarrollo pero también en situaciones de estrés. Se ha demostrado que las proteínas beclin-1, LC3, y AMBRA1, ATG5, ATG6, y ATG12, son necesarias para la inducción de la autofagia (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2009).
- **Necrosis regulada:** La definición de necrosis hasta hace poco era negativa, ya que se consideraba como el tipo de muerte celular accidental. Sin embargo, ahora se sabe que es un tipo de muerte que puede ser regulada y que además tiene una importancia fisiológica. La necrosis regulada se caracteriza morfológicamente por granulación citoplásmica e hinchazón de la célula. Muchas formas de MCR comparten estas características morfológicas distintivas (necroptosis, parthanatos, ferroptosis, pyroptosis, entre otras) debido a que sus mecanismos moleculares pueden estar interconectados y ser activados por una innumerable

cantidad de estímulos. Los actores que participan en estos mecanismos dependen de la naturaleza del estímulo y el tipo celular en donde ocurre, llevando a diferentes resultados dependiendo del contexto celular particular.

Independientemente del tipo de muerte celular inducida, cuando se quiere evaluar el efecto citotóxico de un compuesto dado, es importante saber distinguir si la célula, después del tratamiento, está muerta, en proceso de muerte, o es viable. Para ello existen diversas pruebas que pueden ayudarnos a determinarlo. En la Tabla 2 presentamos los principales métodos empleados en los laboratorios de investigación para determinar si la célula está muerta/moribunda, o es viable.

Basados en la Tabla 2, a continuación presentaremos los principales métodos para estudiar la muerte celular *in vitro*. Se presentarán algunos de los métodos más empleados que permiten corroborar la citotoxicidad de diferentes extractos de plantas, así como de otros fármacos y productos tanto naturales como artificiales.

## 9.5. Métodos para el estudio de la actividad citotóxica *in vitro*

Existe una gran variedad de modelos biológicos que sirven para estudiar el efecto citotóxico de un determinado agente. Estos modelos pueden dividirse en dos: *in vivo* e *in vitro*, dependiendo de si se hacen en un organismo o en células aisladas, respectivamente. En este capítulo nos enfocamos en estudios *in vitro* para evaluar el efecto citotóxico de un determinado agente, debido a las ventajas que este modelo ofrece.

Las pruebas *in vivo* son aquellas que utilizan animales para probar los efectos sobre un organismo. Estos modelos, también llamados modelos preclínicos, son indispensables antes de utilizar algún fármaco en pruebas clínicas que involucran pacientes. Sin embargo, cuando lo que se quiere es hacer un análisis general sobre los efectos de extractos de plantas o derivados de estos, el primer paso, antes del uso de modelos preclínicos, es utilizar los ensayos *in vitro*. Además, los modelos *in vitro* son más apropiados cuando se quiere evaluar de manera general el efecto de un agente sobre células con características tumorales o no tumorales. Ya que estos modelos nos permiten observar los efectos a nivel celular del agente a evaluar sobre una variedad de cultivos celular-

	<b>Características de la célula que se desea determinar</b>	<b>Método a emplear</b>
<b>Identificación de una célula muerta</b>	<b>La pérdida de la integridad de la membrana plasmática</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Técnicas de microscopía: Marcaje con Azul de tripán</li> <li>– Técnicas espectrofotométricas: Ensayo de LDH</li> <li>– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con Yoduro de propidio</li> </ul>
	<b>La fragmentación de la célula</b> (incluido su núcleo)	– Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico, Marcaje fluorescente Hoechst
	<b>La fagocitosis de la célula</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Técnicas de microscopía: Visualización en microscopio óptico</li> <li>– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje de célula fagocítica y de célula fagocitada</li> </ul>
<b>Identificación de una célula moribunda</b>	La activación masiva de proteasas «de muerte» (Ej. caspasas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Técnicas espectrofotométricas: Análisis de actividad enzimática</li> <li>– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Detección de caspasa activa, Análisis de actividad enzimática</li> </ul>
	Pérdida del potencial membranar mitocondrial (o actividad mitocondrial)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Técnicas espectrofotométricas: Reducción de sales de tetrazolio</li> <li>– Citometría de flujo: Marcaje con TMRE</li> </ul>
	Permeabilización de la membrana mitocondrial	– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaje con TMRE, Marcaje de proteínas del espacio intermembranar de las mitocondrias
	Exposición extracelular de fosfatidilserina	– Microscopía de Fluorescencia y Citometría de flujo: Marcaja con Anexina-V

*Tabla 2. Principales métodos usados para identificar a una célula muerta y diferenciarla de una célula moribunda*

res. Además estas pruebas han demostrado correlacionarse a los resultados en pruebas *in vivo*, siendo más rápidas, de menor costo, y no implican el cuestionamiento bioético por el uso de animales sobre agentes aún desconocidos. Así, los ensayos *in vitro* permiten seleccionar sustancias con actividad biológica, que posteriormente puedan ser caracterizadas con mayor detalle y sujetas a ensayos preclínicos que permitan garantizar una mayor seguridad para su utilización en pruebas clínicas.

A continuación se describirán los métodos más empleados, para probar la citotoxicidad de compuestos frente a líneas celulares, *in vitro*.

### **9.5.1. Análisis mediante técnicas de microscopía**

#### *9.5.1.1. Observación de las células tratadas con los extractos empleando el microscopio invertido*

La morfología de las diferentes líneas celulares que están en estudio puede ser examinada con el microscopio invertido, antes y después de ser tratadas con los extractos o sustancias a estudiar. Este ensayo es muy sencillo y básico, y sirve para observar directamente los cambios originados por la sustancia en estudio, sobre las células tratadas.

El protocolo consiste en sembrar las células a la confluencia deseada, si son células adherentes se deben dejar adherir incubadas en la incubadora a 37°C (para permitir la adhesión celular al fondo de la placa) y posteriormente se coloca la sustancia a probar y de nuevo se incuba. Los cambios pueden ser observados a las horas subsiguientes de haber colocado la sustancia que se desea probar. Posteriormente, se observan al microscopio comenzando con el objetivo más bajo hasta el de 40X o más, dependiendo del microscopio y su poder de resolución. Un ejemplo de cómo se observan las células al microscopio después de su tratamiento con un extracto de planta que causa citotoxicidad se muestra en la Figura 1.

La limitación principal de este método es que es cualitativo, y su resultado sólo nos brinda una idea morfológica de lo que le está pasando a la célula tratada, comparada con la célula sin tratamiento.

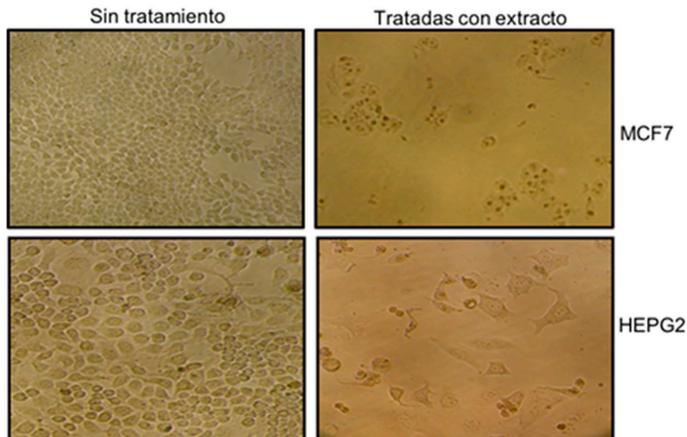


Figura 1. Muestra dos líneas celulares: MCF7 (adenocarcinoma mamario humano) y HEPG2 (Hepatocarcinoma humano), sin tratar (Control negativo) y tratadas con un extracto de planta. Se observa una disminución en el número de células y cambios morfológicos en las diferentes líneas celulares tratadas, con respecto al control

#### 9.5.1.2. Uso del colorante de exclusión Azul tripán

Se emplea una solución azul tripan (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico) al 0.4%, preparada en 0.81% de cloruro de sodio y 0.06% fosfato de potasio dibásico. Es un colorante vital que no se absorbe por células viables sanas. Cuando las células son dañadas o están muertas y su membrana está comprometida, el azul de tripano puede entrar a la célula, permitiendo a la célula muerta ser contada. Es un método de tinción por exclusión y sus aplicaciones son en ensayos de citotoxicidad y proliferación.

Este ensayo puede realizarse tanto de forma cualitativa o cuantitativa. Para el análisis cualitativo, se añade directamente en el cultivo celular el colorante azul de tripan, y después se observan las células directamente en el microscopio. Las células con membrana plasmática permeabilizada (muertas) se observarán azules, debido a que el colorante habrá penetrado, mientras que las células con la membrana plasmática intacta (vivas) no se verán azules (Figura 2).

Para hacer una evaluación cuantitativa del porcentaje de células muertas se deben tener las células en suspensión, se toman cierto volumen de dichas células (por

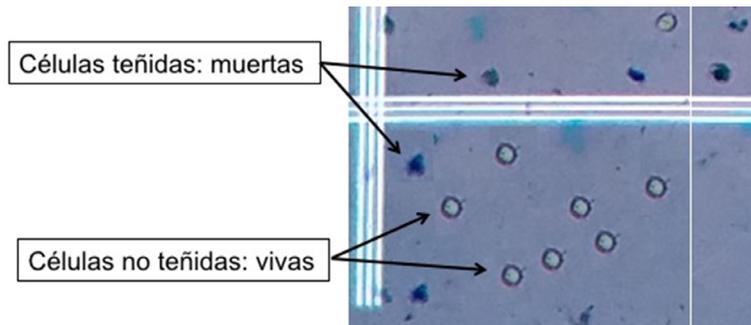


Figura 2. Vista al microscopio de células teñidas con azul tripán, donde se observan células refringentes (vivas) y células a las cuales el colorante ha penetrado (muertas)

ejemplo 20  $\mu\text{L}$ ) y se les adiciona el mismo volumen del colorante azul tripán (en este ejemplo, 20  $\mu\text{L}$ ), y se homogeniza la mezcla. Se toman 10  $\mu\text{L}$  de dicha mezcla y se colocan en un compartimento de la cámara de conteo (en este ejemplo se utilizó una cámara Neubauer, (Figura 3)). Y posteriormente se deja reposar de 1-3 min para que las células se asienten, y a continuación se procede a observar la cámara de recuento en el microscopio óptico (objetivo 10X para enfocar el área de la cuadrícula y posteriormente a 20X o 40X para realizar el conteo de las células). Las células viables son refringentes y las células muertas se tiñen de azul (Figura 2). Si el número de células es muy elevado, se pueden hacer diluciones sin olvidar de tomar el factor de dilución, a la hora de hacer el recuento total de células.

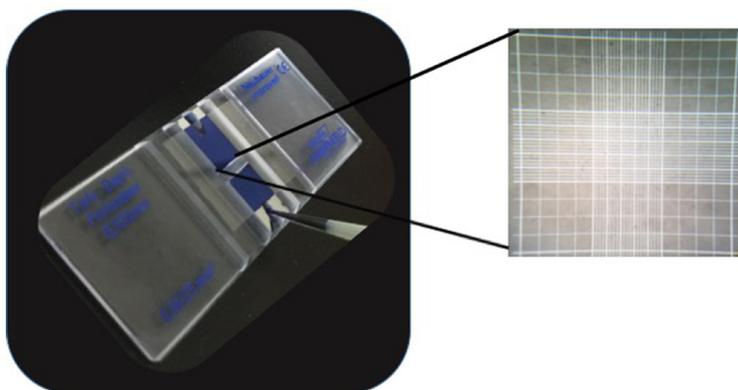


Figura 3. Cámara de Neubauer. Representación gráfica de la cámara de Neubauer y los cuadrantes en los que se divide

Para medir el porcentaje de células muertas se obtiene un porcentaje de las células azules, con respecto al total (incluyendo en el conteo las células azules y de las refringentes), tanto de la muestra sin tratamiento y de la muestra tratada, para verificar el efecto del agente a evaluar.

Existen muchos tipos de cámaras de conteo que permiten evaluar cuantitativamente el número de células vivas y muertas. Y, aunque todas las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, cada tipo de cámara tiene una fórmula de valoración que permite determinar el número de partículas por volumen. Esta fórmula depende de la superficie contada, la profundidad de la cámara, de la dilución utilizada, y del tipo de célula que se va a evaluar. Además ahora existen contadores automatizados, como el TC20™ de BioRad, el cual, cuenta las células empleando la tecnología de enfoque automático y un algoritmo de recuento de células. Otro ejemplo de contador celular automatizado es el Countess II FL de Thermo Fisher Scientific, el cual se basa en la detección por fluorescencia, mediante el uso de cubos de luz LED EVOS™. También se encuentra en el mercado el NucleoCounter® NC-200™ de Chemometec, el cual se basa en la tecnología patentada llamada Via1- Cassette y utiliza tintes fluorescentes (naranja de acridina y DAPI). Finalmente también está disponible el Scepter™ 2.0 Cell Counter de Merck Millipore, un contador automatizado portátil, cuya tecnología se basa en detectar las células por cambios en la impedancia.

### **9.5.2. Ensayo clonogénico**

El ensayo de formación de colonias o ensayo clonogénico es un ensayo de supervivencia de las células *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula de crecer en una colonia, que debe consistir de por lo menos 50 células. Este ensayo es el método de elección para determinar la muerte celular reproductiva después del tratamiento con radiación ionizante, pero también se puede utilizar para determinar la eficacia de otros agentes citotóxicos. Sólo una fracción de células sembradas conserva la capacidad de producir colonias.

Para realizar este ensayo se deben sembrar las células en diluciones apropiadas para formar colonias en 1-3 semanas, se siembran en placas de 6 pozos, y debe de sembrarse un número menor para los controles que no recibirán tratamien-

to, para evitar la fusión de colonias y no dificultar el conteo de las mismas. Se adiciona el tratamiento a diferentes concentraciones y se incuba por el tiempo deseado (usualmente 24 h), pasado dicho tiempo se retira el medio, se coloca medio fresco y se deja incubar por 8 d (o más, dependiendo del crecimiento de los controles), a 37°C en una atmósfera controlada, revisando el crecimiento de las células cada 48h. Concluyendo los 8 d se retira el medio y se fijan las células con 0.5 mL de metanol: ácido acético (3:1) y se dejan incubar a -20°C durante 30 min. Pasado este tiempo se retira el metanol: ácido acético y se lava la placa con PBS (buffer fosfato salino), después de retirar el buffer se adiciona el colorante cristal violeta y se incuba a 37°C durante 4 h. Finalmente, se retira el tinte y se realizan lavados con PBS para quitar el exceso de cristal violeta (Figura 4).

Para realizar un análisis cuantitativo del ensayo, se procede a contar cada colonia (un grupo de más de 50 células) formada tanto en el control sin tratamien-

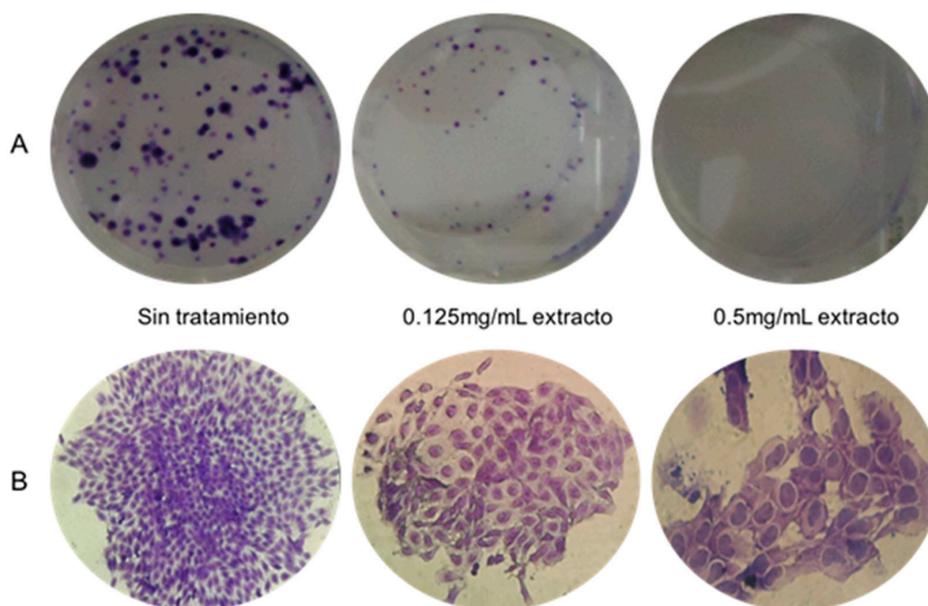


Figura 4. Ensayo clonogénico o de formación de colonias. A) Morfología macroscópica de las colonias de la línea de melanoma murino (B16F10). Sin tratar y tratadas con un extracto de planta. B) Morfología microscópica de las células B16F10 sin tratamiento y tratadas con un extracto de hierbas. Vistas con aumento de 10X, 20X y 40X respectivamente

to, como los ensayos tratados. Las ecuaciones para el análisis cuantitativo son (Franken, Rodermond, Stap, Haveman & van Bree, 2006):

$$\text{Eficiencia de Plaqueo (EP)} = \frac{\# \text{ de colonias contadas en el control}}{\# \text{ de células sembradas}} \quad (1)$$

*Ecuación 1. Eficiencia de plaqueo*

$$\text{Fracción de supervivencia} = \frac{\# \text{ de colonias formadas después del tratamiento}}{\# \text{ de células sembradas} \times \text{EP}} \quad (2)$$

*Ecuación 2. Fracción de Supervivencia*

La Eficiencia de Plaqueo (PE) es la relación entre el número de colonias y el número de las células sembradas. La PE depende de la línea celular empleada, es decir diferentes líneas celulares tienen diferentes eficiencias de plaqueo, por lo que se debe calcular para cada línea a emplear. Además, se conoce que cuando células no tratadas son sembradas como una suspensión de una sola célula, es decir a densidades bajas de 2-50 células, éstas crecerán en forma de colonias (Franken et al., 2006). La fracción de supervivencia (FS) es el número de colonias que surgen después del tratamiento de las células, expresada en términos de PE. Siendo la FS, el resultado cuantitativo que nos indica la porción de células que sobrevive al tratamiento y, por lo tanto, que tan efectiva es la sustancia utilizada para inhibir la capacidad replicativa de la célula.

### **9.5.3. Microscopía de fluorescencia**

La microscopía de fluorescencia es una herramienta utilizada en muchas áreas de la biología celular. Existen colorantes fluorescentes proporcionan mucha información, dependiendo de los marcadores utilizados. Los marcadores pueden ser de muchos tipos, como pequeñas moléculas, anticuerpos o proteínas recombinantes unidas a fluorocromo, entre otros. Hay una gran variedad de información que se puede obtener a partir de ensayos utilizando la microscopía de fluorescencia.

Básicamente, casi todos los ensayos que pueden analizarse por citometría de flujo (ver más adelante), pueden también observarse en un microscopio de fluores-

cencia. La diferencia radica en la información obtenida. La citometría de flujo da información cuantitativa de un cierto parámetro a observar, mientras que la microscopía de fluorescencia da sobre todo información cualitativa y permite observar las características morfológicas de las células analizadas.

Entre los diferentes colorantes comúnmente utilizados en ensayos de citotoxicidad se encuentran la calceína-AM, y el yoduro de propidio. La calceína-AM es comúnmente utilizada como un indicador fluorescente de color verde intenso de células viables, mientras que el yoduro de propidio, se usa como un indicador fluorescente de color rojo de las células con membranas comprometidas (debido a que es impermeable a una membrana plasmática intacta). Finalmente el Hoechst 33342, es un marcador fluorescente azul que tiñe los núcleos de todas las células y permite visualizar anomalías nucleares en el proceso de muerte celular. A continuación se describirá con mayor detalle este último.

#### 9.5.4. *Determinación de la condensación nuclear por medio de la tinción de Hoechst*

Los marcadores de Hoechst son parte de una familia de colorantes fluorescentes azules utilizado para teñir el ADN (Latt, Stetten, Juergens, Willard & Scher, 1975). Su composición química es de bisbenzimidaz (Figura 5), las cuales tienden a unirse a regiones ricas en AT en el ADN y pueden disminuir su densidad. Fueron desarrollados originalmente por Hoechst AG. Hay tres colorantes de Hoechst relacionados: Hoechst 33258, Hoechst 33342, y Hoechst 34580. Siendo las tinturas Hoechst 33258 y Hoechst 33342 los más

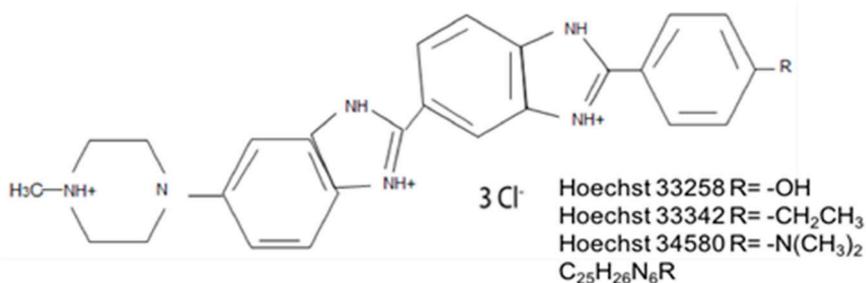


Figura 5. Esquema de la estructura del colorante Hoechst

utilizados en biología celular. Se emplean a menudo para distinguir núcleos picnóticos condensados en las células apoptóticas y para estudios del ciclo celular en combinación con BrdU.

Dentro de sus características moleculares, se sabe que tanto Hoechst 33258 como Hoechst 33342 son excitados por la luz ultravioleta en alrededor de 350 nm, y ambos emiten luz fluorescente azul/cian alrededor de un máximo de emisión a 461 nm. Mientras que el tinte no unido tiene su máxima emisión de fluorescencia en el rango de 510 a 540 nm. Estos colorantes pueden ser excitados con una lámpara xenón, mercurio o con un láser ultravioleta. Los colorantes Hoechst son solubles en agua y en disolventes orgánicos tales como dimetilformamida o sulfóxido de dimetilo. Las concentraciones pueden ser de hasta 10 mg/mL. Las soluciones acuosas son estables a 2-6 °C durante al menos seis meses protegidas de la luz. Para el almacenamiento a largo plazo las soluciones deberán estar en lugar congeladas a -20 °C (Johnson y Spence, 2011).

Este tipo de tinción es útil en experimentos en los que se usan múltiples fluoróforos, ya que existe una amplia diferencia entre las bandas máximas de excitación y sus espectros de emisión, en los tintes de Hoechst. Otra ventaja de estos tintes es que son permeables a la membrana celular y pueden teñir tanto a células vivas como a fijadas. Se unen al surco menor del ADN de doble cadena con una preferencia por secuencias ricas en adenina y timina (Chazotte, 2011).

Para realizar la tinción nuclear con Hoechst, es necesario utilizar guantes durante el proceso, debido a que estos tintes se unen al ADN, interfiriendo con la replicación del ADN durante la división celular. En consecuencia, son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos, por lo que se debe tener cuidado en su manipulación y eliminación.

Para llevar a cabo esta tinción para su posterior observación en un microscopio de fluorescencia, se requiere que las células sean adherentes o se encuentren fijadas en una superficie de vidrio o plástico adecuado para su observación en el microscopio. Las células deben mantenerse humectadas durante el transcurso del protocolo. En breve, las células se siembran o fijan formando una monocapa sobre la superficie, una vez adheridas se adiciona el medio de cultivo a los controles o el tratamiento. Es preferible conocer la dosis o concentración letal media y usar esta concentración para este protocolo. Posteriormente, se

incuba durante diferentes periodos de tiempo (de preferencia 24, 48 y 72 h), y se retira el medio de los pocillos. Posteriormente se lavan con PBS, y se fijan con Paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Se retira el PFA 4% al finalizar el tiempo de fijación y se realizan lavados con PBS. Después, se procede a la tinción con Hoechst, ya sea 33258 o 33342, agregando el colorante Hoechst (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS) durante 1-30 min, enseguida se descarta el exceso de colorante, y se realizan lavados con PBS. Para terminar, se observan las preparaciones en el microscopio de fluorescencia en la región UV (350 a 461 nm, (Figura 6).

Otro colorante fluorescente comúnmente utilizado, y con características similares al Hoechst es el DAPI. Sin embargo, las principales diferencias entre Hoechst y DAPI incluyen una menor toxicidad del colorante Hoechst, y una mayor permeabilidad celular. Los colorantes Hoechst son menos tóxicos que DAPI, manteniendo una mayor viabilidad de células teñidas (a pesar de que en el ejemplo mostrado se realiza un paso de fijación celular con PFA, este paso no es necesario debido a que el marcaje Hoechst es compatible con la viabilidad celular). Además, el grupo etilo adicional de los colorantes Hoechst los hace más permeables a las células.

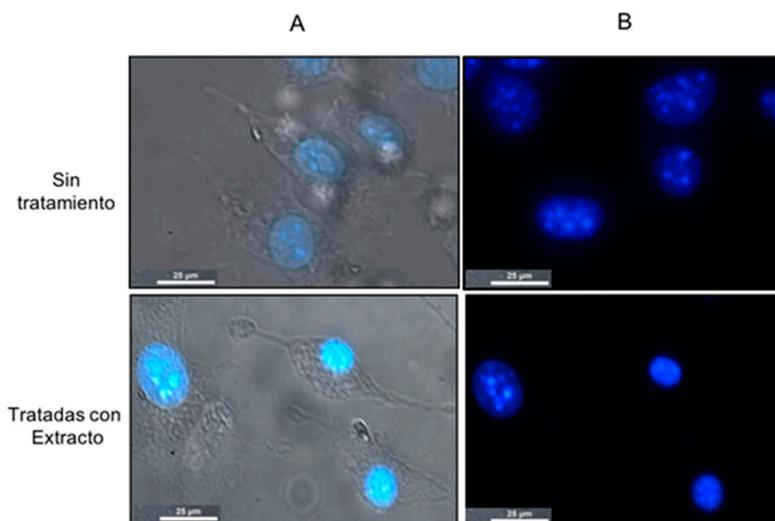


Figura 6. Tinción nuclear con Hoechst 33258. Micrografía fluorescente de las células B16F10 después de 48h. Sin tratar y Tratadas con extracto de hierbas. A) Imágenes compuestas: luz visible traslapada con la luz fluorescente. B) Imágenes con la fluorescencia emitida por el Hoechst 33258

### 9.5.5. Métodos colorimétricos: Técnicas espectrofotométricas

#### 9.5.5.1. Ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Como se mencionó anteriormente, la muerte celular normalmente se analiza mediante la cuantificación de daño en la membrana plasmática. Muchos métodos estándar se basan en la captación o exclusión de colorantes vitales, o sobre la liberación de isótopos radiactivos, colorantes fluorescentes, o calcéina-AM de las células diana pre-marcadas (Leibold y Bridge, 1979; Oldham, Ortaldo, Holden, y Herberman, 1977). Otros ensayos miden las enzimas citoplasmáticas liberadas por las células dañadas, donde la cantidad de actividad de la enzima detectada en el sobrenadante de cultivo se correlaciona con la proporción de células lisadas (Masanet, Gomez-Lechon, y Castell, 1988; Szekeres, Pacsa, y Pejtsik, 1981).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática estable que está presente en todas las células. Cuando la membrana plasmática está dañada, la LDH se libera rápidamente en el sobrenadante del cultivo. La detección de la actividad de LDH extracelular puede ser medida por un método colorimétrico simple y preciso. Este método se basa, en que  $\text{NAD}^+$  se reduce a  $\text{NADH}/\text{H}^+$  por la conversión catalizada de LDH de lactato a piruvato. Posteriormente, un catalizador incluido en la mezcla de reacción (diaforasa), transfiere  $\text{H}/\text{H}^+$  a  $\text{NADH}/\text{H}^+$  a la sal de tratazolio INT, que se reduce a un colorante de formazán (Figura 7).

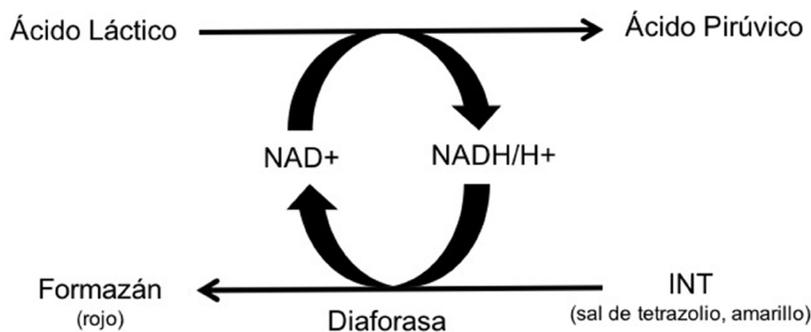


Figura 7. Reacción enzimática de dos pasos que cuantifica la lisis y muerte celular. Paso superior: reducción de lactato a piruvato por la LDH. Paso inferior: reducción de tetrazolio a formazán por la diaforasa incluida en el método de detección

Un aumento en el número de células con la membrana dañada o muertas conduce a una mayor actividad de la LDH en el sobrenadante del cultivo, que se correlaciona directamente con la cantidad de formazán producidos en un período de tiempo definido. Por lo tanto, la cantidad de colorante producida es proporcional al número de células con una membrana permeable. Los ensayos de LDH pueden llevarse a cabo mediante la evaluación de LDH liberada en los medios, como un marcador de células muertas, además se pueden medir las células vivas restantes después de lisarlas y de medir la actividad LDH.

Existen diferentes kits para la detección de la actividad de la LDH, y todos se basan en ensayos colorimétricos para cuantificar citólisis/citotoxicidad y se basan en la medición de la actividad de LDH liberada por las células dañadas al sobrenadante. Para realizar el protocolo para la detección de LDH se requiere tener tres controles en cada experimento:

1. Control de trasfondo. Se debe medir la actividad de LDH presente en el medio, y la absorbancia del medio debe de ser restada de la absorbancia problema.
2. Control bajo (negativo). Se miden los niveles espontáneos de LDH liberado en células no tratadas.
3. Control alto (positivo). En este se mide la actividad máxima de LDH liberada por las células (después de la lisis celular con algún detergente).

La liberación del LDH varía dependiendo con el tipo celular. Por lo que se tiene que establecer la concentración celular óptima. Esta concentración se encuentra, en la mayoría de las líneas celulares, entre  $5 \times 10^3$  y  $2 \times 10^4$  células/pozo en  $200 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  células/mL).

Para medir la citotoxicidad se preparan los controles, el de trasfondo, el de baja liberación de LDH (sin tratamiento), el alto para la liberación máxima de LDH (añadiendo algún detergente, como tritón 100X), y se agrega la sustancia de estudio a la concentración que se quiere evaluar. Se incuba la placa ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 90% humedad) por el tiempo planteado (comúnmente entre 24-72 h), y posteriormente se centrifuga la placa a 250 G durante 10min. Se transfieren  $100 \mu\text{L}$ /pocillo de sobrenadante, sin alterar el sedimento celular, a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos de fondo plano, ópticamente transparente. Se añaden  $100 \mu\text{L}$  de mezcla de reacción (mezcla del colorante

INT y la solución de catálisis) a cada pocillo, y se incuban a temperatura ambiente durante 30 min, protegidos de la luz. Se mide la absorbancia de las muestras a 490 o 492 nm (la longitud de onda de referencia debe ser mayor que 600 nm). Para hacer el análisis cuantitativo de citotoxicidad se sigue la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{absorbancia problema} - \text{absorbancia control}}{\text{absorbancia de control alto} - \text{control bajo}} \times 100 \quad (3)$$

*Ecuación 3. Porcentaje de citotoxicidad*

#### 9.5.5.2. Ensayos basados en la reducción de sales de Tetrazolio

Una variedad de compuestos de tetrazolio se han utilizado para detectar las células viables. Los compuestos más utilizados son: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se clasifican en dos categorías básicas: 1) MTT que está cargado positivamente y penetra fácilmente las células eucariotas viables y 2) aquellos tales como MTS, XTT, y WST-1 que están cargados negativamente y no penetran fácilmente en las células. La última clase (MTS, XTT, WST-1) se usan típicamente con un aceptor de electrones intermedio que puede transferir electrones desde el citoplasma o membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio en el producto formazán coloreado. Estos ensayos a menudo son usados como un screening primario para conocer si un extracto o fármaco es tóxico, y así poder establecer concentraciones medias.

#### • MTT/MTS

La formación de sales de formazán, es una técnica empleada por ser económica y fácil de realizar. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (Figura 8).

Una variante de esta técnica es el MTS, el cual se usa para células en suspensión y a diferencia del MTT, se lee a 490nm. Este reactivo de tetrazolio, puede ser

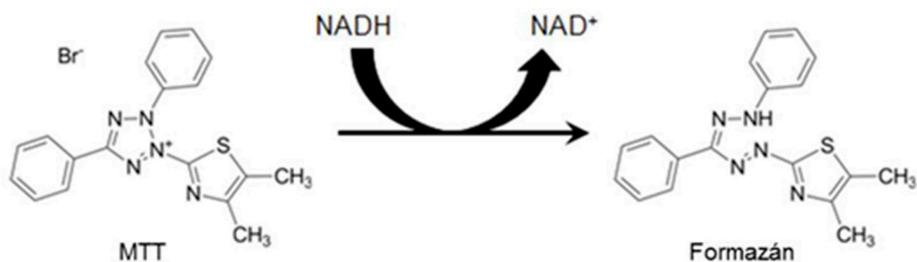


Figura 8. Estructura del MTT y su producto coloreado, el formazán

reducido por células viables para generar productos de formazán que son directamente solubles en medio de cultivo celular. Evitando así el paso de adición de un reactivo, como el DMSO, para solubilizar las sales de formazán formadas (Figura 9).

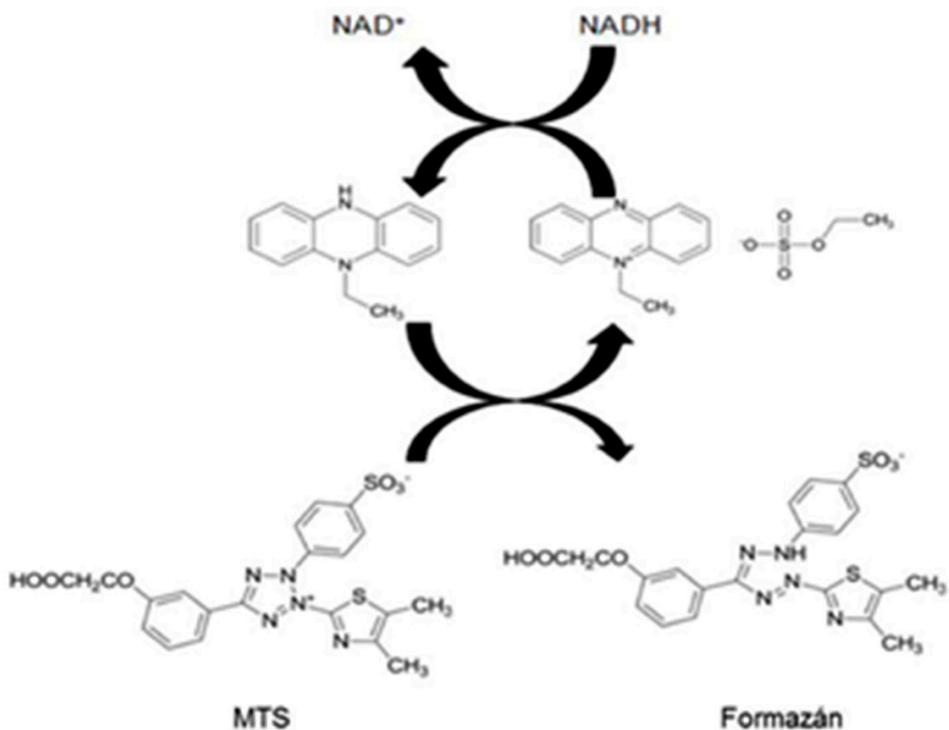


Figura 9. El aceptor intermediario de electrones sulfato de acetato de fenazina (PES), transfiere electrones de NADH en el citoplasma para reducir MTS en el medio de cultivo en formazán soluble

Este conjunto de reactivos de tetrazolio se usan en combinación con reactivos aceptores intermediarios de electrones tales como el sulfato de fenazina de metilo (PMS) o sulfato de acetato de fenazina (PES), que pueden penetrar en las células viables, y son reducidos en el citoplasma o en la superficie celular y salen de las células donde que pueden convertir del tetrazolio al producto formazán soluble. Estos compuestos se utilizan para medir la supervivencia y la proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por lo que entre más células vivas más se verá la coloración azul (Figura 10). Es un método desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

La técnica de MTT, requiere tener las células que se van a estudiar adheridas a una placa de cultivo (preferentemente de 96 pozos de fondo plano, optimizadas para espectrofotometría) y dejar células sin tratar como control y poner un grupo en contacto con el extracto, fármaco, o sustancia que se quiera probar. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se añade una suspensión de MTT para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL (en PBS) por pozo y se incuba de 1 h a 4 h a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Subsiguientemente se retira el sobrenadante y se añaden 100 µL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) por

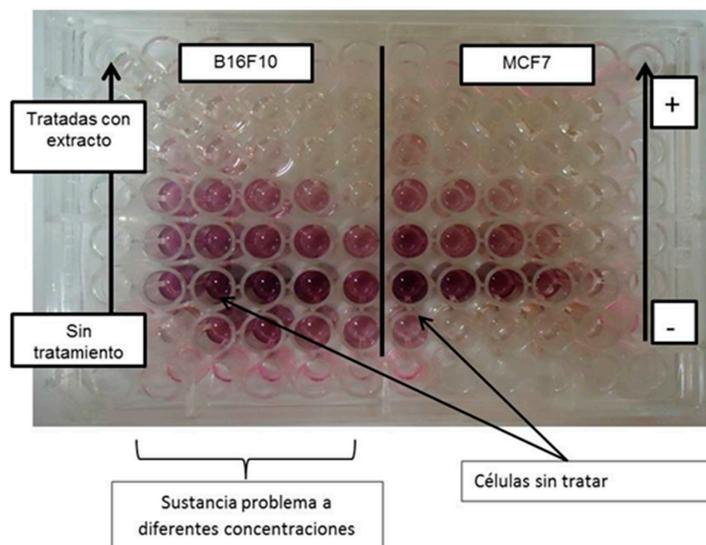


Figura 10. Ensayo de MTT. Placa de 96 pozos, con y sin extracto de planta, en dos líneas celulares B16F10 (*Melanoma murino*) y MCF7 (*adenocarcinoma mamario humano*)

pozo (para disolver los cristales), posteriormente se incubaba por 10min a temperatura ambiente y la placa (Figura 10) se lee al espectrofotómetro a 570 nm.

El porcentaje de Viabilidad se obtiene por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\# \text{ DO células control}} \times 100 \quad (4)$$

*Ecuación 4. Porcentaje de viabilidad*

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas.

Para células en suspensión se emplea el MTS, el cual requiere tener previamente la solución de MTS (2 mg/mL en PBS), que se utilizará para disolver el PES a 0.21 mg/mL, y se ajusta el pH a 6.0-6.5. El procedimiento que se sigue para llevar a cabo esta técnica es similar al llevado a cabo para el MTT. La diferencia es que al final de los tratamientos se añade la solución que contiene MTS+PES a cada pocillo (concentración final de MTS será 0.33 mg/mL) y la placa se lee en un espectrofotómetro a 490 nm de absorbancia.

Actualmente existe una gran variedad de productos comerciales que contienen las soluciones necesarias para realizar estos protocolos. Algunos ejemplos son: CellTiter 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation Cat.# G4000), Cell Growth Determination Kit MTT based (Sigma-Aldrich Cat.# CGD1-1KT), MTT Cell Growth Assay Kit (Millipore Cat.# CT02), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT Powder) (Sigma-Aldrich Cat.# M2128), Cell-Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation Cat.# G3580), *In Vitro* Toxicology Assay Kit, XTT based (Sigma-Aldrich Cat.# TOX2-1KT), MTS Reagent Powder (Promega Corporation Cat.# G1111), XTT sodium salt (Sigma-Aldrich Cat.# X4626), entre otros.

Estos ensayos de proliferación tienen dos principales limitaciones, por una parte pueden dar falsos positivos, cuando aspectos específicos del metabolismo celular son afectados (Berridge, Herst & Tan, 2005), además son incapaces de distinguir entre la inhibición del ciclo celular y la muerte celular (Galluzzi & Aaronson, 2009; Kroemer et al., 2009).

### 9.5.6. Métodos utilizando la Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células, conforme se les hace pasar a través de un rayo de luz. Para ello las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. En este proceso, las células pueden hacerse pasar a muy altas velocidades (pueden llegar a alcanzarse velocidades cercanas a las 100,000 cel/s).

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando su dispersión. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado *Forward Scatter*) y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas (parámetro denominado *Side Scatter*). Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de algún marcador fluorescente, se pueden evaluar las células que fueron marcadas y distinguir de aquellas que no.

El uso de distintas moléculas fluorescentes (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. La ventaja analítica que tiene la citometría de flujo es su capacidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células, para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. Entre esas propiedades está la de determinar la muerte de la célula, por características morfológicas y bioquímicas, que se pueden detectar mediante la tecnología de la citometría de flujo.

#### 9.5.6.1. Determinación de muerte celular usando Anexina-V y Yoduro de propodio

Como se mencionó anteriormente, gracias a los avances tecnológicos en la citometría de flujo, el estudio de la muerte celular se ha visto impactado de manera significativa. La citometría de flujo puede utilizarse para la detectar células en proceso de MCR a través de la detección de anexina-V-(fluorocromo) unida a la superficie celular. La anexina-V se une, en presencia de  $Ca^{2+}$ , preferentemente a la fosfatidilserina, una señal cómete, expuesta en células moribundas.

Por otro lado, el yoduro de propidio (PI) es ampliamente utilizado en conjunción con Anexina V para determinar si las células se encuentran viables, moribundas,

o muertas, a través de la detección de la exposición de fosfatidilserina y la medición de la integridad de la membrana plasmática (Vermes, Haanen & Reutelingsperger, 2000; Vermes, Haanen, Steffens-Nakken & Reutelingsperger, 1995). El PI se utiliza con más frecuencia que otros colorantes nucleares porque es económico, estable y un buen indicador de la viabilidad celular, basado en su capacidad para excluir el colorante en las células vivas (Bacsó, Everson & Eliason, 2000). La capacidad de PI para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana; el PI no puede entrar a una célula con una membrana plasmática intacta. Como se mencionó anteriormente, en las células muertas la integridad de la membrana plasmática se pierde (Denecker, Vercammen, Declercq & Vandennabeele, 2001; Kroemer, Dallaporta & Resche-Rigon, 1998) permitiendo que el PI pase a través de las membranas, y se intercale en ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (Faleiro & Lazebnik, 2000).

Un compuesto que induce principalmente apoptosis, mostrará un diagrama como el mostrado en la Figura 11, en donde después del tratamiento las células se deslizan a la derecha (cuadrantes superior e inferior derecho), y la mayoría de la población anexina-V positiva es también PI negativa (mostrando células en proceso de apoptosis, cuadrante inferior derecho). Por otro lado las células anexina-V positivas y PI positivas (cuadrante superior derecho) pueden ser células en apoptosis tardía, o células que mueren por algún otro tipo de MCR no apoptótico. Si las células fueran PI positivas y anexina-V negativas (cuadrante superior izquierdo), correspondería a células muertas por MCA. Las células vivas

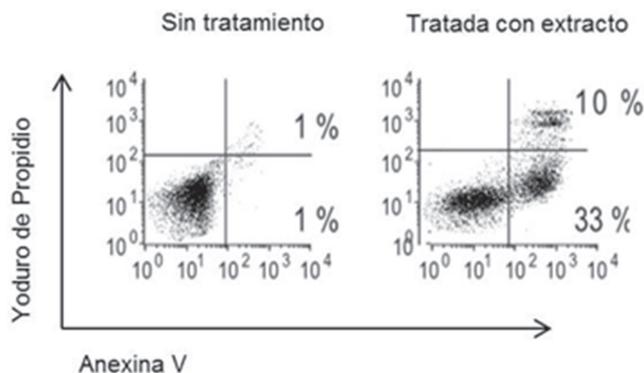


Figura 11. Diagramas de citometría de flujo de células B16F10, sin tratamiento (controles) y con tratamiento (tratadas con extracto de planta). Las células fueron teñidas con Anexina-V-APC, y Yoduro de propidio

son PI negativas y anexina-V negativas, correspondiendo al cuadrante inferior izquierdo (Figura 11).

La metodología a seguir para la doble tinción con anexina-V y yoduro de Propidio, requiere de  $4 \times 10^4$  -  $4 \times 10^5$  cel/mL (dependiendo del tipo celular). Estas serán incubadas a 37°C, durante diferentes tiempos con los tratamientos a probar, es conveniente tener un control positivo (una sustancia que se conozca que causa muerte por apoptosis) y un control negativo (que corresponde a las células sin tratamiento). Pasando los respectivos tiempos se deben recuperar las células, seguido de al menos un lavado con PBS. Una vez recuperadas todas las células, se centrifugan a 300 G por 5-15 min, y se le agrega una mezcla de anexina-V (0.1 µg/mL) más Yoduro de propidio (0.5 µg/mL) disueltos en Buffer de unión (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM,  $Ca_2Cl$  2.5 mM) por muestra. Posteriormente las células se incuban en la oscuridad a 4°C durante 20-30 min. Por último se puede o no realizar un lavado, y la muestra se lee en el citómetro de flujo y se analiza con un software especializado (como ejemplos se encuentran el FlowJo, Infinicyt, FCS Express 5, WinMDI, entre otros).

### ***9.5.7. Determinación de la activación de caspasas efectoras***

Las caspasas son cisteín proteasas que presentan un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas al nivel de un residuo de aspartato, de donde deriva su nombre (cisteinil- aspartato proteasas). Estas proteínas están involucradas activamente en los procesos inflamatorios y en la apoptosis (Adamic-Mroczek, Zajac-Pytrus & Misiuk-Hojlo, 2015). Las caspasas 2, 4/12, 8, 9 y 10, inician la muerte celular programada, mientras que las caspasas «ejecutoras» incluyen las caspasa 3, 6 y 7.

Debido a la implicación que estas proteínas tienen en la muerte celular, existen numerosos métodos para determinar su actividad enzimática. Estos métodos incluyen ensayos fluorométricos y colorimétricos, los cuales se basan en la capacidad intrínseca de la enzima, y un sustrato indicador diseñado para generar una señal fluorescente, de color, o luminiscente, que puede ser leída por espectrofotometría, o ser observados por microscopía de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

Con los ensayos de citometría de flujo, podemos medir la actividad de caspasa en cada célula. Los kits comerciales se basan en la capacidad enzimática de las

caspasas, especialmente de la efectoras, 3 y 7, que cuando ocurre el proceso de la muerte celular son activadas y son capaces de cortar un péptido formado por 4 aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutámico, valina, y ácido aspártico (DEVD). Dicho péptido está conjugado con algún fluorocromo que una vez liberado genera fluorescencia. Cuando las caspasas 3/7 están activas cortan el DEVD unido al fluorocromo, dejándolo libre para producir fluorescencia, la cual es medida para cada célula mediante el citómetro de flujo.

Algunos ejemplos comerciales del uso del citómetro para medir la actividad de caspasa tenemos:

- El Kit Muse™ Caspase-3/7 (Merck Millipore). El cual permite medir la activación de caspasas 3/7 y la permeabilidad de la membrana celular. Este ensayo se basa en un colorante que se une al ADN, dicho colorante está unido al sustrato péptidico DEVD, de esta forma el colorante es incapaz de unirse al ADN. La escisión llevada a cabo por la caspasa 3/7 activa en las células, dan lugar a la liberación del colorante, el cual se transloca al núcleo, se une al ADN y genera fluorescencia, que puede ser medida. Además un marcador de células muertas el 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) también se incluye en el ensayo como un indicador de la integridad estructural de la membrana y la muerte celular.
- CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Permite la detección de la caspasa-3 y -7 activadas en las células apoptóticas mediante citometría de flujo. Este kit se basa también en un reactivo permeable a la célula que consiste de 4 aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante de unión a ácido nucleico. Durante la apoptosis, la caspasa 3 y 7 se activan y son capaces de escindir la secuencia de reconocimiento codificada en el péptido DEVD. El corte de la secuencia de reconocimiento y la unión al ADN por el reactivo, etiqueta las células apoptóticas con una señal fluorogénica.
- Vybrant® FAM™ Caspase Assay Kits. Sirve para detectar caspasas activas en células vivas. Su tecnología se basa en el inhibidor fluorescente de las caspasas (FLICA®). FLICA se compone de 3 subunidades: 1) un resto de fluorometil cetona (FMK), que puede reaccionar covalentemente con una cisteína, 2) una secuencia de amino ácidos caspasa específico, para la caspasa 3 y 7, esta secuencia de reconocimiento es DEVD, 3) un grupo de fluoresceína se adjunta

como reportero. Se dice que FLICA interactúa con las caspasas activas por medio del DEVD y se une covalentemente a través del residuo FMK. FLICA es permeable a la célula y no es tóxico, el FLICA no unido se lava, y la señal fluorescente es una medida directa de la cantidad de caspasa activa, que estaba presente en el momento que se añadió el inhibidor.

- Caspase 3 active FITC Staining Kit (ABCAM). Proporciona un medio conveniente para la detección sensible de la caspasa 3 activa en las células vivas. El ensayo utiliza el inhibidor de la caspasa 3, DEVD-FMK, conjugado con FITC (FITC-DEVD-FMK) como marcador. FITC-DEVD-FMK es permeable a las células, no tóxico, y se une de forma irreversible a la caspasa 3 activada en las células apoptóticas. FITC permite la detección de caspasa-3 activa en las células apoptóticas directamente por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, o un lector de placas de fluorescencia.

Otra manera de medir la actividad de caspasas por citometría de flujo es mediante el uso de anticuerpos específicos del sitio de activación y el uso posterior de un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo. Por ejemplo empleando anticuerpos anti-caspasa 3 activa. La base de estos anticuerpos es que reconocen el sitio específico de corte (Asp175), es decir que cuando la caspasa 3 está activa el anticuerpo se une posteriormente puede ser detectado por citometría de flujo, ya sea porque el anticuerpo primario está unido a fluorocromo, o utilizando un anticuerpo secundario marcado.

### ***9.5.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial: tinción con TMRE***

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) está altamente relacionado con muchos procesos mitocondriales. El  $\Delta\Psi_m$  controla la síntesis de ATP, la generación de ROS, el secuestro de calcio mitocondrial, el importe de proteínas a la mitocondria y la dinámica de la membrana mitocondrial. Por lo que cambios en  $\Delta\Psi_m$ , son indicadores de daño mitocondrial y pueden estar asociados a múltiples patologías mitocondriales, que pueden ser medidas independientemente. Es por ello que existen diferentes métodos y sondas moleculares indicadoras empleadas para estimar el potencial eléctrico de la membrana mitocondrial interna ( $\Delta\Psi_m$ ).

Estas sondas pueden ser clasificadas como cationes liofílicos o «colorantes de redistribución». Estos compuestos se acumulan tanto en la membrana interna como en el espacio de matriz mitocondrial, debido a su carga y solubilidad. Ejemplos de este tipo de compuesto son: la safranina, tetrafenilfosfonio (TTP) y la rodamina 123 (Scaduto & Grotyohann, 1999). Un derivado de este último compuesto es la Tetrametilrodamina etil éster (TMRE), el cual es usado para cuantificar cambios en el potencial de membrana mitocondrial por fluorescencia, este colorante exhibe una unión baja a las mitocondrias, lo cual lo hace adecuado para no tener una lectura errónea del daño mitocondrial. Los colorantes deben ser inocuos, es decir no causar daño mitocondrial y deben ser fáciles de detectar.

Actualmente se encuentran en el mercado diferentes kits para medir  $\Delta\Psi_m$ , además este colorante es manejado por diversas compañías. El TMRE es un colorante rojo-naranja cargado positivamente, que es permeable a la célula y que se acumula fácilmente en las mitocondrias activas debido a su carga negativa. Las mitocondrias despolarizadas o inactivas, tienen un potencial de membrana bajo y no logran secuestrar el TMRE en su interior. Este compuesto es excitado a 488nm y se emite a 575nm. Por lo tanto, la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  puede ser medida mediante la cuantificación de células con mitocondrias con un bajo marcaje con TMRE, con respecto a las células control, que secuestrarán adecuadamente el TMRE y por lo tanto serán más fluorescentes (Figura 12).

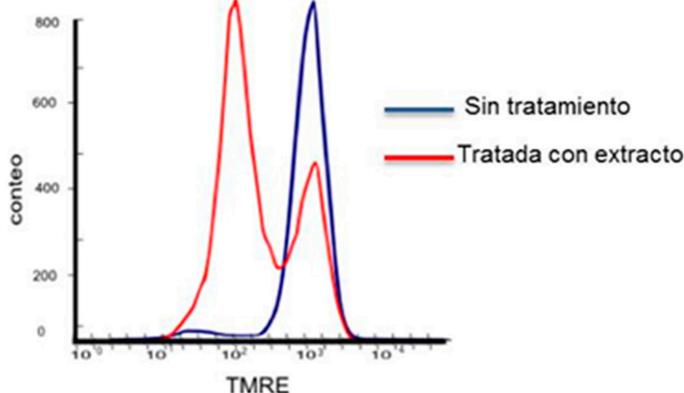


Figura 12. Análisis de tinción TMRE por citometría de flujo. Histograma de células Mec-1 (Leucemia linfocítica crónica) teñidas con 100 nM TMRE, después de ser tratadas con un extracto de planta (rojo) y sin tratamiento (azul)

La realización de esta prueba requiere de  $4 \times 10^4$  -  $4 \times 10^5$  células (dependiendo del tipo celular), que se expondrán a los tratamientos a estudiar y se incubarán a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante el tiempo deseado. Después del tiempo de incubación con el tratamiento, se recuperarán las células y se lavarán con PBS, centrifugando los tubos a 300G durante 5 min. A continuación se desecha el sobrenadante y las células en el pellet se marcan aplicando una solución de TMRE (0.1-0.5µM en PBS), y se incubarán a 37°C (para no alterar el metabolismo mitocondrial) por 20-30 minutos. Posteriormente se lavan las muestras con PBS, se extrae el sobrenadante y se aplican otros 100-500µL de PBS para ser leídas por FACS en el filtro FL-3. Las células cuya fluorescencia se desliza positivamente (con alta fluorescencia) serán aquellas que mantienen su potencial membranal mitocondrial, mientras que aquellas con deslizamiento discreto hacia la derecha (baja fluorescencia) son aquellas que han perdido la capacidad de mantener el TMRE en el interior de sus mitocondrias (Figura 12).

## 9.6. Conclusión

Como se mencionó a lo largo de este capítulo, existen estudios que prueban la importancia del uso de plantas y sus derivados para la obtención de nuevos fármacos. Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin, Gali-Muhtasib, Ocker & Schneider-Stock, 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos.

La gran diversidad de plantas que existen en el mundo puede ser estudiada para descubrir nuevos compuestos que ayuden a generar nuevos y mejores tratamientos contra las diversas enfermedades que afectan al ser humano, incluido el cáncer. Esto apunta a una gran variedad de extractos y derivados de plantas que pueden poseer un alto potencial antitumoral, cuya actividad citotóxica puede ser evaluada sobre células tumorales. Las diferentes metodologías previamente descritas abren la posibilidad de identificar nuevos compuestos con posibles aplicaciones terapéuticas contra el cáncer.

## Referencias

- Abad-Reyes, J.A., López-Pérez, J.L., Santiago, C., Delgado, P., Bahsas, A., Manuel, J. et al. (2008). Productos inesperados en la transformación química de derivados de la podofilotoxona a través de la reacción de Takai. *Avances en Química*, 3(1), 27-34.
- Adamiec-Mroczek, J., Zajac-Pytrus, H., & Misiuk-Hojlo, M. (2015). Caspase-Dependent Apoptosis of Retinal Ganglion Cells During the Development of Diabetic Retinopathy. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(3), 531-535. <http://dx.doi.org/10.17219/acem/31805>
- Akter, R., Uddin, S.J., Grice, I.D., & Tiralongo, E. (2014). Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 246-252. <http://doi.org/10.1007/s11418-013-0789-5>
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- Alton, P.A., & Harris, A.L. (1993). The role of DNA topoisomerases II in drug resistance. *British Journal of Haematology*, 85(2), 241-245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03162.x>
- Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International Journal of Biomedical Science*, 5(1), 1-11.
- Bacsó, Z., Everson, R.B., & Eliason, J.F. (2000). The DNA of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. *Cancer Research*, 60(16), 4623-4628.
- Balunas, M.J., & Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- Berridge, M.V., Herst, P.M., & Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11(Suppl.), 127-152. [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)

- Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G. et al. (2015). Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLoS ONE*, 10(7), 1-18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132439>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb-prot5557. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
- Chugh, R. (2005). Phase II Study of 9-Nitro-Camptothecin in Patients With Advanced Chordoma or Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), 3597-3604. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.170>
- Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M., & McCloud, T.G. (1994). Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. «Ethnobotany and the Search for New Drugs». Ciba Foundation Symposium 185. In D. J. Chadwick & J. Marsh (Eds.), *Ciba Foundation Symposium 185*. (pp. 178–196.). Chichester, United Kingdom: Wiley & Sons.
- Cragg, G.M., & Newman, D.J. (2004). Contributed Reviews Wani Contribution to Cancer Chemotherapy †. *Chart*, 12, 232-244. <http://doi.org/10.1021/np030420c>
- de Mesquita, M.L., de Paula, J.E., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L. V., Grougnat, R. et al. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 439-445. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.018>
- de Moura, M.D., de Se Silva, J., de Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F.M., & Barbosa-Filho, J.M. (2002). Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 67-74.
- Denecker, G., Vercaemmen, D., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2001). Cellular and Molecular Life Sciences Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Microbial Pathogenesis*, 58, 356-370.
- Faleiro, L., & Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *Journal of Cell Biology*, 151(5), 951-959. <http://doi.org/10.1083/jcb.151.5.951>

- Fan, Y., Weinstein, J.N., Kohn, K.W., Shi, L.M., & Pommier, Y. (1998). Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(13), 2216-2226. <http://doi.org/10.1021/jm9605445>
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-9. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Galluzzi, L., & Aaronson, S. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16, 1093-1107. <http://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D. et al. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 1-16. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V. et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107-120. <http://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., & Farnsworth, N.R. (2000). Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 347-377. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00341-X](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00341-X)
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1-93. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartwell, J.L. (1982). *Plants used against cancer: - a Survey*. Lawrence, MA: Quarterman Publications, Inc.

- Husain, I., Mohler, J.L., & Seigler, H.F. (1994). Elevation of Topoisomerase I Messenger RNA , Protein , and Catalytic Activity in Human Tumors: Demonstration of Tumor-type Specificity and Implications for Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 54(2), 539-546.
- Johnson, I., & Spence, M.T. (2011). Assays for Cell Viability, Their Amine-Reactive Proliferation and Function. In *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (Invitrogen)* (11th ed., pp. 650-738). N.Y. USA: Life Technologies.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 619-642. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.619>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3-11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, L.A., Willard, H.F., & Scher, C.D. (1975). Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 23(7), 493-505. <http://doi.org/10.1177/23.7.1095650>
- Leibold, W., & Bridge, S. (1979). 75 Se-release: A short and long term assay system for cellular cytotoxicity. *Zeitschrift Für Immunitätsforschung: Immunobiology*, 155(4), 287-311.
- Masanet, J., Gomez-Lechon, M.J., & Castell, J.V. (1988). Hepatic toxicity of paraquat in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 2(4), 275-282. [http://dx.doi.org/10.1016/0887-2333\(88\)90046-X](http://dx.doi.org/10.1016/0887-2333(88)90046-X)
- Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., & Moo-Puc, R. (2009). *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 462-465. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.012>

- Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat Prod.*, 70(0163-3864 (Print)), 461-477. <http://doi.org/10.1021/np068054v>
- Newman, D.J., & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477. <http://doi.org/10.1021/np068054v>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17(3), 215-234. <http://doi.org/10.1039/a902202c>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037. <http://doi.org/10.1021/np030096l>
- Nicolaou, K.C., Guy, R.K., & Potier, P. (1996). Taxoids: New Weapons against Cancer. *Scientific American*, june, 94-98. <http://doi.org/10.1038/scientificamerican0696-94>
- Oberlies, N.H., & Kroll, D.J. (2004). Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products*, 67(2), 129-135. <http://doi.org/10.1021/np030498t>
- Ohta, S., Nishio, K., Kubo, S., Nishio, M., Ohmori, T., Takahashi, T. et al. (1993). Characterisation of a vindesine-resistant human small-cell lung cancer cell line. *British Journal of Cancer*, 68(1), 74-79. Recuperado de <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23178554> \n <http://sfx.huji.ac.il:3210/sfxst3?sid=EMBASE&issn=00070920&id=doi:&atitle=Characterisation+of+a+vindesine-resistant+human+small-cell+lung+cancer+cell+line&stitle=BR.+J.+C.> <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1993.289>
- Oldham, R.K., Ortaldo, J.R., Holden, H.T., & Herberman, R.B. (1977). Direct comparison of three isotopic release microtoxicity assays as measures of cell-mediated immunity to Gross virus-induced lymphomas in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(4), 1061-1067.

- Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M.-K. et al. (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 25. <http://doi.org/10.1155/2013/627375>.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., & Hoyer, D. (2015). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 00(00), 8-11. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
- Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., & Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: A comparative overview. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), 465-473. <http://doi.org/10.1093/ecam/neh140>
- Pieters, L., & Vlietinck, A.J. (2005). Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 57-60. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.029>
- Ramawat, K.G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. En *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (pp. 7-32). Berlin, Alemania: Springer. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4_2)
- Rowinsky, E.K., & Donehower, R.C. (1995). Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine*, 332(15), 1004-1014. <http://doi.org/10.1056/NEJM199504133321507>
- Saeed, M.E.M., Abdelgadir, H., Sugimoto, Y., Khalid, H.E., & Efferth, T. (2015). Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multi-drug-resistant cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 644-658. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.005>
- Scaduto, R.C., & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1), 469-477. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0)
- Shu, Y.Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61(8), 1053-1071. <http://doi.org/10.1021/np9800102>

- Silva, J.S., Moura, M.D., Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F., & Barbosa-Filho, J.M. (2003). Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(2-3), 221-232. <http://doi.org/10.1078/094471103321659988>
- Szekeres, J., Pacsa, A.S., & Pejtsik, B. (1981). Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *Journal of Immunological Methods*, 40(2), 151-154. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90061-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(81)90061-2)
- Takimoto, C.H., & Thomas, R. (2000). The clinical development of 9-amino-camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 922, 224-236. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193898>
- Tannock, I.F., & Hill, R.P. (1998). *The Basic Science of Oncology* (3rd ed.). U.S.A.: McGraw Hill.
- Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R., & Jiménez-Estrada, M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica*, 31(3), 97-111.
- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167-190. [http://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](http://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](http://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-1)
- Warber, S. (1999). Models of action at target sites. En Kaufman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., & Brielmann, H.L. (Eds.). *Natural Products from Plants* (1st ed., pp. 158-181). U.S.A.: CRC Press.
- Xiao, Z., Vance, J.R., Bastow, K.F., Brossi, A., Wang, H.-K., & Lee, K.-H. (2004). Antitumor agents. Part 235: Novel 4'-ester etoposide analogues as potent DNA topoisomerase II inhibitors with improved therapeutic potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(12), 3363-3369. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.056>

Xu, H., Lv, M., & Tian, X. (2009). A Review on Hemisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: 2003- 2007. *Current Medicinal Chemistry*, 16(3), 327-349.  
<http://doi.org/10.2174/092986709787002682>

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

---

**Ethel Daniela Cabello-Ruiz<sup>1</sup>, María Adriana  
Núñez-González<sup>1</sup>, Víctor Manuel Torres de la Cruz<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, Nuevo León, México.

[ethel.cabellorz@uanl.edu.mx](mailto:ethel.cabellorz@uanl.edu.mx), [maria.nunezrd@uanl.edu.mx](mailto:maria.nunezrd@uanl.edu.mx),  
[victortorres@accuramonterrey.com](mailto:victortorres@accuramonterrey.com)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.325>

Cabello-Ruiz, E.D., Núñez-González, M.A., & Torres de la Cruz, V.M. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 313-350.

## Resumen

Las proteínas y péptidos son motivo de estudio en diversas disciplinas dado que se ha demostrado que no únicamente presentan actividad estructural, sino que pueden presentar actividad biológica favorable para el ser humano o para la planta. En este sentido, han sido reportadas numerosas actividades para estos metabolitos desde una antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, fungicida, hasta inmunomoduladores y anticancerígenos, sin olvidar mencionar que poseen algunos otros usos en el área de la salud.

Recientemente se han empleado herramientas proteómicas para el desarrollo de estudios en donde se logra la caracterización de algunas proteínas y péptidos expresados por genomas, permitiendo establecer las interacciones entre estos metabolitos y esclarecer sus funciones, aunado a la posible identificación de marcadores para diagnóstico de enfermedades. El desarrollo de dichos estudios resulta prometedor para el uso potencial de estos metabolitos como nuevos fármacos, debido a las múltiples actividades biológicas ya reportadas.

## Palabras clave

Actividad biológica de proteínas y péptidos de plantas, proteómica para identificación de marcadores en el diagnóstico de enfermedades.

## 10.1. Introducción

Las proteínas son uno de los constituyentes primarios de los organismos vivos. Incluso en las plantas, donde los carbohidratos son los componentes estructurales más abundantes, las proteínas se encuentran presentes en aquellas partes que son responsables del crecimiento y la reproducción. La estructura fundamental de las proteínas es relativamente sencilla; son largas cadenas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amida, también llamados enlaces peptídicos, entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Estas cadenas se denominan polipéptidos. Una proteína puede estar constituida por una única cadena polipeptídica o por varias asociadas entre sí y están constituidas por unos veinte aminoácidos diferentes (Ege, 2004).

Los efectos benéficos a la salud por parte de las proteínas, podrían ser atribuidos a numerosas secuencias de péptidos que poseen actividades antimicrobianas, antioxidativas, antitrombóticas, antihipertensiva, inmunomoduladoras, entre otras. La actividad se basa en la composición inherente y la secuencia de sus aminoácidos, así como de su estructura. El tamaño de las secuencias activas puede variar de dos a veinte aminoácidos, y algunos péptidos son conocidos por sus propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2003; H Meisel & FitzGerald, 2003; Shimizu, 2004).

Los péptidos de plantas, moléculas menores de 10 kDa, pueden ser divididas esencialmente dentro de dos categorías: péptidos bioactivos y péptidos degradadores que resultan de la actividad de enzimas proteolíticas (Fricker, Lim, Pan & Che, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo y que finalmente pueden, influenciar en la salud (Kitts & Weiler, 2003).

En las plantas, muchas de las proteínas ubicadas en el compartimiento extracelular y la endomembrana están glicosiladas, es decir, un grupo azúcar se une de forma covalente a una proteína para formar una glicoproteína, lo cual trae como consecuencia un gran impacto tanto es sus propiedades fisicoquímicas como para sus funciones biológicas. Las glicoproteínas, participan en la formación de la pared celular, diferenciación de tejidos, embriogénesis y adhesión sexual en

algunas especies de plantas (Berg, Stryer, Tymoczko & Macarulla, 2008; Ren, Bretthauer & Castellino, 1995).

Las secuencias glucídicas de las glicoproteínas son muy variadas, según los tipos moleculares y las especies estudiadas. Sin embargo, las secuencias mejor conocidas presentan analogías en las zonas próximas a la unión con la proteína. Si bien las distintas cadenas glucídicas de una glicoproteína son aparentemente iguales, se han encontrado ligeras modificaciones estructurales entre ellas. La composición de la fracción proteica es variable de unas glicoproteínas a otras. No está claro cuáles son los aminoácidos implicados en la unión con la cadena glucídica, sin embargo las funciones tan diversas de las glicoproteínas son resultado directo de sus estructuras (Hernández Rodríguez & Sastre Gallego, 1999).

Los carbohidratos están presentes en un porcentaje en peso mucho menor en las glicoproteínas que en los proteoglicanos, de hecho muchas de las glicoproteínas se forman por la unión de carbohidratos a proteínas solubles. La naturaleza hidrofílica y polar de los azúcares pueden cambiar dramáticamente las características químicas de la proteína a la cual están glicosilando (Berg et al., 2008; Noiva, 2010).

Las plantas representan una fuente importante de proteínas y péptidos con numerosas actividades biológicas no sólo como parte de su metabolismo, sino también benéficas para el ser humano.

Los péptidos y proteínas han sido aislados de las raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado diversas actividades.

## 10.2. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas orgánicas, constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), entre otros (Calvo-Bruzos, Gómez-Candela, Royo-Bordonada & López-Nomdedeu, 2012). Estas moléculas corresponden a las estructuras primarias dentro del metabolismo de los seres vivos, junto con los carbohidratos y lípidos. En general, las proteínas pueden clasificarse de acuerdo a:

1. Sus propiedades físicas y/o químicas: grupos de proteínas basados en su tamaño, estructura, solubilidad o grado de basicidad.
2. El tipo de moléculas al que pueden unirse: lipoproteínas (grupo prostético lipídico), nucleoproteínas (grupo prostético núcleo proteico), cromoproteínas (grupo prostético pigmento), metaloproteínas (grupo prostético metálico) y glicoproteínas (grupo prostético carbohidrato).
3. La función en la célula: pueden ser agrupadas en tres clases generales basadas en su función, las cuales corresponden a proteínas estructurales (proteínas de membranas, paredes celulares o citoesqueletos), proteínas de almacenamiento y enzimas.

De acuerdo a ésta última clasificación, en las plantas, las proteínas de almacenamiento son encontradas en forma abundante en las semillas, sirven como fuentes de nitrógeno y de aminoácidos que son utilizados durante su germinación. Durante su desarrollo, las semillas sintetizan relativamente grandes cantidades de reservas alimenticias que son acumuladas en tejidos de almacenamientos tales como el cotiledón o endosperma. Estos materiales de reserva son los que permitirán el crecimiento y desarrollo de la plántula, hasta que ésta pueda establecerse como una unidad fotosintetizadora y comenzar su vida autótrofa independiente. Entre estas sustancias de reserva se incluyen lípidos, carbohidratos, proteínas, y varios componentes inorgánicos (Duranti, 2006).

Las proteínas de reserva, denominadas de este modo por creerse que no desempeñan función metabólica o estructural alguna, están acumuladas en cuerpos específicos, cuerpos proteicos, que se encuentran al azar en el citoplasma. Durante la germinación, estas sustancias son hidrolizadas y transportadas al eje embrionario en crecimiento, produciendo un cambio en las estructuras. Durante esta etapa, los cuerpos proteicos sufren un aumento de tamaño, y las proteínas empiezan a ser desnaturalizadas por las enzimas proteolíticas (Duranti, 2006; Hong et al., 2008).

En general, las proteínas de origen vegetal presentan muy diversas actividades biológicas no sólo como parte de la estructura de la planta o como parte fundamental de almacenamiento, además en la defensa contra diferentes plagas. Dichas proteínas son actualmente motivo de estudio por sus posibles aplicacio-

nes dentro de la agricultura. Además, el enfoque de la proteómica dentro de los productos naturales ha tomado importancia por su potencial aplicación dentro la biotecnología.

Las propiedades antimicrobianas de proteínas y péptidos de diferentes fuentes han sido estudiadas por cerca de 4 décadas, debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los fármacos disponibles. Los péptidos y proteínas expresan su actividad antimicrobiana ocasionando lisis por unión y ruptura de la membrana de los microorganismos, otros penetran la membrana e interactúan con el interior de la célula u ocasionan la formación de poros produciendo fuga del contenido intracelular y por ende, causando su muerte (X. Huang, Xie & Gong, 2000).

Los péptidos y proteínas han sido aislados de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y han demostrado actividad contra fitopatógenos, así como contra bacterias patógenas para los seres humanos (Pelegriani & Franco, 2005; Selitrennikoff, 2001; Terras et al., 1995).

### 10.3. Péptidos

Los péptidos funcionales o bioactivos han sido definidos como tales, desde hace casi dos décadas. Desde aquel tiempo, se definieron como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Hans Meisel, 1998). Sin embargo, unos años después, (Kitts & Weiler, 2003) retomaron el concepto para definirlo como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo o condiciones y que pueden finalmente, influenciar en la salud. Generalmente estas moléculas son de un tamaño pequeño que va de 3 a 20 aminoácidos, aunque en ocasiones puede exceder esa longitud (Shahidi & Zhong, 2008). Inclusive se sabe que al administrarse por vía oral al ser humano, estas moléculas pueden ejercer efectos sobre los diversos sistemas, tales como el circulatorio, digestivo, inmunológico y nervioso (Korhonen & Pihlanto, 2003; H Meisel & FitzGerald, 2003). En este sentido, se cuentan con reportes científicos de que estas moléculas pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a

nivel sistémico; por tanto, se dice que los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular del ser humano y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Roberts & Zaloga, 1994).

Más tarde mencionan que los péptidos bioactivos forman parte de la respuesta innata provocada por la mayoría de los organismos. La mayoría de los péptidos bioactivos producidos en las plantas poseen propiedades microbicidas, también forman parte de la señalización celular. Mencionan que la acción biológica de péptidos bioactivos inicia con la unión a la membrana diana seguido por permeabilización de la membrana y ruptura (Salas, Badillo-Corona, Ramirez-Sotelo & Oliver-Salvador, 2015).

Desde entonces, las proteínas de diferente origen (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos con diferentes actividades biológicas para el ser humano, así como su empleo en la biotecnología (Korhonen & Pihlanto, 2003). Inclusive dada la importancia que han tomado los péptidos por sus múltiples actividades, desde el 2006 se tiene el reporte de estudios donde se dedicaron a obtener péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (Martínez-Augustín & Martínez de Victoria, 2006).

Pese a la tecnología que se aplica sobre estas moléculas, para la optimización de un efecto benéfico para el ser humano, actualmente estas moléculas siguen siendo estudiadas, siendo ya reportadas algunas de ellas con diversas actividades.

En la actualidad, algunas cepas de microorganismos patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales y actualmente disponibles. Esto refleja una gran amenaza a la salud de las personas, por lo que el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos es una manera eficaz para resolver el problema que se ha generado por parte de los microorganismos. Un gran grupo de compuestos naturales de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana ha sido aislado de plantas y animales, como lo son los péptidos con la mayor generalización, los cuales representan una nueva generación de antimicrobianos y precisamente entre una de las actividades más estudiadas para péptidos, es la antimicrobiana.

Proteína o péptido	Origen	Actividad biológica	Referencia
Tioninas (defensinas) ciclótidas (ricas en glicina) albúminas 2S heveína		Antibacteriana	(Daly, Rosengren & Craik, 2009; Pelegri & Franco, 2005; Selitrennikoff, 2001; Witkowska, Bartys & Gamian, 2008)
Heveína (Ac-AMP1 y Ac-AMP1)		Inhibición de <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Sarcina lutea</i> en concentraciones de 40 y 250 g/mL, respectivamente	(Martins et al., 1996)
Circulinas AB y ciclopsicotrida	Ciclótidas	Inhibición <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> en concentraciones micromolares	(Tam, Lu, Yang, & Chiu, 1999)
Cn-AMP1 (876 Da) Cy-AMP2 (4577.4 Da)	<i>Cocos nucifera</i> <i>Cycas revoluta</i>	Antibacteriana contra Gram positivas y Gram negativas	(Mandal et al., 2009)
Ginkbilobina (4213.8 Da)	Ginkgo biloba		(H. Wang & Ng, 2000)
Kalata B2 (2979.4 Da)	Oldenlandia affinis	Antibacteriana contra Gram positivas	(Jennings, West, Waive, Craik, & Anderson, 2001)
Pg-AMP1 (6029.4 Da)	Psidium guajava	Antibacteriana contra Gram negativas	(Pelegri et al., 2008)
Defensinas, lectinas		Antifúngica contra fitopatógenos	(Yan et al., 2015)
Glicoproteína (28 kDa)	Withania somnifera (tubérculo)	Antifúngica contra fitopatógenos: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. verticilloides</i> Antibacteriana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	(Girish et al., 2006)

<b>Proteína o péptido</b>	<b>Origen</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
Glicoproteína Mj-AMPs (8 Da)	Mirabilis jalapa	Antifúngica contra <i>F. culmorum</i> .	(Cammue et al., 1992)
Proteína (14 kDa)	Aloe vera	Antifúngica contra <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> y <i>Candida albicans</i>	(Das et al., 2011)
500 proteínas	Hojas de arroz	Unión, enzimática, facilitador de transporte, inhibidor, constituyente estructural, catalítica	(Cao et al., 2014)
Lectina (8.7 kDa)	Allium chinense	Aglutinante 60 mg/mL Potencial anticancerígeno	(Xiao et al., 2015)
Proteasas (M36, M35, M43, y S8)	Onygena corvina	Proteasas	(Y. Huang, Busk, Herbst & Lange, 2015)
Frataxina subcelular	Arabidopsis	Biosíntesis del grupo hemo y azufre (Fe-S) en la región mitocondrial	(Turowski et al., 2015)
Lectina (35 kDa)	Aloe vera	Estimulación mitótica de linfocitos, activación del complemento, alternativa, antiinflamatoria, antiúlceras y antitumoral, además de presentar actividad mitogénica.	(Koike et al., 1995)
Purotionina	Triticum aestivum	Capacidad de inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos tales como <i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> y <i>Corynebacterium michiganense</i>	(Fernandez de Caleyá, Gonzalez-Pascual, Garcia-Olmedo & Carbonero, 1972)
Peptidomiméticos		Antibacteriana	(Citterio et al., 2016)

*Continúa*

## Continuación

Proteína o péptido	Origen	Actividad biológica	Referencia
Péptidos Pp-AMP1 y Pp-AMP2		Actividad contra varios fitopatógenos, incluyendo <i>Eriminia carotovora</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> y <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , en una concentración de 13-25 mg/mL	(Witherup et al., 1994)
SmAMP3	<i>Stellaria media</i> L.	Antifúngica a una concentración micromolar	(Rogozhin et al., 2015)
Péptidos ricos en cisteína (NCR)	Rhizobium	Promueve la importación de péptidos NCR y proporciona protección contra microorganismos.	(Guefrachi et al., 2015)
Beta-defensinas	Oreochromis niloticus	Potenciador de respuesta inmune	(Dong et al., 2015)
Péptidos antifúngicos		Insecticida, antifúngico	(Faruck, Yusuf & Chowdhury, 2015)
Iturina A	Bacillus	Antifúngico	(Kavagoe et al., 2015)
Péptidos antimicrobianos sintéticos (AMPS)		Antimicrobiana	(Datta et al., 2015)
Péptido derivado de RhoA		Antiviral	(Ortega-Berlanga et al., 2015)
Péptidos	Leche y los productos lácteos	Inmunomoduladores	(Gauthier, Pouliot & Saint-Sauveur, 2006; Mulero-Cánovas, Zafrilla-Rentero, Martínez-Cachá-Martínez, Leal-Hernández & Abellán-Alemán, 2011)

Proteína o péptido	Origen	Actividad biológica	Referencia
Péptidos	Gluten de trigo	Estimulación postprandial de liberación de insulina	(Fukudome, Shimatsu, Suganuma & Yoshikawa, 1995)
Péptidos	Hidrolizados de gelatina, de clara de huevo y productos lácteos, etc.	Antioxidantes	(Davalos, Gomez-Cordoves & Bartolome, 2004; Gibbs, Zougman, Masse & Mulligan, 2004; Gobetti, Stepaniak, De Angelis, Corsetti & Di Cagno, 2002; Graszkwicz, Żelazko, Trziszka & Polanowski, 2007; Kim, Byun, Park & Shahidi, 2001; Venereo-Gutiérrez, 2002)
Polisacárido polimanoano acetilado (APMP)	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	Todas las características que determinaron, indicaban que la actividad estabilizada dentro de la APMP pertenece a la familia peroxidasa secretora básica con varios usos biotecnológicos	(Vittori, Martin, & Sabater, 2012)
Péptidos	<i>Anethum graveolens</i>	Actividad membrano trófica (Cito tóxica).	(Kulikova et al., 2015)
Péptido secuencia SVTHHLGGGS	<i>Oryza sativa</i> y <i>Triticum urartu</i>	Reducción de la actividad <i>in vitro</i> de la poligalacturonasa.	(Warren, Kasun, Leonard & Kirkpatrick, 2016)
Proteasas recombinantes pertenecientes a la familia Queratina S8	Onygena corvina	Actividad de degradación	(Y. Huang et al., 2015)

Tabla 1. Proteínas y péptidos con actividad biológica

#### 10.4. Proteómica: un nuevo enfoque de estudio

El término proteoma fue acuñado desde 1994 y es el equivalente lingüístico al concepto de genoma. Este término se define como el grupo completo de proteínas que son expresadas por el genoma completo durante el tiempo de vida de una célula. Actualmente la tendencia en el área proteómica es hacia el estudio de proteomas completos, interactomas, fosfoproteomas, secretomas y búsqueda de biomarcadores que a diferencia de los métodos basados en DNA y RNA, la ventaja de los marcadores proteómicos es su diversidad. Recientemente se ha desarrollado la proteómica para el estudio de los productos naturales, siendo las plantas una de las matrices más estudiadas dentro de ésta área. Han sido codificados entre 20-30000 genes en el genoma de las plantas de las cuales, casi 1000 corresponden a proteasas, y más de un centenar pertenecen a las 15 familias conocidas de proteasas ricas en cisteína las cuales se sintetizan como pro-enzimas (Brown, 2008).

De acuerdo a lo anterior, las plantas han evolucionado para sintetizar una variedad de compuestos nocivos para hacer frente a circunstancias desfavorables, entre los cuales se encuentran un gran grupo de proteínas tóxicas que juegan un papel crítico en la defensa de la planta contra los depredadores y los microorganismos. Hasta ahora, una amplia gama de proteínas perjudiciales ha sido descubiertas en plantas incluyendo lectinas, proteínas inactivadoras de ribosomas, inhibidores de la proteasa, ureasas, péptidos antimicrobianos y toxinas formadoras de poros. Para desempeñar su papel en la defensa de las plantas, estas proteínas presentan diversos grados de toxicidad para animales, insectos, bacterias u hongos. Numerosos estudios se han llevado a cabo para investigar los efectos tóxicos y modo de acción de estas proteínas vegetales con el fin de explorar su posible aplicación. De hecho, a causa de sus actividades biológicas, proteínas vegetales tóxicas son también consideradas como herramientas potencialmente útiles en la protección de cultivos y en aplicaciones biomédicas, tales como el tratamiento del cáncer. Los genes que codifican proteínas vegetales tóxicas se han introducido en los genomas de los cultivos utilizando tecnología de ingeniería genética con el fin de aumentar la resistencia de la planta frente a patógenos y enfermedades (Dang & Van Damme, 2015).

En la era post-genómica, muchas herramientas se han desarrollado para acelerar la investigación de las funciones de los genes. Las proteínas fluorescentes han sido ampliamente utilizadas como etiquetas de proteínas para estudiar su

localización subcelular en las plantas. En este sentido, se han generado varios marcadores con fluorescencia de orgánulos en dicotiledóneas. Sin embargo, en el modelo de la planta de arroz, faltaban las líneas de marcador fluorescente u orgánulos útiles y fiables por lo que Wu et al. (2016), desarrollaron ocho marcadores de orgánulos basados en las buenas prácticas agrarias del arroz transgénico y crearon un conjunto de vectores de enlace basados en DsRed para combinar con las líneas de marcador. La co-localización de líneas de marcador GFP-fusión y las proteínas DsRed de fusión proporcionaron una plataforma conveniente *in vivo* o *in vitro* para el análisis de la localización subcelular de las proteínas de arroz.

Además recientemente Li et al. (2015), compararon las propiedades bioquímicas y enzimáticas de cuatro proteínas oxalato oxidasa (OsOx1-4) purificadas a partir de las hojas de plantas transgénicas del arroz. Las enzimas oxalato oxidasas representan un grupo de moléculas importantes dentro del metabolismo de las plantas ya que producen la oxidación de los oxalatos, provocando una menor biomineeralización en las plantas y por ende, su incapacidad de adaptación hacia ciertos ambientes. Dichos autores, mencionan que la alineación de sus secuencias de aminoácidos reveló divergencia principalmente en los péptidos de señalización. La masa de OsOx01 resultó muy similar a la del OsOx03, pero fue menor que la del OsOx02 y OsOx04, mientras que la subunidad de la primera (OsOx01) fue menor que la de OsOx03. El OsOx01 y OsOx04 tuvieron una alta actividad enzimática a pH 8,5 resultando cercano al pH óptimo (4,0); el OsOx03 no tuvo mucha variabilidad en el pH 6-9. El OsOx02 y OsOx03 mantuvieron su actividad enzimática al calentarse por una hora a 70° C, mientras que OsOx01 y OsOx04 perdieron el 30% de su actividad. Esto permitió establecer algunas condiciones para la actividad enzimática de las proteínas ya mencionadas, proporcionando de esta manera información valiosa para la producción de plantas transgénicas.

Se conoce que la traducción es uno de los procesos que requieren de mayor energía en una célula viva y por lo tanto está regulado cuidadosamente. Dicha actividad, está estrechamente vinculada con el control del crecimiento y el mecanismo de regulación del mismo en las plantas. El ribosoma eucariota, el centro de estos procesos importantes, se compone de cerca de ochenta proteínas diferentes (dependiendo de la especie) y cuatro grandes RNAs reunidos en dos subunidades altamente conservadas. En las plantas y en menor medida en las levaduras, las R-proteínas están codificadas por más de un gen transcrito activamente. Con frecuencia los genes no codifican proteínas idénticas y están reguladas por las condiciones de crecimiento y desarrollo, por tanto, los ribosomas poseen un

contenido heterogéneo de proteínas. La importancia fisiológica de regulación y de esta heterogeneidad es aún desconocida. Sin embargo actualmente se sabe que los ribosomas citosólicos de *Arabidopsis thaliana* son grandes complejos que contienen cerca de 81 proteínas ribosomales (R-proteínas) distintas, cuatro ARN ribosómicos (ARNr) y proteínas asociadas (no-ribosomales), además de que en las plantas las r-proteínas de los ribosomas citosólicos están codificadas por diferentes genes. Hummel et al. (2015), realizaron una investigación proteómica de la traducción activa de los ribosomas citosólicos en diferentes etapas de desarrollo de la planta *A. thaliana*, ya que las distinciones en las secuencias de los miembros de la familia de genes que codifican a las R-proteínas, son una fuente de variación entre los ribosomas. Estos autores identificaron un total de 70 diferentes R-proteínas marcando una base importante para futuras investigaciones sobre la estructura dinámica y la función de los ribosomas de plantas.

Se ha reportado también, que la traducción mitocondrial implica una compleja interacción entre características y funciones, que aunque se han reconocido los componentes básicos de la traducción mitocondrial, se han identificado muy pocos factores proteicos que ayuden a los ribosomas para la codificación (ARNm) en plantas superiores. Haili et al. (2016), identificaron una proteína (Mtl1) de la misma planta modelo *A. thaliana*, demostrando que es esencial para la traducción de la subunidad mitocondrial NADH deshidrogenasa 7. Además, establecieron que la proteína Mtl1 es fundamental para entender la multifuncionalidad de las proteínas como parte del metabolismo de las plantas y los mecanismos que rigen la traducción del ARNm y el empalme de intrones en las mitocondrias de plantas.

En el mismo año, Panstruga, Baumgarten & Bernhagen (2016), encontraron que el genoma de *A. thaliana* alberga tres genes, de los cuales dos están principalmente expresados en órganos aéreos, mientras que el tercer gen muestra la acumulación de transcripción inducible por estrés. El producto de este último gen probablemente se localiza en los peroxisomas. La predicción de la estructura sugiere, según los autores, que las tres proteínas denominadas como MDL (MIF-HsDDT) de *Arabidopsis* se asemejan a la estructura secundaria y terciaria de MIF humano. Además se tiene que las proteínas similares a MIF se encuentran en todas las especies del reino vegetal, con una complejidad cada vez mayor conforme avanza evolutivamente los taxones vegetales. Finalmente, predijeron que las proteínas vegetales MDL carecen de actividad oxidoreductasa, pero posiblemente compartan la actividad con la tautomerasa humana MIF/DDT.

Igualmente la replicación del ADN y la transcripción regulan el desarrollo de plantas que son dependientes de la accesibilidad a la cromatina. Las proteínas pertenecientes a la familia de dominio AgeNet/Tudor son conocidas como histonas con modificación de «lectores» y se clasifican como proteínas de remodelación de la cromatina. Las modificaciones de las histonas y remodelación de la cromatina tienen profundos efectos sobre la expresión génica, así como en la replicación del ADN, sin embargo, el cómo de estos procesos están integrados estos procesos, no ha sido completamente dilucidado. Brasil et al. (2015), analizaron la familia de proteínas de dominio AgeNet/Tudor en el reino vegetal y estudiaron la organización de esta familia durante la evolución de las plantas. Dentro del desarrollo de este estudio, caracterizaron un miembro de proteínas de *A. thaliana* con nombre AIP1, que alberga dominios AgeNet/Tudor y DUF724. Demostraron que AIP1 interactúa con ABAP1, un regulador de replicación del ADN y la transcripción de genes en la planta, con una modificación de las histonas de la planta «lector» (LHP1) y con las histonas no modificadas. De acuerdo con los autores AIP1 se expresa en los tejidos reproductivos y determina la temporización, retrasos y regulación del desarrollo de la flor, sentando de esta manera la posible intervención dentro de la regularización del desarrollo de las plantas.

Dentro de la clasificación de las proteínas de acuerdo con su función se encuentran también las enzimas, que aunque se han reconocido ampliamente y ya han sido estudiadas desde un enfoque biotecnológico en plantas, recientemente han sido estudiadas como indicadores de crecimiento vegetal. En este sentido, *Trichoderma atroviride* es un hongo simbiótico que interactúa con las raíces y estimula el crecimiento vegetal y la defensa. Las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas con *T. atroviride* han mostrado una raíz alterada y una mayor biomasa comparándolas con las plantas cultivadas axénicamente. Estos efectos se relacionaron con la actividad incrementada de la proteína mitogen-activada quinasa 6 (MPK6) ya que las raíces primarias mutantes de MPK6 mostraron inhibición del crecimiento por *T. atroviride*. Se sabe que *T. atroviride* produce etileno (ET), el cual aumenta con L-metionina, por lo tanto se ha demostrado que *T. atroviride* altera el sistema de raíces MPK6, así como su modulación de la actividad, la producción de ET y la acción de auxina (Contreras-Cornejo et al., 2015).

Además se tiene el reporte de una proteína ligasa hect ubiquitina (UPL) que se caracteriza por que contiene un dominio hect conservado de aproximadamente 350 aminoácidos en el extremo C terminal. Actualmente se sabe que algunas UPLs pueden estar involucradas en el desarrollo de tricomas y la senescencia de

las hojas en *Arabidopsis*. Esto ha permitido asociar la función de las mencionadas proteínas especialmente en las plantas rosáceas (Xu, Xing, Cui, Chen & Wang, 2016).

La formación de órganos laterales en las plantas está muy bien regulada por factores de transcripción y hormonas tales como auxinas y brasinoesteroides. Bajo esta premisa, identificaron al péptido denominado como TAX1 como el primer péptido de una planta con una actividad de señalización, el cual influye en la separación lateral de órganos e implica la existencia de una cascada de señales que regulan el desarrollo de la planta modelo *Arabidopsis*. Estos autores confirman que la formación de órganos está regulada por la transcripción y por hormonas como auxinas y brasinoesteroides. Además establecieron que el péptido de señalización encontrado (TAX1) es rico en cisteína, sin embargo la sobre explotación de la misma causó menor brote y un menor desarrollo de la raíz primaria (Colling et al., 2015).

Otra planta de interés comercial es la *Nicotiana tabacum*. En este caso, la proteína 4/1 es de función desconocida pero está codificada por un gen de una sola copia en la mayoría de las plantas superiores. Se ha demostrado que la proteína 4/1 de *N. tabacum* (proteína Nt-4/1) posee una estructura alfa-helicoidal y se ha expresado predominantemente en los tejidos conductores. Morozov et al. (2015), realizaron el análisis de genes 4/1 y las proteínas codificadas de las plantas rastrojeras, sugiriendo que dichas proteínas son probablemente importantes para el desarrollo de plantas pero no necesarias para una función metabólica primaria en las mismas.

Se tiene bien establecido por otro lado, que los genomas de las plantas codifican varias secuencias pequeñas de RNAs que funcionan en distintas vías de silenciamiento. Sin embargo, la abundancia y diversidad de clases pequeñas de ARN varía entre las especies de plantas, lo que sugiere la coevolución entre adaptaciones ambientales y mecanismos de silenciamiento de genes. La biogénesis de los pequeños RNAs en las plantas se sabe, pero actualmente se está empezando a descubrir su regulación y actividad compleja. Borges & Martienssen (2015), mostraron la biogénesis de los pequeños ARN de plantas, como microRNAs, RNAs secundarios y RNAs heterocromáticas, así como sus diversas funciones celulares y de desarrollo, en particular en las transiciones reproductivas, la importancia genómica y para mutación.

Asimismo se tiene el reporte de proteínas con zinc, las cuales se caracterizan por la presencia de tres residuos de cisteína y un residuo de histidina, desempeñando papeles importantes en el procesamiento del ARN en las plantas. Las proteínas con zinc han mostrado capacidades para funcionar en tolerancia de estrés. Chen et al. (2015), analizaron dichas proteínas en *Zea mays*, *Oryza sativa*, y *Sorghum bicolor*. Estas, se dividieron en cuatro grupos basados en el análisis filogenético y reportaron inversiones, multiplicaciones y supresión, demostrando que esto sucede en el transcurso de la evolución además de que investigaron los patrones que se producen dentro del proceso evolutivo de algunos pares de genes que confieren tolerancia al estrés abiótico.

Actualmente se sabe que la región básica de leucina (bzip) es uno de los factores de transcripción (TF) importante en familias vegetales, asociadas también con respuestas a estrés abiótico. Que et al. (2015), clasificaron 10 factores bZIP en la zanahoria con base en sus dominios de unión al ADN. Se analizaron las que actúan como reguladores en cis y estados plegables de estos 10 factores. Los autores sugieren su importancia durante el curso de la evolución de las plantas. Además de que actúan en elementos cis y el estado de plegado de las proteínas, son importantes para la unión al ADN y podrían afectar a la expresión génica. De acuerdo con los autores seis genes mostraron respuestas a estrés abiótico.

Igualmente se sabe que los cambios intracelulares en iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en respuesta a diferentes estímulos bióticos y abióticos, son detectados por diversas proteínas de sensor en la célula vegetal. La calmodulina (CaM) es una de las proteínas de detección de  $\text{Ca}^{2+}$  más ampliamente estudiada y ha demostrado estar implicada en la transducción de señales por presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una serie de proteínas de unión a CaM también han sido implicados en las respuestas al estrés en las plantas, destacando el papel central desempeñado por la CAM en la adaptación a las condiciones ambientales adversas. La identificación y caracterización de proteínas CaM modulada en relación a diferentes estreses abióticos podría, llegar a ser esencial para una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados en la tolerancia al estrés abiótico en plantas. Inclusive se ha demostrado que CaM puede modular varias actividades de quinasas y fosfatasas, proporcionando así mayor versatilidad a las vías de transducción de señales de estrés asociada. Viridi, Singh & Singh (2015), proponen a CaM como un integrador de diferentes vías de señalización de estrés, que permite a las plantas mantener la homeostasis entre los diferentes procesos celulares y sus implicaciones en el aumento de la tolerancia al estrés abiótico en plantas.

Adicionalmente se sabe que las plantas han evolucionado un gran número de factores de transcripción (TF), los cuales se han enriquecido a través de genes duplicados, destacando sus funciones en redes reguladoras complejas. Los genes similares a AP2/EREBP constituyen una gran familia de factores de transcripción en plantas y participan en el desarrollo y las respuestas al estrés. Para sondear la conservación y divergencia de los genes AP2/EREBP, Zeng et al. (2015) analizaron los patrones de duplicación de la familia *Brassicaceae* e identificaron las proteínas de *Arabidopsis* que interactúan con las proteínas AP2/EREBP. Encontraron que muchos duplicados AP2/EREBP son generados en un estadio temprano en la historia *Brassicaceae* pero que se pierden rápidamente, pero muchos otros fueron retenidos en todas las especies de *Brassicaceae* probadas, lo que sugiere divergencia temprana funcional seguida de conservación persistente. Los autores suponen que la interacción de las proteínas AP2 participa en muchas funciones del desarrollo y las respuestas al estrés, incluyendo la fotomorfogénesis, el desarrollo de flores, patogenicidad, respuestas a la sequía y al frío, al ácido abscísico y la señalización de la auxina.

Uno de los factores de mayor importancia dentro del estrés abiótico, es la oxidación o también denominado como estrés oxidativo debido al exceso de especies de radicales de oxígeno (ROS), los cuales contribuyen al desarrollo de diferentes enfermedades. El uso de antioxidantes puede prevenir estas enfermedades al contrarrestar los niveles de ROS. (2015) por: Torres-Fuentes, Contreras, Recio, Alaiz & Vioque. (2015), identificaron y secuenciaron algunos péptidos con actividad antioxidante. Las principales secuencias que determinaron fueron ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH las cuales, según los autores, son parte principal de una proteína de semilla. La mayoría de los péptidos que fueron identificados contenían histidina a lo que se le ha demostrado una actividad antioxidante. Estos resultados muestran que los péptidos antioxidantes representan un foco de interés para las industrias alimentarias y farmacéuticas para el desarrollo de nuevos productos nutracéuticos y alimentos funcionales.

Por otro lado las rizobacterias, son promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) que facilitan el crecimiento y mejoran la resistencia sistémica inducida (ISR) de las plantas contra una variedad de problemas ambientales. Kwon et al. (2016), realizaron un análisis integrador en el proteoma, transcriptoma y metaboloma de la raíz y brotes de *Arabidopsis* para investigar respuestas a la conocida cepa *Paenibacillus polymyxa* (*P. polymyxa*) E681. Se reporta que los pesos de raíces secas y brotes frescos incrementaron, mientras que la longitud de la raíz se redujo

mediante con el tratamiento con *P. polymyxa* E681. Mediante el enfoque 2DE en conjunto con el análisis MALDI-TOF/TOF revelaron un total de 41 proteínas (17 puntos en la raíz, 24 puntos en brote) que son expresadas diferencialmente en respuesta a *P. polymyxa* E681. Mediante procesamiento biológico y análisis de la bioinformática basada en la función molecular dieron lugar a su clasificación en siete grupos diferentes de proteínas. De éstos, 36 proteínas que incluyen el metabolismo de aminoácidos, antioxidantes, fotosíntesis, defensa y respuesta al estrés y proteínas relacionadas con las hormonas vegetales fueron enriquecidas, mientras que cinco proteínas incluyendo tres hidratos de carbono y un aminoácido estaban relacionados con el metabolismo, y una proteína identificada que resultó desconocida. Los autores sugieren que *P. polymyxa* E681 podría funcionar como un promotor de crecimiento inducido por el metabolismo, además de ayudar a la defensa de las plantas en contra de hongos patógenos mediante la activación de proteínas relacionadas con la defensa.

Recientemente se ha demostrado que los transcritos primarios de algunos péptidos (miPEPs), son codificados por miRNA y son capaces de aumentar la transcripción de su miRNA asociado. Couzigou, Laressergues, Becard & Combier (2015), discuten la posibilidad de utilizar miPEPs como una nueva herramienta para el análisis funcional de los miembros individuales de las familias miARN en plantas, incluso en plantas no modelo lo que podría evitar la transformación transgénica y minimizar la interpretación de artefactos. También plantean varias preguntas fundamentales y cruciales que deben ser la dirección de una comprensión más profunda de los mecanismos celulares y moleculares que subrayan la actividad reguladora de miPEPs.

Por otro lado, el ABC (transportador de unión a ATP) corresponde a la familia de transportadores en las plantas superiores en donde se sabe que son altamente distribuidos, en comparación con los de los mamíferos. Algunos miembros del transportador ABC vegetal, de la subfamilia B (ABCB) presentan una especificidad muy alta por cierto sustrato en comparación con sus homólogos de mamíferos que a menudo se asocian con fenómenos de resistencia. Aryal, Laurent & Geisler (2015), exponen las funciones destacadas de transportadores ABC de mamíferos y plantas y resumen su función sobre la regulación post-transcripcional con un enfoque en la fosforilación de proteínas. Según los autores, tomados en conjunto, parece que los transportadores ABC muestran una regulación evolutiva conservada, pero al mismo tiempo compleja por la fosforilación de proteínas, que aparentemente es estrechamente conectada con las interacciones proteína-proteína.

Como se ha descrito anteriormente los microorganismos, principalmente bacterias, han desarrollado resistencia a múltiples fármacos. Los péptidos antimicrobianos (AMP) derivados de animales y plantas emergen como una posible alternativa terapéutica, donde se propone la sustitución del antimicrobiano convencional. Se tienen algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos, no solo de origen vegetal, tal es el caso de los anuros los cuales son una de las fuentes naturales más ricas de AMP. Nacif-Marcal et al. (2015), trabajaron varios ciclos de clonación de ADNc de la piel de la rana arborícola brasileña (*Hypsiboas semilineatus*) que condujeron al aislamiento de una secuencia que codifica un precursor nueva AMP. El AMP Hs-1, tiene 20 residuos de aminoácidos, la mayoría en hélice alfa y con un peso molecular de 2144.6 Da. Éste péptido mostró una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas pero no mostró ningún efecto contra bacterias Gram-negativas, lo que sugiere que Hs-1 puede tener una selectiva acción para las bacterias Gram-positivas.

Asimismo se ha estudiado la actividad de proteínas con actividad antimicrobiana desde un enfoque proteómico. Se tiene el reporte de que proteínas pequeñas ricas en cisteína derivadas de patógenos (SSCP) son conocidas por ser una fuente común de efectores de hongos que provocan la resistencia o susceptibilidad de plantas hospedantes. Este grupo de proteínas no han sido bien estudiadas pese a que son la causa principal de fusariosis de la espiga (FHB), una enfermedad devastadora de trigo. Lu & Edwards (2016) reportaron un análisis exhaustivo de SSCPs codificadas en el genoma de este hongo y la selección de las proteínas efectoras a través de la proteómica y la secuencia de la transcripción. Identificaron un total de 190 SSCPs en el genoma de *Fusarium graminearum* en base a la presencia de secuencias N-terminales del péptido señal, tamaño y el contenido de cisteína ( $\geq 2\%$ ) de la proteínas maduras. La secuencia de análisis sugirió que 17 SSCPs conservan dominios funcionales, incluyendo dos homólogas a Ecp2, un efector conocido producido por el *Cladosporium fulvum*, un patógeno del tomate. El método basado en secretoma-*in vitro* que los autores proponen, puede ser aplicable para la identificación de efectores candidatos en otros patógenos ascomicetos de plantas de cultivo.

Por otro lado, durante la nodulación de las leguminosas suele presentarse infecciones en los pelos radiculares. Dicha infección requiere una reorganización del citoesqueleto de actina para permitir el establecimiento de estructuras de infección producidos por plantas llamados hilos de infección. Qiu et al. (2015) identificaron un gen necesario para la infección en los pelos radiculares de *Lotus*

*japonicus* por *Mesorhizobium loti*, denominado Scarn (SCAR-nodulación). Aunque la proteína Scarn está relacionada con SCAR2 y SCAR4 proveniente de *Arabidopsis thaliana*, identificaron otras proteínas-Scarn en las legumbres, inclusive los análisis de filogenia hicieron que sugiriera que Scarn puede haber surgido a partir de una duplicación de genes y adquirido funciones especializadas en simbiosis nódulo de la raíz.

Adicionalmente, se sabe que *Apolygus lucorum* es una de las plagas agrícolas más importantes con amplia gama de huéspedes con hábitos de alimentación crípticos en China. El comportamiento químico sensorial juega un papel importante en muchas etapas cruciales en la vida de *A. lucorum*, tales como la detección de señales de feromonas sexuales durante la época de reproducción y fragantes olores durante la floración de la planta huésped. Las proteínas de unión a odorantes (OBP)-están implicadas en las etapas iniciales de reconocimiento bioquímico en la percepción semiquímica. Yuan et al. (2015), utilizaron un enfoque basado en transcriptómica para identificar potenciales OBP en *A. lucorum*. Identificaron en total 38 genes putativos de OBP, en donde el análisis filogenético reveló que las proteínas OBP de *A. lucorum* están más estrechamente relacionados con las proteínas OBP de otras chinches. La mayoría de los ortólogos tenían patrones de expresión similares, lo que indica fuertemente que estos genes tienen la misma función en el olfato y gusto lo cual tiene un implicación importante en cultivos.

De igual manera, *Ralstonia solanacearum* es uno de los fitopatógenos más letales del mundo. Debido a su amplia gama de huéspedes, puede causar la enfermedad de marchitamiento en muchas especies de plantas de interés económico. Elhenawy et al. (2016), identificaron una O-oligosacaryltransferasa (O-OTasa) responsable de la proteína de la O-glicosilación en *R. solanacearum*. Mediante un análisis de la glicoproteomas revelaron que 20 proteínas, incluyendo pilinas de tipo IV son sustratos de este sistema de glicosilación. Aunque identificaron múltiples formas de glucano, la mayoría de los glicopéptidos se modificaron con un pentasacárido compuesto de HexNAc- (Pen) -Hex3, similar a la subunidad antígeno O del lipopolisacárido presente en múltiples cepas de *R. solanacearum*. Además, los autores llevaron a cabo un análisis proteómico comparativo, que permitió revelar que la pérdida de la glicosilación no está asociada con cambios proteoma.

Además, se ha estudiado las plantas modificadas genéticamente que expresan proteínas insecticidas. Uno de los estudios reportados es contra *Bacillus thuringiensis* (Bt), los cuales ofrecen opciones valiosas para el manejo de las plagas de insectos

con beneficios ambientales y económicos. El maíz (*Zea mays*) híbrido ha tenido éxito en el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Bernardi et al. (2015), optaron por realizar un tamizaje, seguida por la posterior selección del maíz MON 89034, el cual lo utilizaron para seleccionar una cepa de *S. frugiperda* capaz de sobrevivir contra Bt, tal como en el caso del maíz MON 89034, que expresa las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2. De acuerdo con los autores, la falta de una resistencia significativa a Cry2Ab2, la combinación de maíz MON 89034 con prácticas de gestión apropiadas sigue ofreciendo un control eficaz de *S. frugiperda* en Brasil.

En contraste con los mamíferos que poseen inmunidad adaptativa, las plantas dependen de su inmunidad innata basada en la inmunidad patrón desencadenada (PTI) y la inmunidad provocada por efector (ETI) para la defensa contra patógenos. De acuerdo con Balmant et al. (2015), las especies reactivas del oxígeno, conocidas por jugar un papel crucial en el PTI y ETI, pueden perturbar la homeostasis redox celular y conducir a cambios en las proteínas sensibles a redox a través de la modificación de los grupos sulfhidrilo de cisteína. Aunque la regulación redox es importante en distintos procesos biológicos, se sabe poco sobre las proteínas redox y cómo funcionan en el PTI y ETI. Dichos autores utilizaron tecnología proteómica para identificar las similitudes y diferencias de las modificaciones de la proteína redox en los genotipos susceptibles de resistencia en tomate y en respuesta a la infección por *Pseudomonas syringae*. Sus resultados en cuanto a los cambios redox los compararon y corrigieron con los cambios en el nivel de proteínas. Identificaron un total de 90 proteínas redox con funciones en hidratos de carbono y metabolismo de la energía, biosíntesis de cisteína, sacarosa y brasinoesteroides, biogénesis de la pared celular, biosíntesis del almidón, en el desarrollo de la cutícula, el metabolismo de lípidos, la proteólisis, ciclo del ácido tricarbóxico, proteína de direccionamiento a vacuola, y la oxidación-reducción.

Adicionalmente se tiene reporte de una proteína antifúngica que fue denominada ginkbilobina, la cual fue purificada y clonada a partir de las semillas de *Ginkgo biloba*. Los homólogos de esta proteína pueden ser detectados en todas las plantas de semillas y el helecho *Selaginella heterosporic*. Dichos homólogos se conservan con respecto a ciertos dominios, fracciones peptídicos y zonas de cisteína específicas. Se considera que ginkbilobina puede activar la muerte celular actina-dependiente (Gao et al., 2015).

Por otro lado, Santamaria, Arnaiz, Diaz-Mendoza, Martinez & Diaz (2015), analizaron el papel potencial de C1A, un pro-peptido que actúa como regulador de

las proteasas de cisteína con actividad contra artrópodos, coleópteros y ácaros. Comprobaron que las plantas de *Arabidopsis* transgénicas generaron y expresaron diferentes fragmentos de HvPap-1, un gen que contiene la secuencia de pro-péptido que posee actividad acaricida. Los autores establecieron que los pro-péptidos pueden controlar las plagas de ácaros y que dicha molécula podría ser aplicada como proteínas de defensa en los sistemas biotecnológicos.

Además de lo anteriormente descrito, se tienen actividades muy variadas que han sido reportadas desde un enfoque proteómico. En este sentido, se sabe que la prevención de la aparición y desarrollo de la inflamación es una estrategia terapéutica importante para el tratamiento de la lesión pulmonar aguda (ALI). Se ha demostrado que una gran cantidad de alimentos naturales y plantas tienen una potencial actividad anti-inflamatoria. La mangiferina, una xantona C-glucosil natural, se obtiene principalmente de las cáscaras y almendras de frutos de mango y de la corteza del árbol *Mangifera*. Se han desarrollado microesferas magnéticas modificadas con mangiferina-(MMS) sobre la base de la química modular para capturar las proteínas de mangiferina. Por espectrometría de masas y acoplamiento molecular, se identificó una proteína de 70 kDa de proteína con un choque térmico de 5 (Hspa5), y tirosina 3-monooxigenasa (ywhae) como proteínas de unión de mangiferina. Mediante un ensayo ELISA, la mangiferina indicó que ejerció un efecto anti-inflamatorio mediante la unión Hspa5 y ywhae para suprimir vías de señalización MAPK (J. Wang et al., 2015).

Por otro lado, se ha estudiado el mecanismo de enfriamiento en *Physcomitrella patens*, determinando proteínas que están activas. La proteína RSP se localiza en grano, junto con el fotosistema II (PSII), pero la proteína LHCSR se encuentra principalmente en las membranas del estroma expuesto junto con el fotosistema I (PSI), y su distribución no cambia tras el tratamiento con luz. Cuando se utiliza la proteína fluorescente como un patrón interno, ésta permite la evaluación independiente de PSI y PSII en cuanto al rendimiento de fluorescencia. De acuerdo con Pinnola et al. (2015), debido a la contribución de la LHCSR, *P. patens* tiene una concentración de PSI dos veces más grande con respecto al de las plantas superiores. Por lo tanto, LHCSR que es muy abundante en las membranas del estroma, puede ser empleado como blanco de enfriamiento por LHCSR.

La toxina fotoactivada, cercosporina, producida por especies de *Cercospora* tiene una toxicidad casi universal a las células debido a su producción de especies de oxígeno reactivo, incluyendo oxígeno singulete. Por esa razón, especies de *Cercospora*, que

son altamente resistentes a su propia toxina, son buenos candidatos para identificar genes para la resistencia a la misma y a las especies reactivas de oxígeno que produce. Se tiene el reporte de que el factor de transcripción de clúster zinc CRG1 (cercosporina gen de resistencia 1) es crucial para la resistencia por parte de las especies de *Cercospora* contra cercosporina (Beseli, Noar & Daub, 2015).

Adicionalmente se tienen reportes del estudio proteómico para una aplicación de calidad de algunos vegetales. Así, se tiene el reporte de *Phyllostachys vivax*, el cual es un bambú ornamental con hojas perennes. El tallo de esta planta puede exhibir un fondo de color amarillo dorado, marcado al azar con rayas verdes estrechas y amplias, pero a veces es de color verde claro con rayas amarillas. Xia et al. (2015), identificaron el mecanismo molecular que causa esta variación y encontraron que los niveles de expresión de EST, incluyendo PvESTs-F641 (JZ893845), PvESTs-F681 (JZ893885) y PvESTs-F798 (JZ894002), fueron significativamente mayores en las muestras verdes que en las muestras de color amarillo, mientras que PvESTs-R200 (JZ894906), PvESTs-R541 (JZ895247), PvESTs-R333 (JZ895039) y PvESTs-R266 (JZ894972) se encontraron en un nivel superior en las muestras de color amarillo. Los autores teorizan que las ESTs juegan un papel en la variación de color en las plantas, además la insuficiencia de proteína en la membrana fotosintética y lípidos en los tejidos de color amarillo podrían provocar la disfunción del cloroplasto y pueden dar lugar a la aparición de color amarillo en ciertas plantas.

Igualmente se tiene el reporte de los microARN (miRNA), los cuales representan una familia de pequeños ARN no codificantes que juegan un importante papel regulador en diversos procesos biológicos. Uno de estos procesos, es el de maduración de frutos en distintas plantas modelo. Sin embargo los miRNAs que se relacionan con el proceso de maduración de los frutos del plátano o también conocido como banano, siguen siendo desconocidos. Bi, Meng, Ma & Yi (2015), investigaron la prevalencia de miARN de frutos de banano en respuesta a etileno o al tratamiento con 1-MCP usando un enfoque en secuenciación y análisis bioinformático combinado con la validación mediante RT-PCR cuantitativo. Fueron identificados un total de 125 miRNAs conocidos y 26 nuevos miRNAs a partir de tres bibliotecas. Descartaron algunos genes como factores de transcripción y otras proteínas funcionales implicadas estrechamente en el desarrollo y la maduración en otras especies de plantas, pero reportaron un total de 82 miRNAs expresados diferencialmente, los cuales están estrechamente asociados con el proceso de maduración.

Un número limitado de hongos puede causar la enfermedad de marchitamiento en las plantas a través de la colonización del sistema vascular, el más conocido es *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*. Mediante secuenciación de todo el genoma y el uso de tamizajes proteómicos, de Sain & Rep (2015), identificaron algunas proteínas generalmente ricas en cisteína y enzimas que inducen necrosis. Aplicando experimentos de supresión de genes los autores proporcionan pruebas de que algunas de estas proteínas son necesarias para la patogenicidad, mientras que el papel de otras proteínas secretadas sigue siendo enigmática. Por otro lado, el sistema inmune de la planta puede reconocer algunas proteínas secretadas o sus acciones, lo que resulta en la resistencia a enfermedades.

Otro de los compuestos que son ampliamente conocidos por sus usos dentro de la industria, es el gopipol. Este compuesto corresponde a un polifenol que se produce en las plantas de algodón como defensa y protección contra plagas y patógenos. La biosíntesis de éste implica el acoplamiento oxidativo de hemigopipol y dos atropisómeros debido a la rotación impedida alrededor del enlace central binaftilo. Tal es su importancia económica, que Effenberger et al. (2015), identificaron los factores de producción de gopipol en la formación de algodón, para investigar su potencial para la síntesis de biarilo asimétrico. Dentro de su estudio, dichos autores encontraron una proteína dirigente de *Gossypium hirsutum* (GhDIR4) para conferir selectividad al acoplamiento de hemigopipol en presencia de la lacasa y O<sub>2</sub> como un agente oxidante. Finalmente con su estudio, lograron obtener el gopipol en más del 80% de exceso enantiomérico en comparación con gopipol racémico, en ausencia de la proteína GhDIR4. Con esto, la identificación de GhDIR4 puso de relieve el papel tan importante de las proteínas dentro del metabolismo secundario vegetal y eventualmente, como en este caso, la posibilidad de elevar la producción de un compuesto de interés para la industria.

## 10.5. Conclusión

Las proteínas y péptidos son motivo de estudio en diversas disciplinas dado que se ha demostrado que no únicamente presentan actividad estructural, sino que pueden presentar actividad biológica favorable para el ser humano o para la planta. Siendo los péptidos los más estudiados, ya que el propio fragmento puede presentar una actividad no relacionada con la proteína de origen.

La actividad biológica de estos compuestos es muy variada, desde antimicrobianos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, fungicida, hasta inmunomoduladores y anticancerígenos, así como otros usos en el área de la salud.

Actualmente, con las herramientas de la proteómica se han desarrollado estudios que permiten la caracterización de proteínas y péptidos expresados por el genoma, con lo cual se han identificado y clasificado respecto a su función. Asimismo, ha sido posible establecer las interacciones entre estos compuestos y así esclarecer las redes funcionales y su dinámica en los procesos fisiológicos y patológicos, lo cual permite en consecuencia, la identificación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades de humanos y plantas y su uso potencial como nuevos fármacos debido a su actividad biológica reportada.

La sinergia entre la genómica, bioinformática y la proteómica, ha aportado avances significativos a la ciencia médica, marcando un área importante de estudio para innovaciones futuras.

## Referencias

- Aryal, B., Laurent, C., & Geisler, M. (2015). Learning from each other: ABC transporter regulation by protein phosphorylation in plant and mammalian systems. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 966-974. <http://doi.org/10.1042/BST20150128>
- Balmant, K.M., Parker, J., Yoo, M.-J., Zhu, N., Dufresne, C., & Chen, S. (2015). Redox proteomics of tomato in response to *Pseudomonas syringae* infection. *Horticulture Research*, 2, 15043. <http://doi.org/10.1038/hortres.2015.43>
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L., & Macarulla, J.M. (2008). *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverté.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A. et al. (2015). Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. *PLoS One*, 10(10), e0140130-e0140130. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140130>

- Beseli, A., Noar, R., & Daub, M.E. (2015). Characterization of *Cercospora nicotianae* Hypothetical Proteins in Cercosporin Resistance. *PLoS One*, 10(10), e0140676-e0140676. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140676>
- Bi, F., Meng, X., Ma, C., & Yi, G. (2015). Identification of miRNAs involved in fruit ripening in Cavendish bananas by deep sequencing. *BMC Genomics*, 16, 776. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1995-1>
- Borges, F., & Martienssen, R.A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12), 727-741. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4085>
- Brasil, J.N., Cabral, L.M., Eloy, N.B., Primo, L.M. F., Barroso-Neto, I.L., Grangeiro, L.P.P. et al. (2015). AIP1 is a novel Agenet/Tudor domain protein from Arabidopsis that interacts with regulators of DNA replication, transcription and chromatin remodeling. *BMC Plant Biology*, 15, 270. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0641-z>
- Brown, T. (2008). *Genomas/Genome*. Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Calvo-Bruzos, S.C., Gómez-Candela, C., Royo-Bordonada, M.Á., & López-Nomdedeu, C. (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. Madrid, España: UNED.
- Cammue, B.P., De Bolle, M.F., Terras, F.R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B. et al. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2228-2233.
- Cao, X., Gong, J., Chen, M., Yu, S., Bian, Y., & Cao, Z. (2014). Analysis of rice leaves proteomes by liquid chromatography-tandem, mass spectrometry based on the purification using a novel affinity detergent removal spin column. *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui*, 32(11), 1181-1186. <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1123.2014.06035>
- Chen, W.-J., Zhao, Y., Peng, X.-J., Dong, Q., Jin, J., Zhou, W. et al. (2015). Significant Microsynteny with New Evolutionary Highlights Is Detected through Comparative Genomic Sequence Analysis of Maize CCCH IX

- Gene Subfamily. *International Journal of Genomics*, 2015, 824287. <http://doi.org/10.1155/2015/824287>
- Citterio, L., Franzyk, H., Palarasah, Y., Andersen, T.E., Mateiu, R.V., & Gram, L. (2016). Improved *in vitro* evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptidomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 167(2), 72-82. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.10.002>
- Colling, J., Tohge, T., De Clercq, R., Brunoud, G., Vernoux, T., Fernie, A.R. et al. (2015). Overexpression of the Arabidopsis thaliana signalling peptide TAXIMIN1 affects lateral organ development. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5337-5349. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv291>
- Contreras-Cornejo, H.A., Lopez-Bucio, J.S., Mendez-Bravo, A., Macias-Rodriguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A.A. et al. (2015). Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling Pathways Are Involved in Arabidopsis Root-System Architecture Alterations by Trichoderma atroviride. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 28(6), 701-710. <http://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0005-R>
- Couzigou, J.-M., Laressergues, D., Becard, G., & Combier, J.-P. (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biology*, 12(11), 1178-1180. <http://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094601>
- Daly, N.L., Rosengren, K.J., & Craik, D.J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(11), 918-930. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.003>
- Dang, L., & Van Damme, E.J.M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117, 51-64. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- Das, S., Mishra, B., Gill, K., Ashraf, M.S., Singh, A.K., Sinha, M. et al. (2011). Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 38-43. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.010>

- Datta, A., Ghosh, A., Airoidi, C., Sperandeo, P., Mroue, K.H., Jimenez-Barbero, J. et al. (2015). Antimicrobial Peptides: Insights into Membrane Permeabilization, Lipopolysaccharide Fragmentation and Application in Plant Disease Control. *Scientific Reports*, 5, 11951. <http://doi.org/10.1038/srep11951>
- Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., & Bartolome, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54. <http://doi.org/10.1021/jf0305231>
- de Sain, M., & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23970-23993. <http://doi.org/10.3390/ijms161023970>
- Dong, J.-J., Wu, F., Ye, X., Sun, C.-F., Tian, Y.-Y., Lu, M.-X. et al. (2015). Beta-defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides. *Gene*, 566(1), 23-31. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.025>
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67-82. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>
- Effenberger, I., Zhang, B., Li, L., Wang, Q., Liu, Y., Klaiber, I. et al. (2015). Dirigent Proteins from Cotton (*Gossypium* sp.) for the Atropselective Synthesis of Gossypol. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(49), 14660-14663. <http://doi.org/10.1002/anie.201507543>
- Ege, S. (2004). *Química orgánica: estructura y reactividad*. Reverté.
- Elhenawy, W., Scott, N.E., Tondo, M.L., Orellano, E.G., Foster, L.J., & Feldman, M.F. (2016). Protein O-linked glycosylation in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Glycobiology*, 26(3), 301-311. <http://doi.org/10.1093/glycob/cvv098>
- Faruck, M.O., Yusof, F., & Chowdhury, S. (2015). An overview of antifungal peptides derived from insect. *Peptides*. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.001>

- Fernandez de Caleyá, R., Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Applied Microbiology*, 23(5), 998-1000.
- Fricker, L.D., Lim, J., Pan, H., & Che, F.-Y. (2006). Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(2), 327-344. <http://doi.org/10.1002/mas.20079>
- Fukudome, S., Shimatsu, A., Suganuma, H., & Yoshikawa, M. (1995). Effect of gluten exorphins A5 and B5 on the postprandial plasma insulin level in conscious rats. *Life Sciences*, 57(7), 729-734. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00324-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(95)00324-Y)
- Gao, N., Wadhvani, P., Muhlhauser, P., Liu, Q., Riemann, M., Ulrich, A.S. et al. (2015). An antifungal protein from Ginkgo biloba binds actin and can trigger cell death. *Protoplasma*. <http://doi.org/10.1007/s00709-015-0876-4>
- Gauthier, S.F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123-131. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.010>
- Girish, K.S., Machiah, K.D., Ushanandini, S., Harish Kumar, K., Nagaraju, S., Govindappa, M. et al. (2006). Antimicrobial properties of a non-toxic glycoprotein (WSG) from *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Journal of Basic Microbiology*, 46(5), 365-374. <http://doi.org/10.1002/jobm.200510108>
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223-239. <http://doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Graszkiewicz, A., Żelazko, M., Trziszka, T., & Polanowski, A. (2007). Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4), 195-199.

- Guefrachi, I., Pierre, O., Timchenko, T., Alunni, B., Barriere, Q., Czernic, P. et al. (2015). Bradyrhizobium BclA Is a Peptide Transporter Required for Bacterial Differentiation in Symbiosis with Aeschynomene Legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 28(11), 1155-1166. <http://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0094-R>
- Haili, N., Planchard, N., Arnal, N., Quadrado, M., Vrielynck, N., Dahan, J. et al. (2016). The MTL1 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation and Splicing of the Mitochondrial NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7 mRNA in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 170(1), 354-366. <http://doi.org/10.1104/pp.15.01591>
- Hernández-Rodríguez, M., & Sastre-Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062-1071. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.005>
- Huang, X., Xie, W., & Gong, Z. (2000). Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from Ginkgo biloba. *FEBS Letters*, 478(1-2), 123-126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01834-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01834-2)
- Huang, Y., Busk, P.K., Herbst, F.-A., & Lange, L. (2015). Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9635-9649. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6805-9>
- Hummel, M., Dobrenel, T., Cordewener, J.J.H.G., Davanture, M., Meyer, C., Smeekens, S.J.C.M. et al. (2015). Proteomic LC-MS analysis of Arabidopsis cytosolic ribosomes: Identification of ribosomal protein paralogs and re-annotation of the ribosomal protein genes. *Journal of Proteomics*, 128, 436-449. <http://doi.org/10.1016/j.jpro.2015.07.004>
- Jennings, C., West, J., Waite, C., Craik, D., & Anderson, M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10614-10619. <http://doi.org/10.1073/pnas.191366898>

- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., & Suzuki, S. (2015). Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(4), 1015-1020. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.143>
- Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J., & Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997. <http://dx.doi.org/10.1021/jf001119u>
- Kitts, D.D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Koike, T., Beppu, H., Kuzuya, H., Maruta, K., Shimpo, K., Suzuki, M. et al. (1995). A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from «Kidachi Aloe» (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). *Journal of Biochemistry*, 118(6), 1205-1210.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612033454892>
- Kulikova, O.G., Maltsev, D.I., Ilyina, A.P., Burdina, A.V., Yamskova, V.P., & Yamskov, I.A. (2015). Biologically Active Peptides Isolated from Dill *Anethum graveolens* L. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 51(3), 348-353. <http://dx.doi.org/10.1134/s0003683815030114>
- Kwon, Y.S., Lee, D.Y., Rakwal, R., Baek, S.-B., Lee, J. H., Kwak, Y.-S. et al. (2016). Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 16(1), 122-135. <http://doi.org/10.1002/pmic.201500196>
- Li, X.C., Liao, Y.Y., Leung, D.W.M., Wang, H.Y., Chen, B.L., Peng, X.X. et al. (2015). Divergent biochemical and enzymatic properties of oxalate oxidase isoforms encoded by four similar genes in rice. *Phytochemistry*, 118, 216-223. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.019>

- Lu, S., & Edwards, M.C. (2016). Genome-Wide Analysis of Small Secreted Cysteine-Rich Proteins Identifies Candidate Effector Proteins Potentially Involved in *Fusarium graminearum*-Wheat Interactions. *Phytopathology*, 106(2), 166-176. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0215-R>
- Mandal, S.M., Dey, S., Mandal, M., Sarkar, S., Maria-Neto, S., & Franco, O.L. (2009). Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides*, 30(4), 633-637. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.001>
- Martínez-Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1-14.
- Martins, J.C., Maes, D., Loris, R., Pepermans, H.A., Wyns, L., Willem, R., & Verheyden, P. (1996). H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *Journal of Molecular Biology*, 258(2), 322-333. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0253>
- Meisel, H. (1998). Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 363-373. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00059-4](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00059-4)
- Meisel, H., & FitzGerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289-1295. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612033454847>
- Morozov, S.Y., Milyutina, I.A., Bobrova, V.K., Ryazantsev, D.Y., Erokhina, T.N., Zavriev, S. K. et al. (2015). Structural evolution of the 4/1 genes and proteins in non-vascular and lower vascular plants. *Biochimie*, 119, 125-136. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.019>
- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá-Martínez, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227. <http://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nacif-Marcial, L., Pereira, G.R., Abranches, M.V, Costa, N.C.S., Cardoso, S.A., Honda, E.R. et al. (2015). Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae).

*Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 99, 16-22. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.006>

Noiva, R. (2010). Glicoproteínas. Recuperado 1 de mayo de 2016, a partir de <http://www.chemistryexplained.com/Ge-Hy/Glycoprotein.html>

Ortega-Berlanga, B., Musiychuk, K., Shoji, Y., Chichester, J.A., Yusibov, V., Patiño-Rodríguez, O. et al. (2015). Engineering and expression of a RhoA peptide against respiratory syncytial virus infection in plants. *Planta*. <http://doi.org/10.1007/s00425-015-2416-z>

Panstruga, R., Baumgarten, K., & Bernhagen, J. (2015). Phylogeny and evolution of plant macrophage migration inhibitory factor/D-dopachrome tautomerase-like proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 64. <http://doi.org/10.1186/s12862-015-0337-x>

Pelegrini, P.B., & Franco, O.L. (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(11), 2239-2253. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.011>

Pelegrini, P.B., Murad, A.M., Silva, L.P., Dos Santos, R.C.P., Costa, F.T., Tagliari, P.D. et al. (2008). Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides*, 29(8), 1271-1279. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.013>

Pinnola, A., Cazzaniga, S., Alboresi, A., Nevo, R., Levin-Zaidman, S., Reich, Z. et al. (2015). Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, 27(11), 3213-3227. <http://doi.org/10.1105/tpc.15.00443>

Qiu, L., Lin, J.-S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T.L. et al. (2015). SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005623-e1005623. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005623>

Que, F., Wang, G.L., Huang, Y., Xu, Z.S., Wang, F., & Xiong, A.S. (2015). Genomic identification of group A bZIP transcription factors and their responses to

- abiotic stress in carrot. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(4), 13274-13288. <http://doi.org/10.4238/2015.October.26.24>
- Ren, J., Bretthauer, R.K., & Castellino, F.J. (1995). Purification and properties of a Golgi-derived (alpha 1,2)-mannosidase-I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21AE) with preferential activity toward mannose6-N-acetylglucosamine2. *Biochemistry*, 34(8), 2489-2495. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00008a012>
- Roberts, P.R., & Zaloga, G.P. (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons (Baltimore, Md.)*, 2(2), 237-243.
- Rogozhin, E.A., Slezina, M.P., Slavokhotova, A.A., Istomina, E.A., Korostyleva, T.V, Smirnov, A.N. et al. (2015). A novel antifungal peptide from leaves of the weed *Stellaria media* L. *Biochimie*, 116, 125-132. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.014>
- Salas, C.E., Badillo-Corona, J.A., Ramirez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *BioMed Research International*, 2015, 102129. <http://doi.org/10.1155/2015/102129>
- Santamaria, M.E., Arnaiz, A., Diaz-Mendoza, M., Martinez, M., & Diaz, I. (2015). Inhibitory properties of cysteine protease pro-peptides from barley confer resistance to spider mite feeding. *PloS One*, 10(6), e0128323-e0128323. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128323>
- Selitrennikoff, C.P. (2001). Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883-2894. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of Aoac International*, 91(4), 914-931. <http://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00642.x>
- Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Bio-Factors (Oxford, England)*, 21(1-4), 43-47. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.552210109>
- Tam, J.P., Lu, Y.A., Yang, J.L., & Chiu, K.W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot

- disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8913-8918. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.16.8913>
- Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A. et al. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573-588. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. del M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>
- Turowski, V.R., Akin, C., Maliandi, M.V, Buchensky, C., Leaden, L., Peralta, D.A. et al. (2015). Frataxin Is Localized to Both the Chloroplast and Mitochondrion and Is Involved in Chloroplast Fe-S Protein Function in Arabidopsis. *PloS One*, 10(10), e0141443-e0141443. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141443>
- Venereo-Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Virdi, A.S., Singh, S., & Singh, P. (2015). Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Frontiers in Plant Science*, 6, 809. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00809>
- Vittori, N., Martin, M., & Sabater, B. (2012). Proteomic identification of a basic peroxidase stabilized within acetylated polymannan polysaccharide of *Aloe barbadensis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(6), 1169-1172. <http://doi.org/10.1271/bbb.120025>
- Wang, H., & Ng, T.B. (2000). Ginkbilobin, a novel antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 407-411. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3929>
- Wang, J., Nie, Y., Li, Y., Hou, Y., Zhao, W., Deng, J. et al. (2015). Identification of target proteins of mangiferin in mice with acute lung injury using functionali-

- zed magnetic microspheres based on click chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 10013-10021. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04439>
- Warren, J.G., Kasun, G.W., Leonard, T., & Kirkpatrick, B.C. (2016). A phage display-selected peptide inhibitor of *Agrobacterium vitis* polygalacturonase. *Molecular Plant Pathology*, 17(4), 480-486. <http://doi.org/10.1111/mpp.12293>
- Witherup, K.M., Bogusky, M.J., Anderson, P.S., Ramjit, H., Ransom, R.W., Wood, T. et al. (1994). Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *Journal of Natural Products*, 57(12), 1619-1625. <http://dx.doi.org/10.1021/np50114a002>
- Witkowska, D., Bartys, A., & Gamian, A. (2008). [Defensins and cathelicidins as natural peptide antibiotics]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 62, 694-707.
- Wu, T.-M., Lin, K.-C., Liao, W.-S., Chao, Y.-Y., Yang, L.-H., Chen, S.-Y. et al. (2016). A set of GFP-based organelle marker lines combined with DsRed-based gateway vectors for subcellular localization study in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 90(1-2), 107-115. <http://doi.org/10.1007/s11103-015-0397-8>
- Xia, X., Gui, R., Yang, H., Fu, Y., Wei, F., & Zhou, M. (2015). Identification of genes involved in color variation of bamboo culms by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 97, 156-164. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.004>
- Xiao, X., He, H., Ding, X., Yang, Q., Liu, X., Liu, S. et al. (2015). Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from *Allium chinense*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 22(2), 238-244. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.004>
- Xu, J., Xing, S., Cui, H., Chen, X., & Wang, X. (2016). Genome-wide identification and characterization of the apple (*Malus domestica*) HECT ubiquitin-protein ligase family and expression analysis of their responsiveness to abiotic stresses. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 291(2), 635-646. <http://doi.org/10.1007/s00438-015-1129-0>

- Yan, J., Yuan, S.-S., Jiang, L.-L., Ye, X.-J., Ng, T. B., & Wu, Z.-J. (2015). Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4961-4981. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6654-6>
- Yuan, H.-B., Ding, Y.-X., Gu, S.-H., Sun, L., Zhu, X.-Q., Liu, H.-W. et al. (2015). Molecular Characterization and Expression Profiling of Odorant-Binding Proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS One*, 10(10), e0140562-e0140562. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140562>
- Zeng, L., Yin, Y., You, C., Pan, Q., Xu, D., Jin, T. et al. (2015). Evolution and protein interactions of AP2 proteins in Brassicaceae: evidence linking development and environmental responses. *Journal of Integrative Plant Biology*. <http://doi.org/10.1111/jipb.12439>

## CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

---

**María Eufemia Morales-Rubio,  
Claudia Espinosa-Leal, Ruth Amelia Garza-Padrón**

Laboratorio de Micropropagación, Departamento de Biología Celular y Genética, Cuerpo Académico Consolidado de Biología Celular y Genética Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

[maria.moralesrb@uanl.edu.mx](mailto:maria.moralesrb@uanl.edu.mx), [ruth.garzapd@uanl.edu.mx](mailto:ruth.garzapd@uanl.edu.mx),  
[claudiaespinosa17@gmail.com](mailto:claudiaespinosa17@gmail.com)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.315>

Morales-Rubio, M.E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R.A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 351-410.

## Resumen

La importancia de la micropropagación está basada en la necesidad de proteger y asegurar la subsistencia de las especies vegetales que están comprometidas, sea por la explotación de sus recursos o la búsqueda de metabolitos activos generados por ellas; tal es el caso de *Taxus spp*, *Catharanthus roseus*, *Lophophora williamsii*, entre otras. El cultivo de tejidos vegetales ofrece a partir de la totipotencialidad de las células de las plantas originar nuevos organismos en un medio de cultivo *in vitro* a través de fitohormonas y factores de crecimiento que disminuyen el tiempo de maduración del organismo, obteniéndolo en un lapso menor al de su ciclo de vida silvestre. Las aplicaciones biotecnológicas en el aislamiento de metabolitos secundarios obtenidos por esta vía incluyen: la modificación genética, el estrés con factores físicos y/o químicos como los fotoperiodos, el estrés salino y la diferenciación hacia callo, brotes, raíces.

## Palabras clave

Cultivo de tejidos vegetales, reguladores del crecimiento vegetal, actividad biológica.

## 11.1. Introducción

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos químicos que presentan roles vitales en su fisiología, ecología e interacciones con el medio ambiente. Muchos de los compuestos son producidos en respuesta a estrés tanto biótico, como abiótico que sufren las plantas y por lo tanto muchos de estos compuestos, también llamados metabolitos secundarios, presentan actividades biológicas relevantes (Pauwels, Inzé & Goossens, 2016).

Los metabolitos secundarios se producen típicamente a bajas concentraciones en tejidos específicos de las plantas a través de rutas biosintéticas complejas, resultando en una amplia variedad de estructuras con diferentes grados de complejidad (Oksman-Caldentey & Inze, 2004). Dada la escasa disponibilidad de muchos metabolitos se han desarrollado, cuando ha sido posible, análogos sintéticos para algunos compuestos usados como aditivos colorantes y saborizantes (Marienhagen & Bott, 2013). Sin embargo, la complejidad estructural de los metabolitos secundarios activos hace que su síntesis sea o imposible o económicamente poco viable. Esto contribuye a que la fuente principal de los metabolitos sean las plantas (Bart, 2011; Rout, Samantaray & Das, 2000).

La extracción de los metabolitos secundarios activos a partir de fuentes vegetales presenta varias limitantes, entre las que destacan (Bart, 2011; Ochoa-Villarreal et al., 2015; Rout et al., 2000):

- Grado de crecimiento lento de la planta.
- Baja concentración de las moléculas activas en el material vegetal.
- La mayoría de las plantas no han sido domesticadas, por lo que se deben de coleccionar de fuentes silvestres.
- Sobreexplotación de las plantas silvestres y plantas en peligro de extinción.

Por lo tanto, es necesario buscar alternativas de producción de los metabolitos secundarios que sean a la vez altamente productivos y sustentables como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Dagla, 2012).

La Técnica de cultivo de tejidos vegetal permite cultivar células, tejidos y órganos vegetales en medios sintéticos bajo condiciones asépticas y controladas de luz, temperatura y humedad. La habilidad de crecer células y tejidos vegetales y controlar su desarrollo forma las bases de muchas aplicaciones prácticas para la agri-

cultura, la horticultura y la industria química, al eliminar enfermedades, mejorar plantas y producir metabolitos secundarios, además de ser un prerrequisito de la ingeniería genética vegetal (Dagla, 2012; Hussain, Qarshi, Nazir & Ullah, 2012).

El cultivo *in vitro* asegura que se tenga una buena disposición de plantas medicinales usando cantidades mínimas de espacio y tiempo (Prakash & Van Staden, 2007). Con ella se pueden realizar diferentes tipos de cultivos de tejidos y órganos de plantas como: cultivo de células, cultivo de brotes y cultivo de raíces. El cultivo de células vegetales es una alternativa atractiva al cultivo de la planta completa como fuente de metabolitos secundarios de alto valor. Las células vegetales son biosintéticamente totipotenciales, lo que significa que cada célula en cultivo retiene la información genética completa y es por lo tanto capaz de producir todo el rango de compuestos químicos producidos por la planta madre. Las ventajas de esta tecnología por sobre la agricultura convencional son como sigue (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002):

- Es independiente de variaciones estacionales y geográficas así como de los factores ambientales.
- Ofrece un sistema definido de producción, lo que asegura un suministro continuo de los productos, así como una calidad y rendimiento uniforme.
- Es posible producir nuevos compuestos que no se encuentran normalmente en la planta madre.
- Es independiente de interferencias políticas.
- Producción rápida.

Por estas razones el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa viable para la producción sustentable de metabolitos secundarios útiles para los seres humanos. El objetivo de este trabajo es hacer una breve descripción de algunas técnicas de cultivo de tejidos, dar varios ejemplos de su uso y presentar algunas perspectivas futuras para su aplicación en productos naturales.

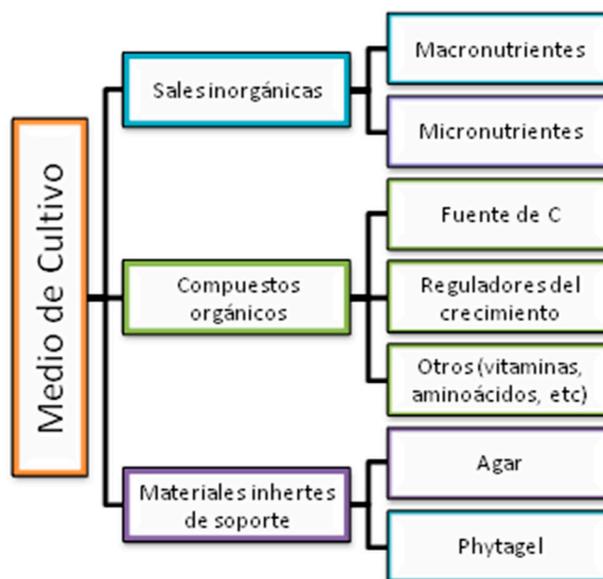
## 11.2. Generalidades del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se inicia a partir de explantes aislados de cualquier tejido vegetal, aunque tradicionalmente se emplean embriones, raíces y brotes (Ochoa-Villarreal et al., 2015). La técnica depende de concepto de totipotencialidad de las células vegetales, la cual se refiere a la habilidad de una sola célula

de expresar el genoma completo por medio de la división celular. También de importancia para la técnica es la capacidad de las células para alterar su metabolismo, crecimiento y desarrollo para poder regenerar una planta completa a partir de cualquier segmento de la misma (Hussain et al., 2012; Thorpe, 2007).

Los medios de cultivo vegetales contienen todos los nutrientes requeridos para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Estos están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento, fuente de carbono y algunos agentes solidificantes, en el caso de los medios de cultivo sólidos, como se muestra en el Esquema 1. El medio Murashige y Skoog (1962) (MS 1962) es el medio más extensamente usado para la propagación vegetativa *in vitro* de muchas especies de plantas, mientras que el medio B<sub>5</sub> (Gamborg, Miller & Ojima, 1968) es empleado para el crecimiento de células desdiferenciadas de plantas (callo), por lo que se utiliza en los cultivos de suspensión celular y la producción de protoplastos (Dagla, 2012).

El pH del medio de cultivo es muy importante, ya que éste afecta tanto al crecimiento de las plantas como a la actividad de los reguladores del crecimiento, este



Esquema 1. Componentes del medio de cultivo

se debe de ajustar a valores entre 5.4 y 5.8. Para el cultivo del material vegetal se pueden emplear tanto medios líquidos como sólidos. Los componentes del medio de cultivo que tienen un mayor efecto en la respuesta inicial del material vegetal son la fuente de nitrógeno y los reguladores del crecimiento (Hussain et al., 2012).

Los reguladores del crecimiento (fitohormonas) desempeñan un papel esencial en la determinación de las rutas de desarrollo de las células vegetales durante el cultivo *in vitro*. Generalmente los reguladores más ampliamente empleados son auxinas, citocininas y giberelinas. El tipo y concentración de fitohormonas a utilizar depende de la especie con la que se esté trabajando, el tejido u órgano a cultivar y los objetivos del experimento. Altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas promueven la regeneración de brotes. Un balance de auxina y citocinina lleva al desarrollo de una masa desdiferenciada de células llamada callo (Hussain et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente el cultivo *in vitro* debe de realizarse en condiciones asépticas. Por lo tanto el medio de cultivo debe de ser esterilizado, generalmente por medio de calor húmedo en autoclave, aunque también puede ser filtrado. Así mismo la parte de la planta a utilizar, el explante, debe de ser sometido a una desinfección superficial mediante el uso de diferentes soluciones desinfectantes como de hipoclorito de sodio, etanol, plata coloidal, detergentes no iónicos, fungicidas, etc. Finalmente la siembra (colocación del explante en el medio de cultivo) se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, usualmente utilizando una campana de flujo laminar.

Dos de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* más utilizadas son organogénesis y callogénesis. La organogénesis se refiere a la producción de órganos de las plantas (raíz, brote, hojas) ya sea directamente de los meristemos, o indirectamente de masas de células desdiferenciadas (callos), tanto para la propagación masiva de las plantas a estudiar como para el crecimiento de órganos particulares de interés (Hussain et al., 2012). La callogénesis por otra parte se produce cuando el explante, en medio con concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento, prolifera a células desdiferenciadas de callo. Las células del callo se consideran como totipotenciales debido a su habilidad para regenerar una planta completa (Ochoa-Villarreal et al., 2015).

### 11.3. Aplicación del cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos de importancia biotecnológica

Diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sido empleadas para la producción industrial de productos naturales de alto valor. En la década de 1960 la compañía Pfizer realizó grandes esfuerzos para lograr el cultivo de células vegetales en medio líquido (cultivo en suspensión), una alternativa similar al cultivo de microorganismos en lugar de la planta completa. En esta técnica el callo (friable) puede ser transferido a un medio líquido el cual es subsecuentemente incubado bajo condiciones controladas de aeración, agitación, luz, temperatura y otros parámetros físicos para producir los metabolitos secundarios deseados (Chattopadhyay, Farkya, Srivastava & Bisaria, 2002; Dagla, 2012).

Los cultivos en suspensión no solo tienen rendimientos de fitoquímicos estándar más altos, sino que también eliminan la presencia de compuestos de interferencia que ocurren en las plantas silvestres. La ventaja de este tipo de método es que se logra una producción continua de metabolitos secundarios bajo ambientes controlados. Las condiciones ambientales del cultivo como: luz, temperatura, pH del medio de cultivo y aeración pueden ser modificadas para revisar su efecto en la acumulación de los productos naturales (Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002).

La manipulación del ambiente de cultivo debe de ser efectiva en el incremento de la acumulación del metabolito de interés. La expresión de muchas rutas de metabolitos secundarios puede ser alterada por factores externos como niveles de nutrientes, factores de estrés y reguladores del crecimiento, los cuales son fáciles de manipular al hacer cambios en la composición del medio de cultivo. Entre los nutrientes que pueden ser manipuladas están: niveles de azúcar, nitratos, fosfato, reguladores del crecimiento y adición de precursores (Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002).

La adición de precursores ha sido una estrategia popular para el incremento de la producción de metabolitos secundarios en cultivo de tejidos vegetales. El concepto se basa en la idea de que cualquier compuesto, que es un intermediario, durante o al comienzo de la ruta metabólica tiene buenas posibilidades de aumentar el rendimiento final del producto. La suplementación de precursores o compuestos intermediarios al medio de cultivo ha sido efectivo para aumentar la

producción de los metabolitos secundarios en muchos casos (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

Muchas plantas producen metabolitos secundarios en la naturaleza como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos, por lo cual la producción de estos se puede ver reprimida en ausencia de una infección. Se ha encontrado que las plantas pueden producir las mismas respuestas que tienen contra los patógenos cuando se ponen en contacto con compuestos de origen patogénico conocidos como elicitores, los cuales son señales que promueven la formación de metabolitos secundarios, la mayoría de estos son de origen fúngico o bacteriano, o constituyen activadores inmunológicos como el metil-jasmonato (Pauwels et al., 2016).

Por otra parte un gran avance en el uso del cultivo de tejidos vegetales para la obtención de metabolitos secundarios es el aislamiento de células meristemáticas del cambium vascular. Estas células son responsables de la producción del floema y xilema primario, además de ser innatamente desdiferenciadas, funcionando por lo tanto como células madre de la planta. Se ha mostrado que este tipo de células funciona para la producción de estos metabolitos llegando incluso a presentar mayor crecimiento y rendimiento que el cultivo de callos (Ochoa-Villarreal et al., 2015).

A sí mismo el cultivo de órganos, en especial de raíz, pueden presentar una contribución significativa a la producción de metabolitos secundarios, principalmente aquellos producidos en este órgano. Entre las ventajas encontradas en el cultivo de raíz están: rápido crecimiento sin necesitar la suplementación externa de auxinas, muchas veces no requieren incubación bajo luz, los rendimientos de producción de metabolitos son bastante estables gracias a su estabilidad genética. Existen varios factores que pueden ser modificados para incrementar la producción de metabolitos secundarios, al igual que con los cultivos de células en suspensión, como los nutrientes en el medio de cultivo y elicitores (Hussain et al., 2012; Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2002).

#### **11.4. Cultivo de tejidos vegetales en el Laboratorio de Micropropagación**

Los metabolitos secundarios de plantas son una importante fuente de compuestos activos utilizados en la industria, agricultura y medicina. El cultivo de tejidos

vegetales surge como una alternativa para su producción independiente de las condiciones climáticas, políticas o socioeconómicas de la región de producción, además de proveer una fuente de metabolitos secundarios robusta, eficiente y sustentable.

Posiblemente, la formulación del medio de cultivo de tejidos es más un arte que una disciplina por derecho propio, la experiencia es el mejor maestro en este tipo de trabajo y este es el mejor consejo u orientación que se le puede dar a un principiante.

En el presente capítulo se hace una breve reseña de las especies de plantas que se han cultivado *in vitro* y cuya importancia radica por su valor ornamental, ecológico y/o medicinal.

Algunas de las investigaciones han permitido comparar la presencia de metabolitos secundarios de plantas *in vivo* como *in vitro*; así como la evaluación de su actividad biológica; a continuación se enlista en primera instancia, las diferentes familias de plantas que han sido cultivadas *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación y aquellas en que se ha evaluado actividad biológica y tamizaje fitoquímico.

## 11.5. Establecimiento del cultivo *in vitro*, tamizaje fitoquímico y actividad biológica de diversas familias

### 11.5.1. *Boraginaceae*

**Especie:** *Cordia boissieri* (De Candolle)

**Nombre común:** Anacahuita

**Descripción:** Árbol pequeño que puede alcanzar alturas alrededor de los 5 m, sus hojas son ovaladas con abundantes tricomas, el fruto posee una piel carnosa, un hueso y de 1 a 2 semillas viables, al estar maduro muestra un color blanco amarilloso hasta alcanzar un tono púrpura (Figura 1).

**Distribución:** es nativa de los estados de Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, y también se encuentra en la parte sur de Texas.



*Figura 1. Cordia boissieri*

**Cultivo *in vitro*:** Como explante se utilizaron semillas de frutos maduros, para la obtención de los embriones las semillas fueron sometidos a diversos métodos de escarificación, siendo el más adecuado el mecánico, los embriones se colocaron en medio de cultivo MS (1962) sin reguladores del crecimiento, bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de 22+/- 2°C. Transcurridos dos meses, se obtuvieron plántulas bien desarrolladas (Figura 2).



*Figura 2. Plántula in vitro*

### 11.5.2. *Cactaceae*

**Especie:** *Ariocarpus trigonus* (Schumann in Engle)

**Nombre común:** Chaute o chaulte

**Descripción:** *Ariocarpus trigonus*, se desarrolla en lomas calizas pedregosas, en matorrales rosetófilos, como los encontrados en Doctor Arroyo y Salinas Victoria, Nuevo León y en el Valle de Jaumave, Tamaulipas. Son plantas que sobresalen poco de la superficie del suelo, emergiendo solamente los tubérculos, Figura 3. Tallo de hasta unos 25 cm de altura y 30 cm de diámetro, de color verde amarillento con el ápice muy lanoso. Tubérculos largamente triangular prismáticos, agudos, erectos, de 3 a 8 cm de longitud y 1 a 2.5 cm de anchura, aplanados y lisos adaxialmente, no fisurados, rectos, o muy encorvados hacia adentro, divergentes. Aréolas espiníferas ausentes. Fruto de 7 a 20 mm de longitud y 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino o verdoso; semillas pequeñas, con testa tuberculada y negra; hilo grande, basal (Bravo & Sánchez, 1991).

A causa de su limitada distribución, la explotación indiscriminada, su lento crecimiento, la expansión agrícola y de carreteras así como el crecimiento urbano; *A. trigonus* ha sido declarada según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2010), en la categoría de especies amenazadas, lo que significa que podría llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o



Figura 3. Planta de *A. trigonus*

mediano plazo, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir el tamaño de sus poblaciones.

**Distribución:** La distribución geográfica de *A. trigonus* (Weber) K. Shumann, se restringe a una porción en el norte de México, en los estados de Tamaulipas, Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León y en el sur de Estados Unidos de América en el estado de Texas.

**Cultivo *in vitro*:** Para el cultivo *in vitro* de esta especie se empleó, como explante semillas, y como medio de cultivo, el MS, adicionado con vitaminas, fuente de carbono y gelificante. Las semillas fueron escarificadas en ácido sulfúrico al 50%, con tiempos de exposición de: 15 min (T1), 20 min (T2) y 25 min (T3), luego fueron desinfectadas mediante el siguiente procedimiento: alcohol etílico absoluto por 1 min, seguido de una inmersión en cloro comercial al 20% por 20 min y luego ser lavadas en agua estéril, se sembraron en medio MS (1962), empleando dos tratamientos M1 (MS adicionado con BAP 2 mg/L y K 1mg/L) y M2 (MS sin reguladores), bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de 22+/- 2°C. Las plántulas de *A. trigonus* emergieron rompiendo la testa de las semillas solo en el medio adicionado con reguladores de crecimiento se observó un porcentaje menor de germinación que en el medio sin reguladores. Las plántulas adquirieron una forma alargada o redonda de color verde muy claro, algunas se transformaron a callos (Figura 4). Mientras que otras empezaron a tomar la forma típica



Figura 4. Desarrollo de callo de *A. trigonus*

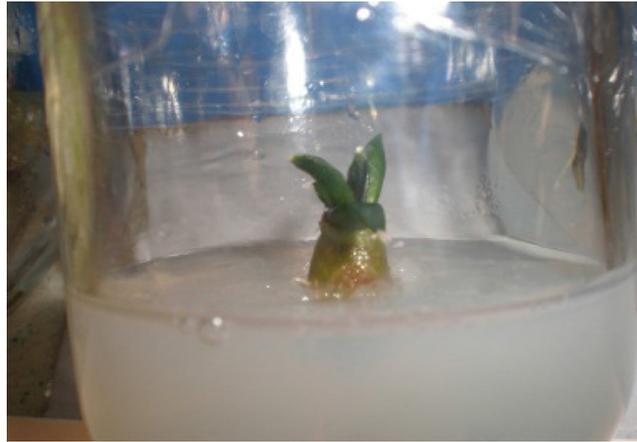


Figura 5. Plántula de *A. trigonum*

de la planta, formaron tubérculos en la parte superior, (Figura 5). Los cambios morfogénéticos observados fueron similares para los tres tratamientos empleados, independientemente del empleo o no empleo de reguladores en el medio (Martínez Iturralde, 2009).

**Especie:** *Astrophytum ornatum* (DC.) Britton & Rose

**Nombre común:** Liendrilla

**Descripción:** Es una planta toneliforme de hasta 160 cm de altura y 30 cm de diámetro. Su tallo es de color verde grisáceo provisto de estigmas, constituidos por tricomas blancos, principalmente en los individuos jóvenes; presentan de 5 a 8 costillas agudas y espiraladas, presentan de una a dos espinas centrales y de 6 a 10 radiales, (Figura 6) (Jiménez-Sierra, Rocha-Huerta & Mendoza-Moreno, 1991).

**Distribución:** San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Guzmán, Arias & Dávila, 2003).

**Cultivo *in vitro*:** A partir de plántulas germinadas *in vitro* de 1 a 2 cm de longitud (5 meses de edad) se obtuvieron los explantes, los cuales fueron sembrados

2 por frasco con medio MS al 100% adicionado con  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de K, pH de 5.7, agar 8 g/L y sacarosa 30 g/L (medio de inducción), bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Logrando la proliferación masiva de brotes (Figura 7) (Crisóstomo, 2009).



*Figura 6. Planta de A. ornatum*



*Figura 7. Planta regenerada A. ornatum*

**Especie:** *Coryphantha odorata* (Boedeker)

**Nombre común:** Biznaga partida olorosa (SEMARNAT, 2010)

**Descripción:** Son plantas que forman agregados irregulares, los tallos pueden ser globosos o cortos y cilíndricos, de un color verde oscuro, de aproximadamente 3 cm de diámetro. Los tubérculos tienen los extremos romos, cilíndricos y suaves. Las espinas centrales son de 1 a 6, fuertes, algunas con el extremo en gancho, color amarillo, rojizo o café. Las espinas radiales de 7 a 9, de color blanco. Flores blancas, cremas o amarillentas. Frutos cilíndricos de color verde oscuro o marrón (Figura 8) (Anderson, Barthlott & Brown, 2001).

**Distribución:** Es endémica de México, habita los estados de San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas. (Anderson et al., 2001).

**Cultivo *in vitro*:** Se realizó el establecimiento del cultivo *in vitro*, empleando como explantes, semillas obtenidas de frutos frescos, las semillas se sometieron a un proceso de desinfección, a base de una inmersión rápida en alcohol etílico al 100% durante 10 s, seguido de un lavado en solución de cloro comercial al 20% con unas gotas de Tween 20 durante 15 min, para finalizar con un lavado con



Figura 8. Planta de *C. odorata*



Figura 9. Plántulas germinadas *in vitro*

agua bidestilada estéril. Se empleó medio Murashige y Skoog (1962), sin reguladores y los cultivos bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de 22+/- 2°C teniendo un 95% de germinación, obteniendo plántulas bien desarrolladas y con raíces ramificadas (Figura 9). El tamizaje fitoquímico de los extractos de plantas *in vitro* muestran la presencia de insaturaciones, grupos carbonilo, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonoides y alcaloides (Pérez Gutiérrez, 2012).

**Especie:** *Ferocactus herrerae* (J.G Ortega)

**Nombre común:** Cactus de barril, Lengua del demonio, Ferocacto, Teocomite

**Descripción:** Es una planta que inicia su crecimiento de forma globular, de color verde, con 7 espinas centrales y al menos 1 plana y más larga, las radiales con aspecto de cerdas, en estado adulto normalmente tienen alrededor de 13 costillas. Al desarrollarse adquiere la forma típica de barril y produce abundantes flores de color amarillo entre primavera y verano, formando frutos carnosos verde y amarillos (Figura 10). Este cactus crece en forma globular hasta un tamaño máximo, en estado adulto mide hasta 50 cm de diámetro y 2 m de alto.

**Distribución:** Es una cactácea endémica de México (Sonora y Sinaloa).

**Cultivo *in vitro*:** Para su propagación se emplearon semillas de esta especie, las cuales se sometieron a un proceso de desinfección consistente en un lavado en agua corriente, inmersión en cloro comercial 15% por 15 min, y lavado en agua estéril, fueron sembradas en medio MS (1962) bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de 22+/- 2°C, obteniendo germinación y teniendo un desarrollo de plántulas vigorosas, con raíz bien desarrollada, y una posterior diferenciación a callo (Figura 11).

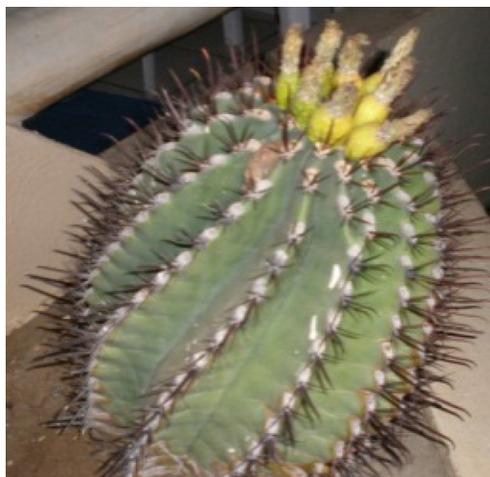


Figura 10. Fructificación de *Ferocactus herrerae*



Figura 11. Plántula con diferenciación a callo *F. herrerae*

**Especie:** *Hylocereus undatus* Haworth (Britton y Rose)

**Nombre común:** Pitahaya (Jalisco, Yucatán), pitahaya orejona» (Oaxaca), tasajo (Durango), junco tapatío, chacán y zacamb (Yucatán) reina de la noche (Sinaloa) Chak-wob (Yucatán)

**Descripción:** Morfológicamente la planta presenta tallos largos segmentados y ramificados, su color es verde intenso, desarrollando numerosas raíces aéreas con las que se fijan a los muros y árboles por los que trepan. Alcanzan una altura de hasta 5 metros y un diámetro de hasta 6 cm. Cada segmento puede tener una longitud de 50 cm; está conformado por tres costillas muy pronunciadas (Figura 12). Presenta aréolas con espinas en número de 1 a 3 cortas y gruesas. Con flores grandes, hasta 30 cm. de longitud de color blanco en el interior y amarillo verdosas en el exterior con tintes purpúreos. Florecen desde agosto hasta septiembre, y crecen en suelo compuesto, añadido de un 25% de mantillo



Figura 12. Planta de *Hylocereus undatus*

de hojas o turba enriquecida. Su fruto es oblongo, de 10 a 12 cm. de diámetro, rojo purpúreo, con grandes escamas foliáceas más o menos caducas al madurar, es comestible y tiene pulpa blanca. Semillas pequeñas y negras (Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Distribución:** El origen de *Hylocereus* spp. son los bosques tropicales y subtropicales de México y Centro y Sudamérica (incluyendo el sur de México, el lado del Pacífico de Guatemala, Costa Rica, El Salvador, Venezuela, Colombia, Ecuador, Curaçao, Nicaragua, Panamá, Brasil y Uruguay). Desde su centro de origen la pitahaya se ha dispersado hacia América tropical y subtropical, Asia, Australia y el Medio Oriente, siendo *H. undatus* la especie más cosmopolita (Gunasena, H P Pushpakumara, D K Kariyawasam, 2007).

**Cultivo *in vitro*:** Se germinaron semillas de *H. undatus*, en medio Murashige y Skoog 1962, empleando 10% de sacarosa como fuente de carbono, las semillas fueron obtenidas de frutos maduros y para su desinfección se lavaron en agua corriente, luego se pasaron a una inmersión rápida en alcohol étílico absoluto (10 s), después a una solución Hipoclorito de sodio comercial a 15% v/v, con Tween 20 por 15 min y posteriormente fueron enjuagadas con agua estéril dentro de la campana de flujo laminar. Las semillas se colocaron en frascos de 250 mL con medio y se mantuvieron las condiciones de luz y temperatura constantes. (12h luz y 22°C+/-2°C). Se logró un 80% de germinación, desarrollándose plantas completas, con raíz y brote bien proporcionado morfogénicamente (Figura 13).



Figura 13. Plántulas *in vitro* de *H. undatus*

**Especie:** *Mammillaria beyderi* (Fr. Muehlenpfordt)

**Nombre común:** Biznaga chilitos

**Descripción:** Tallo simple hemisférico o subgloboso, que mide entre 8 a 30 cm de diámetro y de 3 a 10 cm de altura. Sus tubérculos están dispuestos en 13 y 21 series de espinas. Las plantas de esta especie son redondeadas en el ápice y generalmente tienen las axilas desnudas, sus areolas son redondeadas con espinas radiales de 7 a 22 o 24, delgadas aciculares de menos de 0.5 mm de diámetro (Figura 14).

En cuanto a las flores, estas son acampanuladas de 25 a 35 mm de longitud de color crema casi blanco, crema rosado pálido o crema verdoso pálido (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991).

**Distribución:** Limitada ya que sólo se encuentra en Estados Unidos (Texas y Arizona) y en México (Sonora, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí) (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991).

**Cultivo *in vitro*:** Se utilizaron semillas de *M. beyderi* que fueron sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento, lo



Figura 14. Planta de *M. beyderi*



Figura 15. Plántula *M. heyderi* cultivada *in vitro*

que permitió que se obtuviera una capacidad de germinación del 100% de las semillas, obteniéndose plántulas globosas de un color verde, cuya parte posterior se alarga, y desarrollan una raíz larga y única (Figura 15) (Aceves-Agüero, 2013).

**Especie:** *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem) K. Shum

**Nombre común:** Pezuña de venado, Pata de venado

**Descripción:** Es una planta simple. Tallo ancho napiforme, casi enterrado, con la porción aérea apenas emergiendo de la superficie del suelo, de unos 7 cm de diámetro; porción subterránea anchamente napiforme, casi globosa, gruesa y carnosa, con algunas raíces gruesas y fibrosas. Tubérculos dispuestos en 5 y 8 series espiraladas, aquillados dorsalmente, con la superficie ventral aplanada y rugosa, triangulares, agudos, relativamente pequeños para el género, casi tan largos como anchos, de 5 a 13 mm de longitud y 3 a 10 mm de anchura, llevando el surco longitudinal medio desde la punta hasta la base del tubérculo, lanoso; superficie de color verde grisáceo (Figura 16). Aréolas floríferas situadas en el surco areolar en la base de los tubérculos, provistas de abundantes tricomas largos y sedosos. Flores brotando de las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes en el ápice del



Figura 16. Planta de *A. kotschoubeyanus*

tallo, de 2.5 a 3 cm de longitud; pericarpelo y receptáculo desnudos; segmentos exteriores del perianto escasos, obtusos, verdosos con tinte castaño; segmentos interiores del perianto oblanceolados, obtusos o apiculados, a veces algo retusos, de cerca de 2 cm de longitud, de color rosa claro hasta carmín, con la franja media más oscura; filamentos blancos; anteras pequeñas, amarillas; granos de polen entre 60 y 65  $\mu$  de diámetro; estilo blanco; lóbulos del estigma 4 a 6, blancos. Fruto claviforme, de 5 a 18 mm de longitud y 1 a 3 mm de diámetro, rojizo hasta rosado. Semillas de 1 mm de longitud, ovoides, negras y tuberculadas (Bravo & Sánchez, 1991).

**Distribución:** Se encuentra en los estados de Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León y Tamaulipas, creciendo en planicies y colinas bajas, ya sea en suelos calcáreos y pedregosos o arcillosos. (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991), la han encontrado en una planicie aluvial situada cerca de entronque El Huizache, San Luis Potosí, en Querétaro y en San Hipólito, a 29 km de W de Saltillo, Coahuila, creciendo juntamente con *Epithelantha micromeris* var. *greggii*, *Coryphantha poselgariana*, *Mammillaria roseoalba*, *Opuntia moelleri*, *Astrophytum capricorne*, *Leuchtenbergia principis*, etcétera.

**Tamizaje fitoquímico:** Los extractos metanólicos de *A. kotschoubeyanus* presentan: insaturaciones, grupo carbonilo, oxhidrilos fenólicos, esteroides y triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, flavonoides y alcaloides (Rodríguez-Garza, 2010; Treviño-Neávez, 2009).

**Actividad biológica:**

- Actividad bactericida fue relevante sobre bacterias de importancia medica: *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri*.
- La actividad antifúngica sobre hongos dermatofitos de importancia médica *Microsporium gypseum*, *M. nanum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. cookei*, no fue relevante.
- Toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* con una  $DL_{50} = 1863.3 \mu\text{g/mL}$ .
- Actividad sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS con una  $CI_{50}$  de  $2.6 \mu\text{g/mL}$ .
- La actividad antirradical al reducir el radical DPPH con una  $CE_{50} = 335.4 \mu\text{g/mL}$  (Rodríguez-Garza, 2010; Treviño et al., 2012; Treviño-Neávez, 2009).

**Especie:** *Ariocarpus retusus* Sheidlweiler

**Nombre común:** Chaute, Peyote cimarrón

**Descripción:** Plantas de 12 cm de altura y 10 a 25 cm de diámetro, de color verde azulado o grisáceo tallos muy enterrados y globosos. Tubérculos triangulares, atenuados hacia el ápice, a veces con éste prolongado en forma de un mucrón angostamente cónico, superficie convexa o casi plana, algo indurada y más o menos arrugada, no fisurados, de 1.5 a 4 cm de longitud y 1 a 3.5 cm de anchura, casi tan largos como anchos (Figura 17). Aréolas espiníferas en la punta de los tubérculos o casi así, muy pequeñas, circulares, como de 1 a 5 mm de diámetro, con algo de lana y a veces con algunas espinas diminutas; aréolas floríferas cerca de la axila de los tubérculos y lanosas. Flores en las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes del ápice de la planta, de 4 a 5 cm de diámetro, y hasta 4.5 cm de longitud; segmentos exteriores del perianto blanquecinos, ocasionalmente con la línea media rojiza, de 1.2 a 2 cm de longitud y 5 a 8 mm de anchura, segmentos interiores del perianto lanceolados, acuminados, como de 2 cm de longitud y 5 a 9 mm de anchura; estambres numerosos; filamentos blanquecinos; anteras de color amarillo oro; granos de polen entre 80 y 85 micras; estilo blanco; lóbulos



Figura 17. Planta de *A. retusus*

del estigma 7 ó más. Fruto ovoide, de 10 a 25 mm de longitud, blanco verdoso hasta rosado pálido, liso ampliamente umbilicado, conserva los restos secos del perianto (Bravo & Sánchez, 1991).

**Distribución:** Se encuentra en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí. Ha sido colectada cerca de Saltillo, Coahuila, Monterrey; Nuevo León; Hacienda de Cedros, Zacatecas; Valle de Jaumave, Tamaulipas; Matehuala y San Luis Potosí. Crece en colinas calizas y pedregosas, rara vez yesosas, en matorrales rosetófilos donde son comunes: *Agave stricta*, *Yucca carnerosana*, *Dasyllirion sp.* (Bravo & Sánchez, 1991).

**Tamizaje fitoquímico:** Extractos metanólicos de *A. retusus* presenta: insaturaciones, grupo carbonilo, oxhidrilos fenólicos, esteroides y triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, flavonoides y alcaloides (Rodríguez Garza, 2010).

**Actividad biológica:**

- Actividad antifúngica del tallo sobre las cepas de hongos dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *M. nanum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. cookei*) a 125 mg/mL.

- La actividad amebicida del tallo sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS con una  $CI_{50}$  de 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
  - Actividad antirradical con DPPH no fue relevante.
  - Actividad bactericida de tallo y raíz de *A. retusus* mostraron actividad contra *B. subtilis* y *B. cereus*, no así para *Salmonella typhi* (Rodríguez Garza, 2010).
- 

**Especie:** *Astrophytum capricorne* (a Dietrich) Britton y Rose

**Nombre común:** Cuerno de cabra

**Descripción:** Tallo subgloboso o cortamente cilíndrico, hasta de 25 cm de altura y cerca de 10 cm de diámetro, al principio globoso, después ovoide hasta alargado. Costillas 7 u 8, altas y agudas, con la superficie provista de estigmas blancos, más o menos numerosos. Aréolas grandes, distantes entre sí 2 a 3 cm, con fieltro castaño. Espinas desde alrededor de 6 hasta cerca de 20, algunas gruesas, más o menos aplanadas, suaves, torcidas o recurvadas, de color rojizo, negruzco o ceniciento, largas, de 3 a 10 cm de longitud. Flores de 6 a 7 cm de longitud, que abren ampliamente; segmentos exteriores del perianto rojizos, con el ápice mucronado; segmentos interiores del perianto de color amarillo con la base anaranjado rojiza, espatulados, con el ápice agudo o acuminado, con el margen entero o más o menos dentado; estambres numerosos; estilo delgado, de color crema; lóbulos del estigma 5 a 9, lineares, de color crema (Figura 18). Fruto pequeño, con escamas pungentes y axilas lanosas. Semillas de 2.5 mm de espesor, brillantes (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991; Gómez Sánchez, 2001).

**Distribución:** Se encuentra en los estados de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León. Ha sido anotada por Matuda y Schwarz de San Luis Potosí; por el ingeniero G. Aguirre Benavides, del Cerro de la Paila, Laguna de Mayrán y San Pedro de las Colonias, en Coahuila, y por la autora, entre Saltillo y Monterrey. Se cultiva únicamente por semillas. Las gruesas semillas, frágiles germinan rápidamente sin presentar dificultades su cultivo. Sustrato estándar (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991; Gómez Sánchez, 2001).



Figura 18. Planta de *A. capricorne*

**Cultivo *in vitro*:** El proceso de escarificación de semillas de *A. capricorne* con  $H_2SO_4$  al 15% por 5 min, indujo germinación, mientras que la inducción de callo se logró en medio Murashige y Skoog (1962) sin reguladores (Garza Padrón, 2010).

**Tamizaje fitoquímico:** En los extractos metanólicos de tallo y callo de *A. capricorne* se determinó la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, alcaloides, mientras que el extracto metanólico de tallo, además presentó grupos carbonilo, triterpenos, flavonoides y saponinas (Garza Padrón, 2010).

**Actividad biológica:**

- La actividad antimicrobiana sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marsecens* y *Staphylococcus aureus*, fué negativa, con los extractos metanólicos de tallo y callo.

- Toxicidad con el bioensayo de letalidad sobre *A. salina*, los valores obtenidos de la  $DL_{50}$  en los dos extractos metanólicos de callo y tallo, fueron mayores de 1,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo tanto no son tóxicos.
- Actividad amebicida la concentración de inhibición media ( $CI_{50}$ ) sobre *Entamoeba histolytica* de los extractos metanólicos de tallo y callo fue de 100 y 440  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.
- La actividad antioxidante de los extractos metanólicos para tallo y callo con una Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de 302.86 y 274.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , considerándose baja la actividad secuestradora de radicales (Garza Padrón et al., 2010).

**Especie:** *Astrophytum myriostigma* Lemaire

**Nombre común:** Mitra, Bonete de obispo

**Descripción:** Tallo simple o cespitoso, globoso hasta cilíndrico, de 10 a 60 cm de altura y de 10 a 20 cm de diámetro. Costillas generalmente 5 pero en algunas plantas hay 3, 4 o 6 y hasta 8, anchas y más o menos pronunciadas y con aristas desde muy agudas hasta ligeramente redondeadas, con surco bien marcado; superficie cubierta de diminutas borlas de pelos estrellados, blancos, que proporcionan a la planta un aspecto ceniciento, a veces este revestimiento falta, tegumentos muy duros. Aréolas próximas, distantes entre sí 8 a 15 mm, circulares, pequeñas, de unos 3 mm de diámetro, lanosas. Espinas ausentes. Flor campanulada, de 4 a 6 cm de longitud, de color amarillo claro con tinte rojo en el centro; pericarpelo y tubo receptacular con escamas imbricadas, angostas, con el ápice escarioso, frecuentemente terminado por un mucrón; axilas de las escamas lanosas; segmentos del perianto angostos, acuminados, con la punta escariosa, de color castaño; segmentos interiores del perianto angostos y acuminados (Figura 19). Fruto globoso-alargado, verde, se abre al madurar en forma de estrella. Semillas naviculares; hilo muy amplio; testa casi negra, brillante, papilosa, de 3 mm de longitud y 2 mm de espesor (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991; Gómez Sánchez, 2001).

**Distribución:** Se encuentra ampliamente distribuida en matorrales rosetófilos en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. En San Luis



Figura 19. Planta de *A. myriostigma*

Potosí ha sido colectado en Matehuala; en Coahuila, entre Saltillo y Eagle Pass; en Nuevo León, en Doctor Arroyo; en Tamaulipas, cerca de Jaumave y Tula. Se reproduce únicamente por semillas con fácil proceso y crecimiento rápido. Cultivar a pleno sol en un sustrato estándar, regando normalmente durante el período de vegetación (Anderson et al., 2001; Bravo & Sánchez, 1991; Gómez Sánchez, 2001).

**Cultivo *in vitro*:** La obtención de callo a partir de explantes de tallo de *A. myriostigma* se logró en medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2 mg/L de Bencilaminopurina (Garza Padrón, 2010).

**Tamizaje fitoquímico:** En los extractos metanólicos de tallo y callo se encontraron: insaturaciones, triterpenos, carbohidratos, alcaloides, el extracto metanólico de callo, también fué positivo para oxidrilos fenólicos, triterpenos y flavonoides (Garza Padrón, 2010).

**Actividad biológica:**

- Toxicidad sobre *A. salina* con una  $DL_{50}$  de callo y tallo, fueron mayores de 1,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo tanto no presentan toxicidad.

- La actividad antimicrobiana sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marsescens* y *Staphylococcus aureus*, fue negativa.
- La actividad antioxidante con DPPH con una Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) de 199.19 µg/mL para callo.
- La actividad amebicida sobre *Entamoeba histolytica* con una concentración de inhibición media (CI<sub>50</sub>) de tallo y callo de *A. myriostigma* fueron de 27 y 55 µg/mL, respectivamente (Garza Padrón et al., 2010).

**Especie:** *Echinocereus stramineus* Engelm

**Nombre común:** Pitaya fresa, Pitaya

**Descripción:** Pertenece a la subfamilia Cactoideae. En este taxón se agrupan las cactáceas monoarticuladas, no arbustivas, de tallos en su mayoría pequeños, globosos a cilindroides. A su vez, pertenece a la Tribu Equinocerae (Britton *et. Rose*) en el cual se agrupan todas las plantas que se presenten como arbustos bajos, muy ramosos, con ramas delgadas y densamente espinosas, o plantas casi siempre integradas por un tallo único o multiarticulado, corto, globoso, hasta cilíndrico, de consistencia suave, en ambos casos provistos de costillas más o menos numerosas, con aréolas casi siempre muy espinosas. Flores conspicuas, diurnas, coloridas, radiadas, campanuladas; pericarpelo pequeño, tubo receptacular generalmente más corto que el perianto ambos con numerosas aréolas provistas de pequeñas escamas paulatinamente mayores hacia el perianto que llevan espinas y lana (Figura 20). El fruto presenta numerosas aréolas espinosas, caducas. Todas estas son plantas que forman conglomerados más o menos hemisféricos, hasta de 1 a 2 m de diámetro. Tallos ovado-cilíndricos, algo angostados hacia el ápice, de 12 a 25 cm de longitud y de 3 a 7 cm de diámetro, ocultos por las espinas. Costillas 11 a 13, con el borde angosto y algo tuberculado; surcos intercostales profundos. Aréolas pequeñas, circulares, distantes entre sí 1 a 2 cm, con lana blanca cuando jóvenes. Espinas blancas hasta de color paja con tinte rosado o castaño, traslúcidas, desde delgadas hasta de grosor medio, bulbosas en la base. Espinas radiales 7 a 14, de 1 a 4 cm de longitud, de tamaño variable, aún en la misma aréola, de sección redondeada, rectas o algo curvas. Espinas centrales de 2 a 5, de 9 cm de longitud, de sección redondeada o



Figura 20. Planta de *E. stramineus*

ligeramente aplanada, delgadas en relación con su longitud, algo más oscuras que las radiales, rectas o curvas, la inferior generalmente por recta en tanto que las otras se extienden en todas direcciones entrelazándose con las de las aréolas vecinas. Flores muy grandes, de 10 a 12 cm de diámetro, de color rojo púrpura; segmentos exteriores del perianto 10 a 15, de color rosa, con el centro verdoso; segmentos interiores del perianto 15 a 20, más largos que los exteriores, con la base angosta, ensanchándose hacia el ápice, de cerca de 12 mm de anchura hacia la punta, abajo rojo purpúreo y gradualmente rosados hacia arriba, con el margen más o menos dentado y el ápice obtuso y eroso; escamas del pericarpelo y del tubo receptacular con axilas provistas de 2 a 5 espinas setosas, cortas y blancas; filamentos cortos y rojos; anteras amarillas; estilo largo, rojo; lóbulos del estigma 10 a 13 verdes. Flores abundantes en primavera. Fruto globoso, de 3 a 4 cm de diámetro, rojo, al principio espinoso y después desnudo, comestible. Semillas de 1.5 mm de diámetro, algo oblicuas. Existen dos variedades: *E. stramineus* var. *stramineus* y *E. stramineus* var. *conglomeratus* (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Distribución:** Nuevo México y sur de Texas, y Coahuila, Chihuahua y Nuevo León.

**Tamizaje fitoquímico:** El extracto metanólico del tallo en esta planta resultó negativo para la mayoría de las reacciones, solo fue positivo para insaturaciones

y alcaloides, mientras que la parte basal solo resultó negativa para lactonas. Se estudió el extracto metanólico parte basal por ser el de mayor polaridad y dar positivo a la mayoría de las pruebas (Treviño Neávez, 2009).

### Actividad biológica:

- Actividad tóxica con una  $DL_{50}$  de 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre *Artemia salina* lo que permite suponer que esta especie puede presentar compuestos activos (McLaughlin, Rogers & Anderson, 1998; Meyer et al., 1982; Treviño Neávez, 2009).
- La actividad amebicida contra *E. histolytica*, fue relevante con un  $IC_{50}$  25.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- La actividad antioxidante fue relevante con valor inferior a 50 ppm.
- Actividad bactericida sobre bacterias de importancia médica: *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alves*, *Listeria monocitogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, no presentó actividad relevante (Treviño Neávez, 2009).
- Actividad fungicida no presentó actividad contra las cepas de hongos dermatofitos *M. gypseum*, *M. canis*, *M. nanum* y *M. cookei* a las concentraciones evaluadas (Treviño N. et al., 2012).

**Especie:** *Lophocereus schottii* (Engelmann) Britton y Rose

**Nombre común:** Músaro, senita, cardona, sina, muzue

**Descripción:** Plantas arborescentes o en forma de matorrales con pocas o numerosas ramas que salen desde la base (en la var. *australis* de un tronco corto y en parte media de otras ramas). Costillas de las ramas jóvenes 4 a 10, en las ramas maduras 5 a 13. Aréolas inferiores pequeñas, ovales, ligeramente lanosas, de 3 a 5 mm de ancho; espinas 1 a 15, de 2 a 10 mm de largo, grises o morenas. Aréolas superiores circulares o elípticas, más anchas que largas, de 7 a 15 mm de ancho, densamente lanosas; espinas 20 a 75, de 3 a 7 y hasta 11 cm de largo, ligeramente aplanadas, torcidas, setosas, en fascículos compactos. Flores infundibuliformes,

hasta como de 4 cm de largo y 3 cm de ancho, blanquecinas o con tinte rosa. Fruto rojo, carnoso, globoso hasta ovalado u oblongo, de 1 a 3 cm de ancho, con pulpa roja. Semillas pardas, casi negras, brillantes, ovaladas, de 2 a 3 mm de largo y 1.5 a 2 mm de ancho, hilo casi basal (Figura 21) (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Distribución:** En cuanto a su distribución, según Bravo Holli y Sánchez Mejorado (1978), es en el desierto Crasicaule que comprende el norte del estado de Sonora hasta Arizona; es una área donde abundan las cactáceas, de ahí el nombre de crasicaule, también se halla distribuida en el sur del desierto sarcófilo (donde abundan plantas con hojas carnosas) que comprende el tercio medio de la Península de Baja California y en el desierto arbocrassicaulescente que comprende el tercio inferior de la Península de Baja California y en menor grado en los valles de la selva baja caducifolia espinosa (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Cultivo *in vitro*:** el establecimiento del cultivo *in vitro* en esta especie se logró a partir de aréolas laterales y de semillas. Morales Rubio (2006) obtuvo callo a partir de areolas, que fueron desinfectadas mediante lavados en agua corriente y luego se procedió a darles una inmersión rápida en alcohol etílico absoluto (10 s),



Figura 21. Planta en fructificación de *Lophocereus schottii*

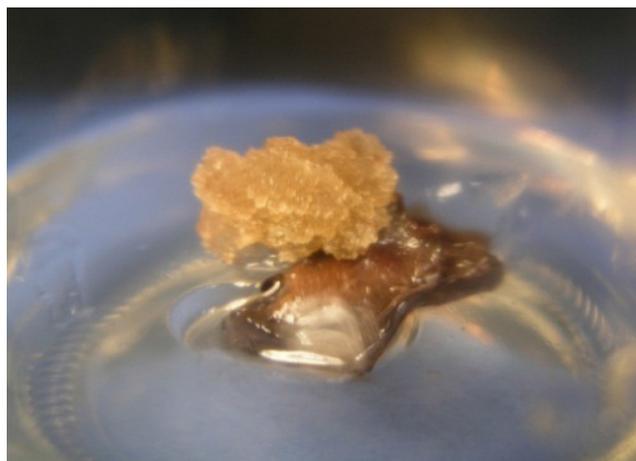


Figura 22. Callo de *L. schottii* a partir de areólas

para pasarlos a una solución de cloro comercial 15% (v/v) con unas gotas de tween 20 por 10 min, luego un lavado con agua estéril en la CFL. Se sembraron en un medio MS adicionado con BAP 2 mg/L y K 1 mg/L y 50 mg/L de ácido ascórbico se colocaron bajo condiciones de 12 h luz y temperatura controlada 22+/-2°C. (Figura 22).

También se probó el establecimiento aséptico, empleando semillas. La germinación *in vitro* y respuesta morfogénica de *Lophocereus schottii* se llevó a cabo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), donde se determinó el 100% de germinación para el tratamiento sin reguladores del crecimiento y 94% para el adicionado con Bencilaminopurina 1 mg/L y ácido indolbutírico 0.5 mg/L. Transcurridos 2 meses, las plántulas en el tratamiento 1 mostraron una raíz larga y ramificada, un brote único, alargado con areolas pequeñas, redondeadas y con espinas conspicuas callo (Figura 23a). Mientras que el tratamiento 2 se observa una raíz muy corta y engrosada, el brote también es único, pero se ha engrosado con areólas prominentes, engrosadas, con espinas pequeñas y abundantes tricomas lanosos, además se puede apreciar que el tejido comienza a diferenciarse a callo (Figura 23b) (Garza Padrón et al., 2012). García Davis (2012) realizó cortes transversales y longitudinales a plántulas de dos años de edad para determinar la producción de brotes, la siembra se realizó en medio MS (1962), con un mg/L de cinetina, observando la mayor proliferación de brotes en los cortes transversales, pero también mayor oxidación (Figura 24).

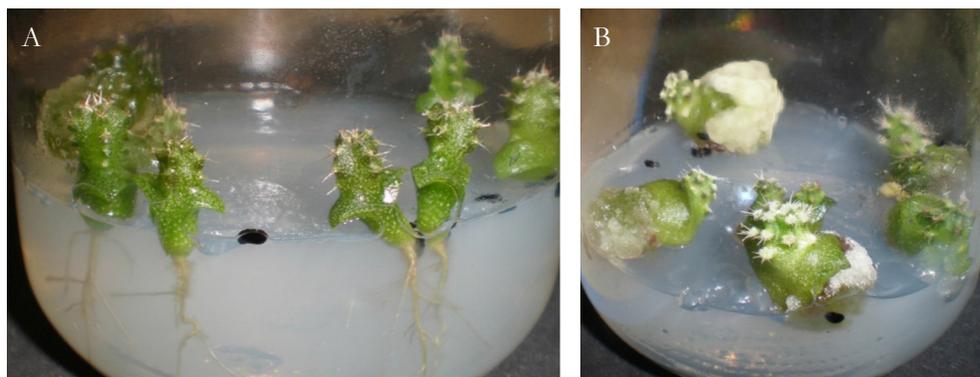


Figura 23. A. Germinación *in vitro* de *L. schottii*. B. Callo partir de plántula

**Tamizaje fitoquímico:** La presencia de oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas, para el extracto acuoso de tallo de *L. schottii*; mientras que el extracto metanólico de tallo de *L. schottii* sólo presentó sesquiterpenlactonas y alcaloides (Morales Rubio, 2006).

**Actividad biológica:**

- Actividad antibacteriana fue relevante sobre *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes*.



Figura 24. Inducción de brotación a partir de cortes longitudinales de plántulas de *L. schottii*

- Actividad tóxica sobre *A. salina*. con una LD<sub>50</sub> 64.57 µg/mL. (Morales-Rubio, 2006).
  - Citotoxicidad sobre las células MCF-7, con una IC<sub>50</sub>. >100 µg/mL. (Morales-Rubio, 2006).
  - Citotoxicidad del extracto metanólico de tallo contra células HeLa con una CI<sub>50</sub> de 11.44 µg/mL y con el acuoso de tallo con una CI<sub>50</sub> de 86.44 µg/mL (Morales-Rubio, 2006).
  - Actividad amebicida del extracto metanólico (callo) contra *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro* con una CI<sub>50</sub> menor con 19.5 µg/mL (Morales-Rubio et al., 2010)
  - Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos se demostró por diferentes métodos (E. Morales-Rubio, Treviño-Neávez & Viveros-Valdez, 2010).
- 

**Especie:** *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson & Horak

**Nombre común:** Pitaya agria, Pitayo agrio

**Descripción:** Arbusto semi-erecto que forma matorrales como de 10 m o más de diámetro, de 1 a 3 m de alto, con ramificación abierta desde abajo, los tallos se inclinan generalmente del mismo lado o son semiprostrados (Martínez, 1994). Ramas de 5 a 8 cm de diámetro bajas, obtusas, color verde oscuro. Costillas 8, rara vez 7. Aréolas más bien grandes, distantes entre sí como por 2 cm. Espinas gruesas; radiales 8 a 12, redondeadas o algo aplanadas, como de 8 a 15 mm de largo, espinas centrales 3 a 9, gruesas y fuertemente aplanadas, todas de color gris, con la punta ligeramente más oscura. Una de las espinas centrales es más larga que las otras (4 cm de largo) (Figura 25). Todas las especies que fueron estudiadas por Gibson y Horak; presentan cristales (cuerpos de silicatos) en la piel y la corteza del tallo altamente mucilaginoso). Flores, una en cada aréola, de color blanco fragantes y nocturnas con apertura en una única noche, principalmente entre julio y septiembre, de 10 a 15 cm de largo. Su fruto es ovoide hasta globoso, de 6 a 8 cm de diámetro, color rojo brillante, espinoso, las aréolas caen cuando el fruto madura, pulpa jugosa, de color rojo intenso, de sabor agradable y algo



Figura 25. Planta de *S. gummosus*

agridulce. Las semillas negras, oblicuamente reniformes, con hilo lateral hundido en la parte más angosta (Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978; Mercado B & Granados S, 1999; Molina-Freaner, Tinoco-Ojanguren & Niklas, 1998; Pizzetti, 1985; Vázquez, Ochoa & Fort, 1993).

**Distribución:** Planta dominante en muchas zonas desérticas que tiene una distribución muy amplia en la Península de Baja California e islas adyacentes del Golfo de California, como: Isla Tiburón, Isla Tortuga e Isla Ángel de la Guarda. Se encuentra desde el norte de Ensenada, aparece en la región de Vizcaíno, Magdalena, Santa Rosalía, Bahía Concepción, San Ignacio, hasta un poco al norte de Todos Santos y La Paz. Ningún otro cacto ocupa una extensión mayor en la península. También se desarrolla en las franjas angostas de los litorales de Sonora desde El Desemboque hasta Cerro Prieto y norte de Sinaloa (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978; Mercado B & Granados S, 1999).

**Cultivo *in vitro*:** Las semillas se escarificaron con ácido clorhídrico concentrado por 30 s, posteriormente se procedió a su desinfección y sembradas en medio Murashige y Skoog (1962), adicionado con BAP (Bencilaminopurina) 2 mg/L y K (Cinetina) 1 mg/L (Avilés, 2004; Morales, 2000). La germinación originó plántulas con un brote único y raíces ramificadas (Figura 26), que más tarde se desdiferenciaron a callo (Figura 27) (Morales-Rubio, 2006).



Figura 26. Germinación *in vitro* de *S. gummosus*



Figura 27. Callo de *S. gummosus*

### Tamizaje fitoquímico:

- En el extracto acuoso de tallo se identificaron los siguientes: oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas; y en el extracto metanólico de tallo presentó esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos y alcaloides.
- En callo *in vitro* se determinó la presencia de oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas, coin-

ciendo con los compuestos detectados en los extractos metanólicos de los tejidos *in vivo* (Morales Rubio, 2006)

### Actividad biológica:

- Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico no presentaron actividad contra las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25619, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes* (Morales Rubio, 2006).
- Actividad tóxica sobre *A. salina* de los extractos acuoso y metanólico, no fueron tóxicos (Morales Rubio, 2006).
- Citotoxicidad del extracto metanólico sobre las células MCF-7, a las dosis probadas presentó un efecto positivo sobre la proliferación celular, de manera dependiente con la dosis, no así el acuoso (Morales Rubio, 2006).
- Citotoxicidad contra las células HeLa no mostraron actividad ambos extractos (Morales Rubio, 2006).

**Especie:** *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum

**Nombre común:** Pitayo de octubre, Pitayo

**Descripción:** Con tronco bien definido, de 4 a 5 m de alto, ramoso. Ramas de 8 a 10 cm de diámetro, de color verde oscuro, hacia la extremidad de las ramas azulado, con una pruinosidad blanquecina. Costillas 5 a 6 prominentes agudas, algo onduladas. Aréolas distantes entre sí 3 a 4 cm, grandes, de 8 a 10 mm de diámetro, circulares, provistas de fieltro grisáceo claro. Espinas radiales 5 a 7 de 1 a 2 cm de largo, radiadas, subuladas, al principio amarillentas, después grises con la punta oscura. Espinas centrales 1 a 4, grises, de 2 a 3 cm de longitud (Figura 28). Flores infundibuliformes, de 9 cm de longitud, con tubo receptacular largo; escamas y segmentos exteriores del perianto de color moreno verdoso; segmentos interiores del perianto de color blanco, más largos y delgados que los exteriores; pericarpelo con numerosos podarios pequeños que llevan escamas con aréolas provistas de lana corta. Fruto ovoide, de 5 a 8 cm de largo, de color variable, rojo púrpura, anaranjado verdoso, con pulpa carnosa,

del mismo color que el pericarpelo; las aréolas grandes, lanosas y espinosas de que está provisto se desprenden con facilidad cuando el fruto madura. Semillas pequeñas, de 2 a 2.5 mm de largo, y 1.8 mm de ancho; amplio hilo basal; testa negra con gruesas puntuaciones (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Distribución:** Estados de Tamaulipas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Crece en estado silvestre y se cultiva en diversos poblados de las mixtecas. Se ha señalado en Oaxaca, en Totolapan, Tequisistlán, Mitla, Ixtlán de Juárez y distintos lugares de las mixtecas altas, Huajuapán de León; en Puebla, en el cañón del río Atoyac, en «cuajiotales», y en los alrededores de Tehuacán; en Guerrero, en el Cañón del Zopilote; en Chiapas, en la Hacienda de la Providencia, y también cerca de Tula, Tamaulipas y Río Verde, San Luis Potosí. Existen diferentes variedades hortícolas que se distinguen por la forma y el color de los frutos a los cuales se les da, como a la especie anterior, el nombre de «pitayas». La población de Guajolotitlán, Oaxaca, cercana a Huajuapán de León, produce para el mercado diferentes variedades de esta planta. La fructificación se produce en



Figura 28. Planta de *S. pruinosus*

mayo y en septiembre y en estas épocas se encuentran en los mercados regionales todas las variedades. El fruto es también muy agradable. Su producción debería incrementarse, pudiendo ser una fuente de riqueza para esas regiones (Anderson et al., 2001; Bravo Hollis & Sánchez Mejorado, 1978).

**Cultivo *in vitro*:** La germinación *in vitro* de *Stenocereus pruinosus* se llevó a cabo en el medio de cultivo MS (1962), sin reguladores de crecimiento desarrollando plántulas de un solo brote y raíces ramificadas (Figura 29), así mismo se probó la efectividad de cortes transversales y longitudinales de plántulas germinadas *in vitro* observándose que los cortes longitudinales fueron los más efectivos (Figura 30) (Espinoza Vallejo, 2008).

**Tamizaje fitoquímico:** Los extractos hexánicos y metanólicos fueron positivo para: insaturaciones, esteroides y triterpenos, lactonas, sesquiterpenlactonas, saponinas; mientras que el extracto metanólico presentó oxidrilos fenólicos y alcaloides (Treviño Neávez, 2009).

#### **Actividad biológica:**

- La actividad bactericida del extracto metanólico sobre bacterias de importancia médica fue relevante sobre *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* y *Citobacter freundii* (Treviño Neávez, 2009).



Figura 29. Germinación *in vitro* de *S. pruinosus*



Figura 30. Inducción de brotación a partir de cortes longitudinales de plántulas de *S. pruinosus*

- Actividad amebicida sobre el cultivo axénico de *E. histolytica* para el extracto metanólico con una  $IC_{50}$  de 264.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Treviño Neávez, 2009).
- Actividad fungicida del extracto metanólico fue relevante contra los hongos dermatofitos: *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum nanum* (Treviño N. et al., 2012).

### 11.5.3. *Crassulaceae*

**Especie:** *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & E.P.Perrier

**Nombre común:** Calanchoe, aranto, espinazo del diablo

**Descripción:** Su sinónimo es *Bryophyllum daigremontianum*. Pertenece a la familia: Crassulaceae. Es una planta suculenta (Figura 31), cuya característica más importante, es que en el borde de las hojas hay una hilera de plántulas en miniatura que confieren un aspecto muy atractivo (propágulos), estos caen y se desarrollan alrededor de la planta progenitora, es una forma muy eficaz de reproducción asexual. Alcanza 1 m de altura, presentan hojas con margen



Figura 31. Planta de *K. diademata*

dentado, con bulbillos de plántulas, carnosas, envés jaspeado púrpura (Everitt, Lonard & Little, 2007).

**Distribución:** Endémica de Madagascar, pero distribuida a nivel global.

**Cultivo *in vitro*:** Se utilizaron propágulos de *Kalanchoe diademata*, fueron sembrados en medio MS (1962) adicionado con sales minerales, vitaminas, 30g/L de sacarosa, 7g/L de agar, se adicionó con 1mg/L de ácido naftalenacético (ANA) para un tratamiento y 1mg/L de bencilaminopurina (BAP) para el otro. Los explantes (propágulos) se sometieron a un proceso de desinfección, consistente en lavar en agua corriente con unas gotas de tween 20 por quince minutos, luego se dio una inmersión rápida en alcohol etílico absoluto (15 seg) para ser luego colocados en una solución de cloro comercial al 15% durante ocho minutos, para finalmente, en condiciones asépticas, se enjuagaron con agua estéril y se procedió a la siembra en ambos tratamientos. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de 12 h luz y temperatura de 22+/- 2°C, durante dos meses. Los propágulos sembrados en el medio adicionado con auxinas, desarrollaron brotes abundantes, pero un sistema radical mal definido (Figura 32a), con el medio adicionado con citocininas, se desarrollaron abundantes brotes y raíces ramificadas (Figura 32b). Los extractos de los tejidos cultivados *in vitro* resultaron positivos para las pruebas siguientes: insaturaciones, grupo carbonilo, oxidrilos fenólicos, teroles y triterpenos, carbohidratos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, alcaloides (Perales Quiroga, 2013).

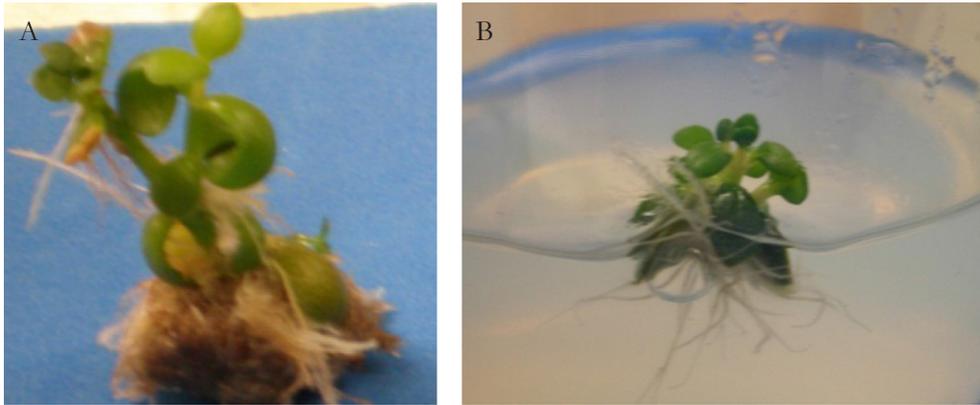


Figura 32. A. Plántulas con sistema radical mal diferenciado.  
B. Plántulas con sistema radical bien diferenciado

#### 11.5.4. *Cucurbitaceae*

**Especie:** *Ecballium elaterium* (L.) Richard

**Nombre común:** Cohombrillo amargo, pepinillo del diablo, pepinillo amargo o elaterio

**Descripción:** Enredadera, con hojas palmatilobadas y flores en forma de embudo. Ambas estructuras presentan tricomas. Las flores masculinas y femeninas aparecen en la misma planta, su fruto es verde amarillento (Figura 33), de forma ovalada y con tricomas abundantes (Barceloux, 2008).

**Distribución:** Originaria del Mediterráneo, pero de amplia distribución (Pérez Chiscano, 1985).

**Cultivo *in vitro*:** El procedimiento de desinfección de los frutos colectados es el siguiente: se lavaron en agua corriente durante un período de 20 min, posteriormente se sumergieron en una solución de alcohol etílico absoluto al 70% durante 30 s, transcurrido el tiempo se pasaron a una solución de cloro comercial al 10% durante 20 min, y finalmente se enjuagaron con agua estéril, para proseguir con la extracción de las semillas. Una vez transcurrido el procedimiento de desinfección, las semillas fueron seccionadas longitudinalmente con la ayuda de un bisturí, obteniendo dos explantes por semilla. Posteriormente, se sembraron en el medio



Figura 33. Fruto de *E. elaterium*

MS (1962) sin reguladores del crecimiento, colocándose 4 explantes por frasco y 12 repeticiones. Los frascos fueron etiquetados y se colocaron en el cuarto de cultivo bajo condiciones de luz (12 h) y temperatura  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Mediante este sistema se logró la germinación (Figura 34) y desarrollo de plántulas con un sistema radical bien establecido y crecimiento de la planta de hasta 5 cm de longitud, en un lapso de tres meses. Las pruebas de tamizaje fitoquímico de los tejidos *in vitro* resultaron positivas para los siguientes grupos funcionales: insaturaciones, grupo carbonilo, esteroides y triterpenos, saponinas, coumarinas y sesquiterpenlactonas. (Chávez Aguilar, 2012).

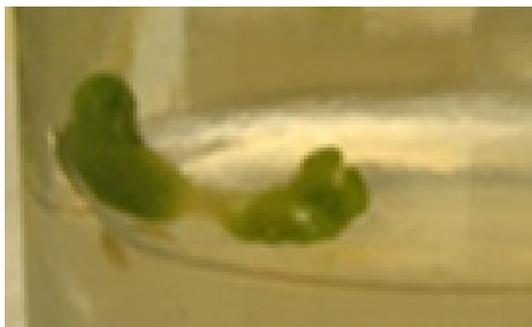


Figura 34. Plántula de *E. elaterium* desarrollada a partir de semillas

### 11.5.5. *Fabaceae*

**Especie:** *Eysenhardtia texana* Scheele

**Nombre común:** Texas Kidneywood, Bee-Brush o Vara dulce

**Descripción:** *E. texana* Scheele. (Leguminosae) es un arbusto de 2 a 4 m de altura con tallos ramificados. Estípulas tubuladas de 2 mm de largo. Hojas alternas, pinnado compuestas, de 1.5 a 6 cm de largo con 16 a 21 pares de folíolos por hoja. Cada folíolo es oblongo a oblongo elíptico de 7 a 10 mm de largo por 2.9 a 3.5 de ancho, con ápice emarginado, agudo o truncado y ocasionalmente mucronato diminutamente pubescente. Está provisto con glándulas principalmente en el envés y estípelas tubuladas de 0.4 mm de largo. Brácteas pequeñas y ovadas de 1 mm de largo, agudas al ápice y densamente pubescentes. Las inflorescencias están dispuestas en racimos espigados terminales y subterminales de 6 a 7 cm de largo, madurando primero las flores inferiores. El cáliz es campanulado, de 3 mm de largo por 2 mm de ancho, diminutamente pedicelado, 5-lobulado. Los dientes subiguales poseen una depresión más



Figura 35. Planta de *E. texana*

profunda en uno de los lóbulos, diminutamente adpreso-pubescente y presenta glándulas color café. La corola es blanca, formada por cinco pétalos libres entre sí, de 5 a 5.2 cm de largo por 1.4 a 2 mm de ancho. Linear-oblongos a oblongos, con 10 estambres libres. Estilo persistente con una glándula en el ápice inmediatamente debajo del estigma, éste último ligeramente ensanchado (Figura 35). El fruto es una vaina de 8 a 9 mm de largo, curvado, aplanado e indehisciente de color café, dirigida hacia arriba y diminutamente pubescente o glabra, con el estilo persistente y glándulas esparcidas (Estrada-C & Marroquín de la Fuente, 1992).

**Distribución:** Nativa del suroeste de Estados Unidos, México y Guatemala (Rydberg, 1928).

**Cultivo *in vitro*:** Para la desinfección de las semillas, se lavaron en agua corriente por 20 minutos inmersión en solución de cloro comercial al 15% durante 20 min y pasando por alcohol y flama justo antes de sembrar en el frasco, resultando sin contaminación ninguno de los frascos. Se adaptaron los métodos de Kyte y Kleyn (2001) y Marinucci, Ruscitti y Abedini (2004) propuestos para el cultivo *in vitro* de leguminosas. Como medio se usó el medio MS (1962), se emplearon dos tratamientos uno a mitad de su concentración de medio, adicionado con 1mg/L de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y 0.1 mg/L de cinetina. Ajustando a pH 6, y otro también a mitad de su concentración con



Figura 36. Plántula obtenida a partir de semillas de *E. texana* con formación de callo

3 mg/L de BA (6-bencilaminopurina o benciladenina). Ajustando a pH 5.7. La germinación en ambos medios fue muy rápida, ya que el 95% de las semillas habían germinado al cuarto día de la siembra, así como la producción de callo fue el tratamiento a base de BAP, el que lo desarrollo, obteniendo al final de quinto mes después de la siembra 10.4 gramos de tejido indiferenciado (Figura 36), el extracto de tejido *in vitro* de callo resultó positivo para: insaturaciones, esteroides y triterpenos, carbohidratos, flavonoides, saponinas y compuestos aromáticos (Rangel Ávila A., 2008).

### 11.5.6. *Meliaceae*

**Especie:** *Azadirachta indica* A. Juss

**Nombre común:** Conocida comúnmente como margosa y paraíso de la india en español y como Neem

**Descripción:** *Azadirachta indica* pertenece a la familia Meliaceae, es un árbol de tamaño mediano a grande, caracterizado por su tronco corto y recto, de hojas alargada y pinadas. Las flores aparecen en panículas estrechas y ramificadas de 5 a 15 cm de largo, las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos de cáliz redondeados y de un color pálido, florece entre marzo y mayo. Los frutos tiene forma de aceituna (drupas) de 1.0 a 2.0 cm de largo, lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduran (López-Pantoja, Angulo-Escalante, Martínez-Rodríguez, Soto-Beltrán & Chaidez-Quiroz, 2007).

**Distribución:** Es originario de Asia meridional, pero su distribución es en zonas templado-tropicales del mundo.

**Cultivo *in vitro*:** Se colectaron hojas de Neem, y se sometieron a un proceso de desinfección consistente en un lavado en agua corriente con jabón antibacterial, luego se colocaron por 10 s en alcohol etílico absoluto, y se pasaron a una solución de cloro comercial al 15% por 10 min en agitación constante, para luego ser lavadas en agua estéril, se emplearon dos tratamientos uno a base de medio MS adicionado con 1 mg/L de bencilaminopurina y 3 mg/L de ácido indolbutírico, y otro a base de medio MS sin reguladores, la proliferación de callo se obtuvo en el medio adicionado con reguladores (Figura 37).



Figura 37. Formación de callo a partir de hoja de *A. indica*

### 11.5.7. *Rosaceae*

**Especie:** *Rubus adenotrichus* Schldtl

**Nombre común:** Zarzamora, mora vino

**Descripción:** Arbusto perenne con hábitos de crecimiento trepador, tallos semirectos de longitud variable (hasta 5 m de longitud), redondeados, espinosos, ramificados y constantemente se forman nuevos brotes en la base de la planta. Las hojas están compuestas de 3 a 5 folíolos de 5 a 10 cm de largo, ápice agudo, borde doblemente aserrado, pecíolos cilíndricos, blancuzcos y pubescentes, el haz piloso con algunas espinas en la superficie y el envés pubescente y algunas espinas en la nervadura central; flores de color blanco o rosa con abundantes estambres; fruto ovoide de aproximadamente 4 cm de largo y 2 cm de ancho, formado por varias drupas jugosas pequeñas, de color rojo o negro cuando están maduras y sabor ácido (Figura 38) (Biblioteca virtual, s. f.).

**Distribución:** Centro y Sudamérica, de México a Ecuador (Encyclopedia of life. *Rubus adenotrichus*, s. f.)

**Cultivo *in vitro*:** Para la germinación *in vitro* de *R. adenotrichus* se removió parte de la cubierta de la semilla. Las plantas germinadas *in vitro* generaron brotes y raíces con todas las características morfológicas de las plantas silvestres en los medios ME (MS sin reguladores de crecimiento), MF (MS adicionado con 1 mg/L



Figura 38. . Planta silvestre de *R. adenotrichus*

de BA), MG (WPM sin reguladores de crecimiento vegetal y sin antioxidantes) y MH (WPM adicionado con 50 mg/L de ácido L-ascórbico y 150 mg/L de polivinilpirrolidona (Figura 39). En los dos medios de cultivo empleados para la inducción de callo: ML (MS adicionado con 1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de K) y el medio MM (WPM adicionado con PVP, ácido ascórbico, 0.5 mg/L



Figura 39. Planta generada *in vitro* a partir de semillas de *R. adenotrichus*

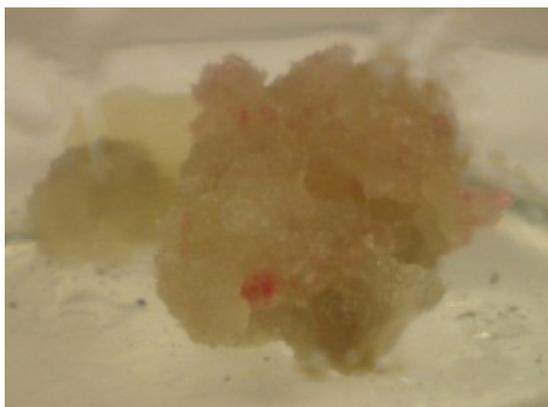


Figura 40. Callo con pigmentación generado de plantas *in vitro* de *R. adenotrichus*

de 2,4-D y 0.75 mg/L de K) creció tejido friable y abundante y con pigmento rojizo y morado (Figura 40). En el tejido de callo desarrollado en el medio MM: (WPM adicionado con PVP, ácido ascórbico, 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.75 mg/L de K), se identificaron: fenoles, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenlactonas. En el medio WPM sólido para producción de pigmento proliferaron células rojas con un contenido de 1.06 mg de antocianinas por cada g de células secas. Las células que se cultivaron en suspensión (WPM líquido) produjeron pigmentos de color morado con un contenido de fenoles 181 mg GAE/g y contenido de flavonoides 0.29 mg CE/g de materia seca (Martínez-Cruz, 2012).

### 11.5.8. *Scrophulariaceae*

**Especie:** *Leucophyllum frutescens*

**Nombre común:** Cenizo, Palo de cenizo, hierba de cenizo, sabio púrpura, salvia de Texas, Texas Ranger y Silverleaf

**Descripción:** Típicamente es un arbusto compacto que crece de 2-5 pies de alto, aunque ocasionalmente pueden llegar a medir 8 pies de altura y de 4 a 6 pies de ancho, (Figura 41) (Lady Bird Johnson Wildflower center, 2012). El cenizo es una planta comúnmente empleada por sus cualidades ornamentales debido a que es un arbusto siempreviva con flores atractivas y duraderas. Una calidad ecológica muy importante de esta planta es su resistencia, esta planta es capaz de sobrevivir



Figura 41. Planta de *L. frutescens* en su hábitat

sequias, heladas, fuertes vientos, salinidad, ataques de herbívoros y fuertes calores (Vega-Menchaca et al., 2013).

**Distribución:** Ampliamente en el norte de México (Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Chihuahua) y el sudoeste de los Estados Unidos.

**Cultivo *in vitro*:** se emplearon semillas como explantes, y se colocaron en medio MS (1962), las plántulas obtenidas se desarrollaron formando hojas y tallos, bien formados (Figura 42). Las pruebas fitoquímicas de los tejidos regenerados fueron



Figura 42. Plántula *in vitro* de *L. frutescens* obtenida a partir de semilla

positivas para insaturaciones, grupo carbonilo, taninos, esteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonoides, saponinas y compuestos aromáticos.

### 11.5.9. *Fouquieriaceae*

**Especie:** *Fouquieria splendens*

**Nombre común:** Ocotillo, Rotilla, Albarda

**Descripción:** Arbusto o árbol bajo, de 2 a 10 m de altura, tronco basal corto, de 15 a 25 cm de diámetro, ramificado cerca de la base en 6 a 30 tallos erectos o recurvados, corteza externa verde a café-amarillenta, exfoliante en pequeñas tiras, espinas de 15 a 25 mm de largo, rectas o curvas; hojas de los brotes cortos 4 a 11, lineares patuladas ampliamente obovadas, de 17 a 35 mm de largo, por 5 a 11 mm de ancho, agudas a redondeadas y emarginadas en el ápice, cuneadas en la base; panícula estrechamente cónica a cilíndrica, de 10 a 20 cm de longitud, raquis de color púrpura a rojizo (Figura 43); sépalos anaranjado-rojizos, rosados a blanco-amarillentos, ampliamente ovados, oblongos a casi reniformes, de 4.5 a 6 mm de longitud, 3.5 a 5.5 mm de ancho, obtusos a emarginados en el ápice; corola anaranjado-rojiza, rosado purpúrea, rosado-amarillenta a



Figura 43. Planta de *F. splendens*, en su ambiente natural

amarilla clara, de 10.5 a 28 mm de largo, tubo de 6.5 a 22 mm de largo, por 3.5 a 6 mm de ancho en la garganta, pubescente en su interior con una banda de 2 a 5 mm de pelos unicelulares cerca de la base, lóbulos fuertemente reflejos, de 4.5 a 7 mm de longitud y 3.5 a 5 mm de ancho, ampliamente ovados a elípticos; estambres 14 a 16, filamentos de 12 a 25 mm de largo, ensanchados en la base, con un espolón truncado adaxial de 1.5 mm de largo, anteras de 4 a 5 mm de largo; ovario de 1.5 a 2 mm de alto, óvulos 12 a 16, estilo de 8.5 a 32 mm de largo; cápsulas lanceoladas a ovado-lanceoladas en contorno, de 14 a 22 mm de longitud y 5 a 7 mm de diámetro; semillas 5 a 13, blancas, de 7 a 13 mm de longitud, 4 a 6 mm de ancho, con alas hasta de 5 mm de ancho. La aparición periódica no estacional de las hojas de esta especie depende de la incidencia de la precipitación pluvial, la mayor parte del año las plantas permanecen sin follaje, pero cuando caen las lluvias, las hojas se desarrollan rápidamente. Éstas no duran mucho tiempo sobre la planta, pues se caen pronto, por lo que su presencia es un indicador seguro de que las lluvias han ocurrido recientemente. En las hojas de *Fouquieria* se presentan muchas traqueidas almacenadoras de agua, poco comunes en la mayoría de las especies de dicotiledóneas las cuales se asocian con las venas menores y las venas terminales. Estos elementos traqueales podrían considerarse como adaptación a las condiciones de baja humedad por las que pasan estas especies en condiciones de sequía (Henrickson, 1969; Lersten & Carvey, 1974).

**Distribución:** Se distribuye en zonas áridas, desde el suroeste de Estados Unidos, incluyendo parte de los estados de California, Arizona, Nevada, Nuevo México y partes del suroeste de Texas, se les encuentra al norte de México, en los desiertos de Sonora y Chihuahua, desde San Luis Potosí y Tamaulipas hasta la parte sur de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo, entre los 700 y 2100 msnm, se encuentra asociada con especies como *Yucca*, *Agave*, *Hechtia*, *Myrtillocactus*, *Opuntia*, *Echinocactus*, *Cephalocereus* y arbustos decíduos (Henrickson, 1972).

**Tamizaje fitoquímico:** El extracto metanólico de *F. splendens* presenta: insaturaciones, grupo carbonilo, oxhidrilos fenólicos, esteroides y triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, flavonoides y alcaloides.

Se identificó una saponina y un compuesto la 4-hidroxi-2-metil ciclopentenona, el cual no se ha reportado para esta especie (Rodríguez-Garza, 2010).

**Actividad biológica:**

- Actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* a una concentración de 100 mg/mL.
- Actividad antifúngica sobre las cepas de hongos dermatofitos fue positiva a 125 mg/mL.
- La actividad antioxidante con DPPH presentó una  $CE_{50}$  de 130.2  $\mu\text{g/mL}$ .
- Actividad amebicida sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS con una  $CI_{50}$  de 5.4  $\mu\text{g/mL}$  (Rodríguez Garza, 2010).

**11.6. Conclusión**

La importancia de la micropropagación está basada en la necesidad de proteger y asegurar la subsistencia de las especies vegetales que están comprometidas, sea por la explotación de sus recursos o la búsqueda de metabolitos activos generados por ellas; tal es el caso de *Taxus spp*, *Catharanthus roseus*, *Lophophora williamsii*, entre otras. El cultivo de tejidos vegetales ofrece a partir de la totipotencialidad de las células de las plantas originar nuevos organismos en un medio de cultivo *in vitro* a través de fitohormonas y factores de crecimiento que disminuyen el tiempo de maduración del organismo, obteniéndolo en un lapso menor al de su ciclo de vida silvestre. Las aplicaciones biotecnológicas en el aislamiento de metabolitos secundarios obtenidos por esta vía incluyen: la modificación genética, el estrés con factores físicos y/o químicos como los fotoperíodos, el estrés salino y la diferenciación hacia callos, brotes o raíces. En la Universidad Autónoma de Nuevo León de la Facultad de Ciencias Biológicas, a casi 25 años de haberse instituido el Laboratorio de Micropropagación, se han desarrollado una gran cantidad de tesis, así como trabajos de investigación, por maestros, alumnos de pre y posgrado, tanto de la institución como de intercambio, y se han difundido en diversos eventos académicos, y publicado en revistas indexadas. Los maestros que integran dicho laboratorio son: Dra. María Eufemia Morales Rubio, Dr. Jaime Francisco Treviño Neávez (QEPD), Dra. Ruth A. Garza Padrón, Dr. Ramón G. Rodríguez Garza y Dra. Claudia Espinosa Leal. Han sido estudiadas diversas especies de familias tanto de la región como de otras partes del país, se han logrado resultados prometedores, tanto en el área de la sustentabilidad, como en la de productos naturales.

## Referencias

- Aceves-Agüero, D.M. (2013). *Germinación y respuesta morfogénica in vitro de Mammillaria beyderi*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Anderson, E., Barthlott, W., & Brown, R. (2001). *The cactus family*. New York, USA: Timber Press.
- Barceloux, D.G. (2008). *Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals*. Wiley & Sons. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470330319>
- Bart, H.J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants- An Introduction. En H.-J. Bart, & S. Pilz, *Industrial Scale Natural Products Extractions* (pp. 1-25). Weinheim: Wiley-VCH. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527635122.ch1>
- Biblioteca virtual. (s. f.). Recuperado el 29 de diciembre de 2015, a partir de <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/BuenasPracticasMoraOrganica.pdf>
- Bravo-Hollis, H., & Sánchez-Mejorado, H. (1978). *Las Cactáceas de México. Vol. I*. México DF: Universidad Autónoma de México.
- Bravo, H.H., & Sánchez, M.H. (1991). *Las Cactáceas de México*. México DF: Universidad Autónoma de México.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K., & Bisaria, V.S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 138-149. <http://doi.org/10.1007/BF02932911>
- Chávez-Aguilar, B.E. (2012). *Germinación in vitro de Ecballium elaterium (L) Richard. e identificación de compuestos químicos de tejidos regenerados*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Crisóstomo, S.M. (2009). *Evaluación de la competencia morfogénica en explantes longitudinales de Astrophytum ornatum (De Candolle) (Cactaceae)*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- Dagla, H.R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759-767. <http://doi.org/10.1007/s12045-012-0086-8>
- Encyclopedia of life. *Rubus adenotrichus* (s. f.). Recuperado el 29 de diciembre de 2015, a partir de <http://www.eol.org/pages/300826>
- Espinoza-Vallejo, Y. (2008). *Germinación y respuesta in vitro de Stenocereus pruinosus (Weber) Buxbaum y estudios preliminares sobre su fitoquímica y actividad biológica*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Estrada-C.A., & Marroquín de la Fuente, J. (1992). *Leguminosas en el Centro-Sur de Nuevo León. Reporte Científico, número especial 10. Facultad de Ciencias Forestales (Vol. 10)*. Universidad Autónoma de México.
- Everitt, J.H., Lonard, R.L., & Little, C.R. (2007). *Weeds in South Texas and Northern Mexico*. Lubbock: Texas: Tech University Press.
- Gamborg, O.L.L., Miller, R.A.A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](http://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- García-Davis, S. (2012). *Inducción de brotación a partir de plantas germinadas in vitro de Lophocereus schottii (Engelmann) Britton and Rose empleando diferentes tipos de cortes y perfil fitoquímico de los tejidos regenerados*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Garza-Padrón, R.A. (2010). *Análisis fitoquímico y actividad biológica de los extractos de tallos y tejido in vitro de Astrophytum myriostigma (Lemaire, 1839) y Astrophytum capricorne (Dietrich, 1922) Fam. Cactaceae*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Garza-Padrón, R.A., Pedraza-Zamora, M., Treviño-Neávez, J.F., Rodríguez-Garza, R.G., Barrón-González, M.P., & Morales-Rubio, M.E. (2012). Germinación *in vitro* y respuesta morfogénica de *Lophocereus schottii*. *JPACD*, 14, 24-34.
- Garza-Padrón, R.A., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E., Oranday-Cárdenas, A., Rivas-Morales, C., Núñez-González, M.A. et al. (2010). Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica*, 30, 111-121.

- Gómez-Sánchez, A. (2001). *Enciclopedia Ilustrada de los Cactus y otras Suculentas*. España: S.A. Mundi-Prensa Libros.
- Gunasena, H.P., Pushpakumara, D.K., & Kariyawasam, M. (2007). Dragon fruit *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose. En *Underutilized fruit trees in Sri Lanka*. New Delhi, India: World Agroforestry Centre South Asia Office.
- Guzmán, U., Arias, S., & Dávila, P. (2003). *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. México DF: UNAM.
- Henrickson, J. (1969). *Anatomy of periderm and cortex of Fouquieriaceae*. Aliso.
- Henrickson, J. (1972). *A taxonomic revision of the Fouquieriaceae*. Aliso.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En *A. Leva, & L. M. Rinaldi, Recent Advances in Plant in vitro Culture* (pp. 1-28). <http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- Jiménez-Sierra, C.L., Rocha-Huerta, C.G., & Mendoza-Moreno, S. (1991). *Astrophytum ornatum* (DC) F.A.C. Weber ex Britton & Rose. *Cactáceas y suculentas mexicanas*, 50(2), 64.
- Lady Bird Johnson Wildflower Center. (2012). Native Plant Database. Recuperado el 29 de diciembre de 2015, a partir de [http://www.wildflower.org/plants/result.php?id\\_plant=LEFR3](http://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=LEFR3)
- Lersten, N.R., & Carvey, K.A. (1974). Leaf anatomy of ocotillo (*Fouquieria splendens*; Fouquieriaceae), especially vein endings and associated veinlet elements. *Canadian Journal of Botany*, 52(9), 2017-2021. <http://doi.org/10.1139/b74-258>
- López-Pantoja, Y., Angulo-Escalante, M., Martínez-Rodríguez, C., Soto-Beltrán, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2007). Artemisa (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis*). *Bioquímica*, 32(4), 117-125.
- Marienhagen, J., & Bott, M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 166-178. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.001>

- Martínez-Cruz, N. (2012). *Producción de antocianinas por cultivo «in vitro» de Rubus adenotrichus Schbltdl(zarzamora)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Martínez-Iturralde, A. (2009). *Germinación in vitro de Ariocarpus trigonus (Weber) K. Schumann mediante escarificación con ácido sulfúrico, una alternativa sustentable para su resguardo*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Martínez, M. (1994). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México DF: Fondo de Cultura Económica.
- McLaughlin, J.L., Rogers, L.L., & Anderson, J.E. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 32(2), 513-524. <http://doi.org/10.1177/009286159803200223>
- Mercado B,A., & Granados S,D. (1999). *La pitaya. Biología. Ecología. Fisiología sistémica. Etnobotánica*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.A., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., & Mclaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Molina-Freaner, F., Tinoco-Ojanguren, C., & Niklas, K. (1998). Stem biomechanics of three columnar cacti from the Sonoran Desert. *American Journal of Botany*, 85(8), 1082. <http://dx.doi.org/10.2307/2446341>
- Morales-Rubio, M.E. (2006). *Extractos de Lophocereus schottii(Engelm) Britton and Rose y Stenocereus gummosus (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Morales-Rubio, E., Treviño-Neávez, J.F., & Viveros-Valdez, E. (2010). Free Radical Scavenging Activities of *Lophocereus schottii* ( Engelmann ). *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 4(1), 69-72.
- Morales-Rubio, M.E., Morales-Vallarta, M.R., Treviño-Neávez, J.F., Garza-Padrón, R.A., Rodríguez-Garza, R.G., Mar-Aguilar, F. et al. (2010). Actividad amebicida de extractos de Tejidos *in vivo* e *in vitro* de cuatro especies de cactáceas sobre *Entamoeba histolítica*. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomedica*, 1-13.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. et al. (2015). Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology*, 32(6), 581-587. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>
- Oksman-Caldentey, K.-M., & Inze, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>
- Pauwels, L., Inzé, D., & Goossens, A. (2016). Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends in Plant Science*, 14(2), 87-91. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.005>
- Perales-Quiroga, J.C. (2013). *Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de tejidos regenerados in vitro y planta in vivo de Kalanchoe diargremontiana Raym.-Hamet & E.P. Perrier*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pérez-Chiscano, J.L. (1985). Distribución geográfica de *Ecballium elaterium* (L.) Richard (Cucurbitaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Studia Botanica*, 4, 57-77.
- Pérez-Gutiérrez, G. (2012). *Efecto de la concentración de agar en la germinación de Coryphanta odorata (Boedeker), a partir de semillas, y tamizaje fitoquímico de tejidos in vivo e in vitro*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pizzetti, M. (1985). *Simon and Schuster's guide to cacti and succulents*. New York, USA: Simon and Schuster Inc.
- Prakash, S., & Van Staden, J. (2007). Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl—a valuable medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 73(1), 60-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2006.07.001>
- Rangel-Ávila A. (2010). Respuesta *in vitro* e identificación de compuestos químicos de *Eysenhardtia texana* Scheele. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Ramachandra-Rao, S., & Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Rodríguez-Garza, R.G. (2010). *Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de Fouquieria splendens*(Engelmann), *Ariocarpus retusus*(Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rout, G.R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2), 91-120. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00026-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00026-9)
- Rydberg, P.A. (1928). Genera of North American Fabaceae IV. Tribe Psoraleae (Continued). *American Journal of Botany*, 15(7), 425-432. <http://dx.doi.org/10.2307/2435803>
- SEMARNAT (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Recuperado el 29 de octubre de 2015, a partir de [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM\\_059\\_SEMARNAT\\_2010.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf)
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169-180. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Treviño, N.J.F., Rodríguez, G.R.G., Verde, S.M.J., Morales, R.M.E., Garza, P.R.A., Rivas, M.C. et al. (2012). Actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(1)
- Treviño-Neávez, J.F. (2009). *Actividad biológica y componentes presentes en Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire ex K. Schumann), *Echinocereus stramineus* (Hengelmann) y *Stenocereus pruinosus*, (Otto). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vázquez, S.G., Ochoa, O.P., & Fort, M.R. (1993). *Jardín botánico de la flora sudcaliforniana*. La Paz, B.C.S: UPN.
- Vega-Menchaca, M. del C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., Morales-Rubio, M.E., Núñez-González, M.A., Rivera-Guillén, M.A. et al. (2013). Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(2), 24-30.

## FORMULACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN MICRO- Y NANOPARTICULADOS

---

**Brenda Armendáriz-Barragán<sup>1</sup>,  
Rocío Álvarez-Román<sup>2</sup>, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.  
[brenda.armendarizbr@uanl.edu.mx](mailto:brenda.armendarizbr@uanl.edu.mx), [ralvarez@fm.mx](mailto:ralvarez@fm.mx),  
[sergio.galindord@uanl.edu.mx](mailto:sergio.galindord@uanl.edu.mx)

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.338>

Armendáriz-Barragán, B., Álvarez-Román, R., & Galindo-Rodríguez, S.A. (2016). Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 411-436.

## Resumen

Recientemente, los sistemas micro- y nanoparticulados se han utilizado para la protección y la administración de productos naturales. Las propiedades fisicoquímicas de los sistemas particulados permiten la incorporación de compuestos de diversa naturaleza y polaridad (i.e. extractos, aceites esenciales, compuestos aislados). Así mismo, la encapsulación de productos naturales puede reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los compuestos activos. Además, con estos sistemas se puede promover el biodireccionamiento a células, órganos o tejidos blanco afectados por diversos padecimientos. Particularmente, las micropartículas, los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las ciclodextrinas, entre otros sistemas de liberación, han sido aprovechados para la formulación de productos naturales, demostrando en estudios tanto *in vitro*, como *in vivo*, su potencial aplicación para mantener y, en ocasiones, aumentar la actividad biológica de productos naturales. Estas formulaciones podrían ser empleadas en diversas aplicaciones dentro de las áreas farmacéutica, agroquímica, cosmética y de alimentos.

## Palabras clave

Nanopartículas poliméricas, micropartículas, formulación, productos naturales, aceite esencial.

## 12.1. Introducción

El uso de los sistemas de liberación micro- y nanoparticulados en el área farmacéutica y, más específicamente, en la administración de principios activos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se han utilizado para reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos, así como para otorgarles protección. Además, el uso de dichos sistemas permite el biodireccionamiento a células, órganos o tejidos blanco afectados por diversos padecimientos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, estos sistemas permiten la formulación de compuestos biológicamente activos de diversa naturaleza, dentro de los que destacan los productos naturales, tales como extractos de diferentes polaridades, aceites esenciales y compuestos activos aislados.

La encapsulación de principios activos, además de reducir la reactividad de los compuestos con el ambiente (i.e. agua, luz, oxígeno) y disminuir su evaporación o su transferencia hacia el medio ambiente, también permite enmascarar sabores y promover la distribución uniforme de los activos en los productos finales cuando se utilizan en baja concentración.

Particularmente, las micropartículas, los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las ciclodextrinas, entre otros sistemas de liberación, han sido aprovechados para la formulación de productos naturales. Diversas formulaciones han demostrado su potencial aplicación para mantener y, en ocasiones, aumentar la actividad biológica evaluada de productos naturales. Formulaciones con capacidad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, conservadora de alimentos y cosmética han sido desarrolladas y probadas con éxito tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

A lo largo del presente capítulo se abordará de manera puntual cada uno de los sistemas particulados que se han utilizado para la incorporación y formulación de productos naturales, destacando sus propiedades, así como, sus ventajas y desventajas.

## 12.2. Micropartículas

Las micropartículas fueron el principal objetivo de investigación y desarrollo en el área farmacéutica durante los años 80's. Los sistemas microparticulados pue-

den proveer la liberación sostenida y prolongada de principios activos durante un período prolongado de tiempo. Estos sistemas son partículas sólidas (microesferas) o pequeñas gotas de líquido rodeado de una pared constituida por polímeros (microcápsulas) naturales o sintéticos; éstos presentan diferente peso molecular y grado de permeabilidad, permitiendo así la liberación de una cantidad controlada de activo (Figura 1). Las micropartículas tienen un tamaño entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$ , lo cual funcionalmente depende de su aplicación y de la sustancia que incorporen (Joye & McClements, 2014).

Dentro de las principales ventajas que presentan las micropartículas, como formas de liberación de productos naturales, podemos mencionar las siguientes:

- Protección de moléculas inestables y compuestos sensibles al medio biológico en el que se aplican.
- Incremento de la solubilidad, dispersibilidad y fluidez de principios activos.
- Aumento de la vida media del principio activo.
- Enmascaramiento del olor y sabor que pueden presentar los productos naturales.
- Liberación sostenida de los compuestos activos, lo cual permite disminuir el tiempo de administración y el número de dosis.
- Reducción de los efectos secundarios de compuestos biológicamente activos.

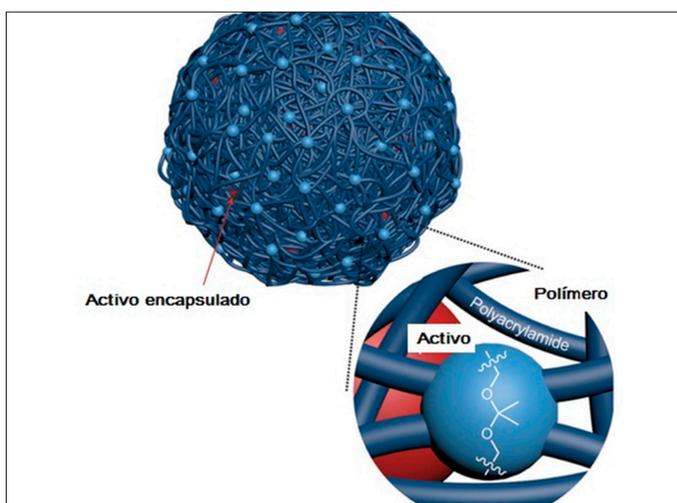


Figura 1. Estructura de una microesfera

En particular, los productos naturales presentan compuestos inestables, los cuales pueden sufrir oxidación, volatilización o pueden reaccionar con otros componentes cuando se tratan de incorporar en una formulación. La microencapsulación es una alternativa factible para incrementar la estabilidad de los productos naturales destinados a la aplicación en humanos o en el medio ambiente (Tiwari et al., 2012).

Los aceites esenciales presentan actividades biológicas que pueden ser aprovechadas en la preparación de productos farmacéuticos, cosméticos, alimenticios y agroquímicos (i.e. biopesticidas). Dichas propiedades biológicas dependen de los compuestos químicos que los constituyen, los cuales dependen a su vez del origen de la planta. Existen numerosos ejemplos de formulaciones elaboradas a partir de aceites esenciales incorporados en micropartículas.

El aceite esencial de citronela es bien conocido por su amplio espectro antimicrobiano. Leimann y col. desarrollaron micropartículas de citronela, obteniendo formulaciones en un rango de tamaño de 10 a 250  $\mu\text{m}$ . Los ensayos de actividad antimicrobiana de las micropartículas cargadas con citronela mostraron mantener la actividad biológica del aceite esencial libre en 22.32 y 2.89 mg/mL contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Si bien, las micropartículas cargadas no aumentaron la actividad antimicrobiana del aceite de citronela, es destacable el hecho de que la actividad de los compuestos presentes en el aceite no fue afectada por el proceso de encapsulación (Leimann, Gonçalves, Machado & Bolzan, 2009).

En otro estudio, considerando la actividad antioxidante que presenta el aceite esencial de orégano, S. B. Da Costa y col. incorporaron el aceite en diferentes microcápsulas elaboradas con almidón de arroz, inulina o gelatina/sucrosa. La formulación elaborada con gelatina/sucrosa exhibió una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana, mientras que las formulaciones de inulina y almidón de arroz presentaron una mayor estabilidad en función del tiempo. Los resultados mostraron que la composición de las micropartículas es un factor determinante para la expresión de la actividad biológica que presentan los aceites esenciales por sí mismos (Beirão da Costa et al., 2012).

El aceite esencial de romero ha sido utilizado para la preservación de alimentos y como medicamento antiséptico o astringente. En particular, el aceite de romero posee una gran cantidad de constituyentes fenólicos, los cuales le confieren un

marcado efecto antioxidante. Así, con el objetivo de encontrar la formulación óptima que permitiera la aplicación del aceite en alimentos, se elaboraron micropartículas a partir de maltodextrina y un concentrado de proteína en distintas proporciones. Los resultados mostraron que una relación 3:1 del concentrado de proteína:maltodextrina fue la que presentaba la mayor eficiencia de encapsulación del aceite (96%). Además, la formulación mostró una alta retención del aceite hasta por 30 d en condiciones de almacenaje (Turasan, Sahin & Sumnu, 2015).

En cuanto a la microencapsulación de extractos naturales, algunos esfuerzos se han centrado en desarrollar formulaciones con un alto contenido de antioxidantes para que puedan ser utilizadas como ingredientes funcionales de alimentos. En este contexto, extractos de chile, nopal y champiñones han sido microencapsulados. Particularmente, el nopal ha sido de gran interés en la industria de alimentos debido a su alto contenido nutrimental y a los diversos colorantes naturales que pueden ser obtenidos a partir de sus extractos. La microencapsulación ha mostrado que puede inhibir el proceso de degradación de las betacianinas y la betalaina (colorantes presentes en el extracto de nopal), lo que presenta la posibilidad de utilizar estas formulaciones como protectores de colorantes naturales en alimentos (Guadarrama-Lezama et al., 2012; Robert, Torres, García, Vergara & Sáenz, 2015; Vergara, Saavedra, Sáenz, García & Robert, 2014).

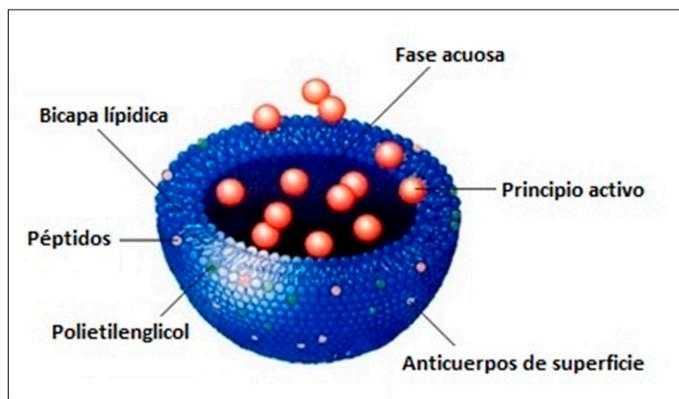
Por otra parte, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos y carotenoides, los extractos obtenidos a partir de chile han mostrado poseer propiedades antimicrobiana, antioxidante y vitamínica. El desarrollo de diversas microcápsulas a partir de dichos extractos, utilizando aceites de maíz, girasol y cártamo, mostró que la retención de la actividad antioxidante variaba del 76 al 80% para los diferentes extractos; además la preservación de los carotenoides en las microcápsulas fue entre 84 y 86% (Peng et al., 2014). En otro estudio, extractos hidroalcohólicos de diversas especies de champiñones fueron evaluados para probar su efecto antioxidante y su viabilidad como ingredientes funcionales de alimentos, particularmente, en queso *cottage*. La incorporación de los extractos resultó en un producto con alta actividad antioxidante que declinó al cabo de siete días. Así mismo, el queso *cottage* adicionado con los extractos microencapsulados mostró una baja actividad antioxidante inicial con un posterior incremento al cabo del séptimo día. Los resultados demostraron no solo la efectiva protección de los extractos otorgada por las micropartículas sino también la liberación controlada de los compuestos activos a partir de este tipo de sistemas (Ribeiro et al., 2015).

El aislamiento de compuestos químicos que presentan actividades biológicas relevantes es otra rama importante en el estudio de los productos naturales. Las micropartículas son sistemas que proporcionan protección y estabilidad a los compuestos aislados. Por ejemplo, extractos obtenidos a partir de granada mostraron tener una alta cantidad de compuestos fenólicos, los cuales podrían ser utilizados para elaborar alimentos funcionales. Cam y col. elaboraron micropartículas cargadas de polifenoles aislados (i.e. punicalagina y ácido elágico) a partir de la cáscara de granada. Las micropartículas presentaron un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  y una eficiencia de encapsulación de 98%, considerando los polifenoles totales presentes. Además, las micropartículas mostraron un mayor contenido de polifenoles después de un almacenamiento de 3 meses, en comparación con formulados de polvos ricos en polifenoles. Con dichos resultados los autores consideraron que la formulación puede ser adicionada a alimentos, como la nieve, para aumentar sus propiedades funcionales, específicamente, la antioxidante y la capacidad inhibitoria de la  $\alpha$ -glicosidasa (Çam, Içyer & Erdoğan, 2014).

En otro estudio, timol obtenido a partir del tomillo se encapsuló con polímeros naturales con el objetivo de enmascarar su sabor y emplearlo como un fármaco herbal a manera de coadyuvante o sustituto de tratamientos en diversas enfermedades. En estudios *in vitro* se determinó que una formulación de timol en micropartículas presentó una vida media corta, pero su biodisponibilidad se incrementó en comparación con el timol libre. Esto sugirió que dichas formulaciones podrían ser utilizadas en el control de enfermedades infecciosas en humanos o animales (Rassu et al., 2014).

### 12.3. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas cuyo centro está ocupado por una cavidad acuosa y cuya envoltura está constituida por un número variable de hojas bimoleculares a base de fosfolípidos (Figura 2). Su diámetro es muy pequeño, cercano o inferior a un micrómetro, lo que les permite ser captados por las células. Utilizados inicialmente como modelos de membrana, los liposomas han sido propuestos, desde hace decenas de años, como vectores intracelulares de fármacos. El uso de los liposomas como sistemas de liberación de principios activos farmacéuticos se basa en sus características y propiedades intrínsecas:



*Figura 2. Estructura de un liposoma*

- Pueden presentar una liberación lenta de los activos, principalmente, debido a su lento perfil de liberación y eliminación renal reducida.
- Es posible la evasión de tejidos específicos, debido a que su patrón de biodistribución puede concentrar al activo en un tejido específicamente sensible al activo liberado.
- Es probable una acumulación en tumores, ya que, al presentar un tiempo de circulación prolongado, los liposomas se pueden acumular en tejidos con permeabilidad vascular, tales como tumores y nódulos linfáticos.

Los liposomas fueron uno de los primeros sistemas particulados utilizados para la dosificación de productos naturales. Comparados con formas de dosificación como las emulsiones, los liposomas exhiben ventajas importantes, como, biocompatibilidad, liberación controlada y tamaño relativamente pequeño. Diferentes formulaciones, con potencial aplicación en alimentos, tratamientos antimicrobianos y productos cosméticos, han sido desarrolladas durante los últimos años. Por ejemplo, la utilización de los carotenoides como ingredientes nutraceuticos está limitada debido a su baja biodisponibilidad asociada a su baja solubilidad y pobre estabilidad fisicoquímica. Así, se han realizado estudios de monitoreo para liposomas cargados de licopeno, luteína,  $\beta$ -caroteno y cantaxantina a través de diferentes medios de digestión artificial. Estos estudios han demostrado que los liposomas son sistemas que pueden proteger y modular la liberación de luteína y  $\beta$ -caroteno durante el proceso de digestión. Debido a este comportamiento, se

ha propuesto a los liposomas para la elaboración de alimentos enriquecidos con carotenos que funcionen como nutraceuticos (Tan et al., 2014).

Así mismo, se han formulado liposomas de fosfolípidos de soya cargados con aceite esencial de clavo con el objetivo de incrementar la estabilidad de uno de sus componentes principales, el eugenol. Primeramente, se realizó la caracterización fisicoquímica de las formulaciones de liposomas. Posteriormente, se realizaron estudios de estabilidad. Después de 2 meses de almacenamiento se encontró que los liposomas protegían al eugenol de la degradación inducida por exposición a radiaciones UV y, además, mantenían la actividad de captación del radical DPPH. Esto indicó que los liposomas constituían un sistema adecuado para la protección y la liberación de constituyentes de aceites esenciales (Sebaaly, Jraj, Fessi, Charcosset & Greige-Gerges, 2015) .

Los liposomas también pueden proveer la protección necesaria contra la oxidación a compuestos con actividad antimicrobiana. Recientemente se elaboraron formulaciones de carvacrol y timol (aislados del orégano) con liposomas constituidos de fosfatidilcolina. La incorporación de éstos en alimentos proporcionó un efecto conservador al inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes o patógenos. En particular, la actividad antimicrobiana de la formulación fue probada contra *Lysteria monocitogenes*, microorganismo contaminante de gran importancia en la industria alimenticia. El timol encapsulado presentó mayor inhibición de *L. monocitogenes* en comparación con el compuesto no encapsulado, indicando que los liposomas de fosfatidilcolina pueden interactuar con la membrana celular de los microorganismos, aumentando la actividad antimicrobiana de compuestos encapsulados (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis & Chinou, 2009).

El extracto etanólico de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz) es rico en glicirrizina, un triterpenoide que ha demostrado tener efectos farmacológicos parecidos a los glucocorticoides, al inhibir el proceso de la inflamación. Liposomas a base de fosfatidilcolina con glicirrizina fueron desarrollados con el objetivo de diseñar una formulación con acción antiinflamatoria para aplicación tópica. Los liposomas presentaron un tamaño menor a 100 nm, con alta estabilidad y con una eficiencia de incorporación elevada del extracto (87%). Las pruebas *in vitro* mostraron estabilidad por tiempo prolongado, con un 80% de inhibición en la captación del radical DPPH y con la capacidad para proteger a los fibroblastos 3T3 contra el estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente, los liposomas cargados estimularon la proliferación y migración de los fibroblastos 3T3, favoreciendo

así la cicatrización de las áreas lesionadas (proceso de repitelización) (Castangia et al., 2015).

Si bien los liposomas presentan ventajas únicas como sistemas de administración para los productos naturales, también presentan efectos de carácter toxicológico. De manera general, los liposomas están caracterizados por poseer una buena inocuidad, pero la presencia de algunos constituyentes pueden presentar cierta toxicidad. La esterilamina, por ejemplo, parece tener cierta toxicidad celular y se ha demostrado que los liposomas pueden provocar la aglutinación de hematíes e incluso hemólisis. Los efectos tóxicos, igualmente, aparecen en ratones después de la inyección intercerebral de liposomas que contienen esterilamina y de fosfato de diacetilo. En cuanto al poder inmunógeno que poseen los liposomas, numerosas investigaciones han demostrado que los liposomas constituidos por esfingomielina son inductores de anticuerpos, al contrario de aquellos que están constituidos por fosfatidilcolina para los cuales la respuesta inmune ha sido baja o nula (Buri, Puisieux, Doelker & Benoit, 1985).

#### 12.4. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NP) son partículas sólidas coloidales con un rango de tamaño que va de 1 a 600 nm. Estos coloides están constituidos por materiales macromoleculares sintéticos o naturales y pueden formar nanocápsulas o nanoesferas, en las cuales el principio activo (fármaco o productos naturales) se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o adherido (Figura 3).

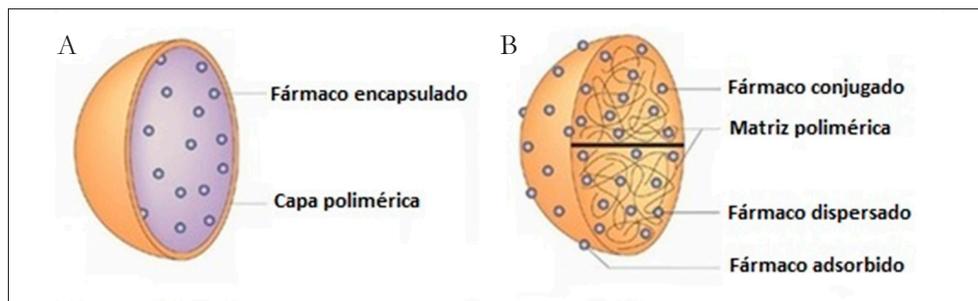


Figura 3. Estructura de los dos tipos de nanopartículas poliméricas: A. Nanocápsula y B. Nanoesfera

Debido a sus características físicoquímicas, las NP han sido consideradas uno de los sistemas más novedosos para la liberación de diversos compuestos activos, entre ellos los productos naturales. Entre las ventajas asociadas a estas características tenemos que:

- Debido a su tamaño nanométrico, comparable con los componentes en células humanas, las NP pueden ser utilizadas para facilitar la interacción con diversos sistemas biológicos (i.e. células cancerígenas, virus, bacterias, células sanguíneas y parásitos).
- Considerando su amplia área superficial, el número de moléculas de activo biológico presentes en la superficie de las NP se incrementa conforme disminuye el tamaño del sistema.
- Considerando su tamaño submicrónico, es fácil mantener a las nanopartículas en suspensión líquida, ya que el efecto de la fuerza gravitacional sobre ellas es muy pequeño. Esto permite tener sistemas más estables, impidiendo su precipitación en la formulación en que se encuentran.
- Por su pared polimérica, las nanopartículas otorgan protección a los principios activos tanto de factores ambientales (i.e. luz, humedad, temperatura) como del entorno biológico en donde se aplican (i.e. enzimas, pH).
- La morfología superficial puede jugar un rol importante en la adhesión del sistema acarreador con el sistema biológico blanco (i.e. célula, tejido), debido a que se incrementan las atracciones de Van der Waals entre ellos. Más allá de esto, la superficie de las nanopartículas puede ser modificada para aumentar o disminuir, según se desee, su interacción con el sistema biológico blanco y, así, hacer más eficiente la actividad del principio activo.

Existen diversos trabajos en los que se han desarrollado formulaciones de NP cargadas de productos naturales, incluyendo aceites esenciales, extractos crudos de plantas y compuestos aislados. Por ejemplo, con la finalidad de incrementar la actividad antimicrobiana que presenta el aceite esencial de canela contra *Phytophthora drechsleri* (fitopatógeno del pepino), Mohammadi y col. desarrollaron nanopartículas de quitosán cargadas con este aceite. La formulación presentó un tamaño de partícula en un rango de 100 a 190 nm, con porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación de 2-17% y 3-4%, respectivamente.

En los estudios de actividad antimicrobiana contra *P. dreschleri*, las NP cargadas con el aceite a una concentración de 1.5 g/L disminuyeron significativamente la incidencia de *P. dreschleri* por un período de 7 d en pepinos inoculados con el patógeno. Además, el aceite encapsulado extendió la vida de anaquel del pepino hasta por 21 d (Mohammadi, Hashemi & Hosseini, 2015). Otras formulaciones similares con actividad antiparasitaria y antimicrobiana se han desarrollado para su aplicación en la industria de alimentos. Aceites esenciales de eucalipto, *Eucalyptus staigeriana* y *E. citriodora*, han sido encapsulados en NP a base de goma de anacardo y evaluados en su actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* y *L. monocytogenes*. En comparación con el aceite libre de *E. staigeriana*, las NP mostraron una mayor actividad antimicrobiana debido al efecto en conjunto entre el aceite y la goma de anacardo. Por su parte, la formulación del aceite de *E. citriodora* en NP de quitosán, con una concentración de 8 mg/mL de aceite, mostró inhibir la eclosión de las larvas del nemátodo *Haemonchus contortus* en un 93%. En ambos estudios, los resultados demostraron que las formulaciones pueden ser utilizadas como aditivos en alimentos para el control de *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *H. contortus* (Herculano, de Paula, de Figueiredo, Dias & Pereira, 2015; Ribeiro et al., 2014).

Las NP también representan una excelente opción para la encapsulación y liberación de compuestos aislados a partir de fuentes naturales. Terpenos aislados de *Ginkgo biloba* han sido encapsulados en NP de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y de polietilenglicol (PEG) para el desarrollo de una formulación intravenosa. Los terpenos mostraron una eficiencia de encapsulación de 79% y se observó una liberación sostenida y sincronizada de los mismos, debido principalmente al largo tiempo de circulación de las nanopartículas (inducido por el polietilenglicol) y por la lenta degradación del PLGA. Dichos resultados mostraron que las NP pueden funcionar como sistemas para la liberación sostenida y sincronizada de múltiples compuestos naturales (Han, Fu, Cole, Liu & Wang, 2012). Otros ejemplos de formulaciones incluyen nanopartículas elaboradas a base de PLGA y compuestos aislados como triterpenoides, grandisina, coumarina y apigenina. Los ensayos *in vitro* mostraron que la nanoencapsulación de los compuestos incrementa la actividad citotóxica de los mismos, lo que sustenta su aplicación como posible terapia anticancerígena (Bhattacharyya et al., 2011; Das, Das, Paul, Samadder & Khuda-Bukhsh, 2014; Das, Das, Samadder, Paul & Khuda-Bukhsh, 2013; Stecanella et al., 2013). Además, Guerrero Barbosa y col. encapsularon la coenzima Q10, una quinona que posee capacidad antioxidante y ha demostrado inhibir la peroxidación de ácidos grasos, con un polímero de

tipo metilacrilato. Aunque no se realizaron ensayos *in vitro*, las formulaciones mostraron eficiencias de encapsulación entre 50 y 90%. Los autores propusieron que debido a sus características (i.e tamaño, encapsulación) estas formulaciones pueden ser utilizadas como una forma de dosificación oral del compuesto activo (Guerrero Barboza et al., 2014).

Particularmente, en años recientes, la aplicación de las NP en el área dermatológica ha adquirido una gran relevancia debido a que pueden liberar activos para que tengan un efecto local o sistémico. En este contexto, Álvarez Román y col., estandarizaron la obtención de formulaciones con carvacrol (antioxidante) en nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona). Posteriormente caracterizaron a las formulaciones dermatocinéticamente en base a estudios *in vitro* de permeación transdérmica. Los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación fueron de 51 y 91%, respectivamente. Los estudios dermatocinéticos mostraron que las nanopartículas penetran las capas más profundas del estrato córneo sin atravesar completamente la piel, lo que impide su llegada al torrente sanguíneo disminuyendo de manera importante los posibles efectos tóxicos y alérgicos de los compuestos encapsulados. La formulación óptima podría utilizarse como tratamiento preventivo contra el cáncer debido a su actividad antioxidante (Álvarez-Román et al., 2011; Cavazos-Rodríguez, 2011).

En otro estudio, el extracto de *Garcinia mangostana* fue incorporado en NP, las cuales posteriormente fueron formuladas en dos vehículos con diferente polaridad (agua y crema). El estudio también incluyó evaluaciones sobre la penetración en piel de cerdo del extracto libre y encapsulado en las NP. Los resultados mostraron que tanto las NP cargadas como el extracto libre incorporados en la crema penetraron más profundamente que si eran aplicados en el vehículo acuoso. Se concluyó que estas formulaciones favorecían la aplicación del extracto de *G. mangostana* en productos cosméticos (Tachaprutinun et al., 2014)

Si bien los extractos crudos obtenidos a partir de plantas representan una fuente importante de tratamientos potenciales para distintas enfermedades, está claro que su complejidad y composición diversa dificulta su aplicación directa en organismos. Aspectos de solubilidad de sus componentes y factores como la sinergia entre los componentes activos han incitado a la búsqueda de sistemas de liberación que permitan el uso de dichas fuentes naturales. Durante la última década, las NP han sido utilizadas para la aplicación de extractos con actividad anticancerígena. Por ejemplo, el extracto de raíz de *Polygala senega* y el extracto de

*G. mangostana* han sido encapsulados en NP, obteniendo resultados prometedores en modelos *in vitro*. La formulación elaborada con PLGA y el extracto de *P. senega* mostró un tamaño de partícula alrededor de 147 nm, el cual potenció la incorporación celular de los componentes del extracto y mejoró su biodisponibilidad en la línea celular A549 de cáncer de pulmón (Paul et al., 2010). Por otra parte, la nanoencapsulación del extracto de *G. mangostana* con etilcelulosa mostró una mayor acumulación e internalización celular en comparación con el extracto libre. Además, cuando se llevaron a cabo estudios *in vitro*, las NP mostraron una actividad anticancerígena efectiva en células HeLa (Pan-In, Wanichwecharunguang, Hanes & Kim, 2014; Tachaprutinun et al., 2014).

Por otro lado, tomando en cuenta sus propiedades antiulcerogénicas, los extractos de *G. mangostana* y *Passiflora serratodigitata* han sido incorporados en sistemas nanoparticulados. En estudios *in vitro* se evaluó su actividad contra *Helicobacter pylori*, mostrando una buena capacidad para combatir la proliferación de la bacteria gástrica y evitar el desarrollo de úlceras y de cáncer de estómago (Marc Strasser, 2014; Pan-in et al., 2014). En el área de alimentos, los extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) han sido nanoencapsulados para el enriquecimiento de sopas instantáneas con el fin de conferir propiedades antioxidantes a este tipo de productos (Deladino, Navarro & Martino, 2013).

Más allá de los ensayos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, debido al gran potencial que representan las NP como sistemas acarreadores de extractos crudos, las últimas tendencias en investigación que se han realizado con las NP incluyen estudios de formulación con diseños factoriales que tienen como objetivo definir las condiciones óptimas para la elaboración de NP a gran escala (Ferreira Ribeiro, Torres Garruth Ferreira, Fernandes dos Santos, Mendes Cabral & Pereira de Sousa, 2015).

En cuanto al estudio de extractos con otras actividades, como por ejemplo pesticidas, Figueroa y col., elaboraron NP a base de Eudragit L100-55 y extractos de *Annona muricata* (guanábana) y evaluaron su actividad en poblaciones de larvas de *Aedes aegypti*, vector transmisor del dengue. Los resultados de los ensayos *in vitro* mostraron que las NP cargadas presentaron hasta un 70% de mortalidad sobre las larvas del vector a una concentración de 60 ppm y una estabilidad de hasta 12 meses. Dicha formulación mostró un gran potencial para ser aplicada como bioinsecticida (Figueroa-Espinoza, 2014).

## 12.5. Nanopartículas sólidas lipídicas

Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) están compuestas de lípidos sólidos y emulsificantes dispersos en un medio acuoso (Figura 4). Pueden ser producidas por homogenización a alta presión y se caracterizan por tener un tamaño de partícula menor a los 500 nm. Estos sistemas también pueden obtenerse por técnicas con solventes orgánicos homogenizados a alta presión/evaporación de solvente o dilución de microemulsiones. Las SLN combinan las ventajas de los acarreadores coloidales, dejando de lado las desventajas de otros sistemas como los liposomas y las NP. Entre de las ventajas del uso de las SLN como acarreadores de principios activos encontramos:

- Posibilidad de controlar la liberación del principio activo y posibilidad de su biodireccionamiento.
- Incremento de la solubilidad de principios activos.
- Gran capacidad de carga de moléculas con actividad biológica.
- Facilidad de incorporar principios activos lipofílicos o hidrofílicos.
- No presentan biotoxicidad.
- No se necesitan, en muchos casos, de solventes orgánicos para su preparación.
- Pocos problemas al momento de producirlas a gran escala o someterlas a esterilización.

Las SLN han sido utilizadas para la incorporación de compuestos lipofílicos aislados de plantas con el objetivo de tratar enfermedades asociadas al estrés

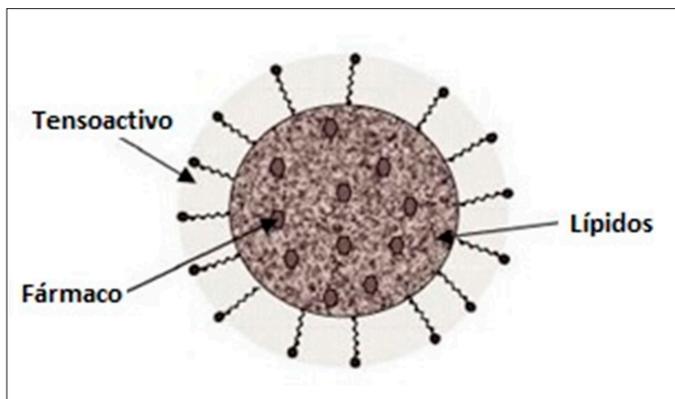


Figura 4. Estructura de una nanopartícula sólida lipídica

oxidativo. Por ejemplo, se estudió la coencapsulación de resveratrol y curcumina en SLN. La formulación mostró un incremento en la fotoestabilidad de los compuestos. Además, las SLN mostraron un perfil de liberación controlada de ambos polifenoles (Coradini et al., 2014). En otro estudio, con el objetivo de incrementar su solubilidad en agua y evitar su volatilización, el eugenol fue incorporado en SLN por un proceso de homogenización, seguido de una etapa de secado por aspersión o por liofilización. La formulación de SLN compuesta de Campitrol<sup>®</sup>, Poloxamer 188 y maltodextrina DE10 presentó una buena retención del eugenol. Además, pudo constatar que la etapa de secado es determinante en la retención de compuestos como el eugenol, ya que la liofilización favoreció su interacción en comparación con el secado por aspersión. Los autores propusieron que este tipo de formulaciones de SLN en forma de polvos pueden facilitar la dosificación de eugenol en productos nutraceuticos durante su preparación (Cortés-Rojas, Souza & Oliveira, 2014).

## 12.6. $\beta$ -Ciclodextrinas

El tipo más común de ciclodextrina es el compuesto conocido como  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), el cual consiste en 7 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) que forman una estructura con una cavidad central. A pesar de que la cavidad es básicamente lipofílica y su superficie exterior es hidrofílica, algunas moléculas de agua pueden incorporarse a la cavidad de las ciclodextrinas hidratadas (Figura 5). La cavidad lipofílica de las moléculas de  $\beta$ -CD provee de un microentorno apropiado para ciertas moléculas que pueden internarse y formar complejos de inclusión.

La principal fuerza impulsora para la formación de complejos  $\beta$ -CD-activos (encapsulación) es el desplazamiento de las moléculas de agua por parte de las moléculas hidrofóbicas dentro de la cavidad, debido a la afinidad del entorno. Al aumentar la cantidad de moléculas hidrofóbicas en la cavidad, la asociación apolar-apolar alcanza un nivel óptimo en el que la tensión del anillo de la CD resulta en un estado de energía menor y, por lo tanto, es más estable. Esta propiedad de la  $\beta$ -CD es, precisamente, la que ha sido ampliamente utilizada en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, para la encapsulación de compuestos como antioxidantes, vitaminas, aceites esenciales y colorantes. En general, se ha buscado incrementar la solubilidad, mejorar su estabilidad y optimizar la liberación de distintos compuestos.

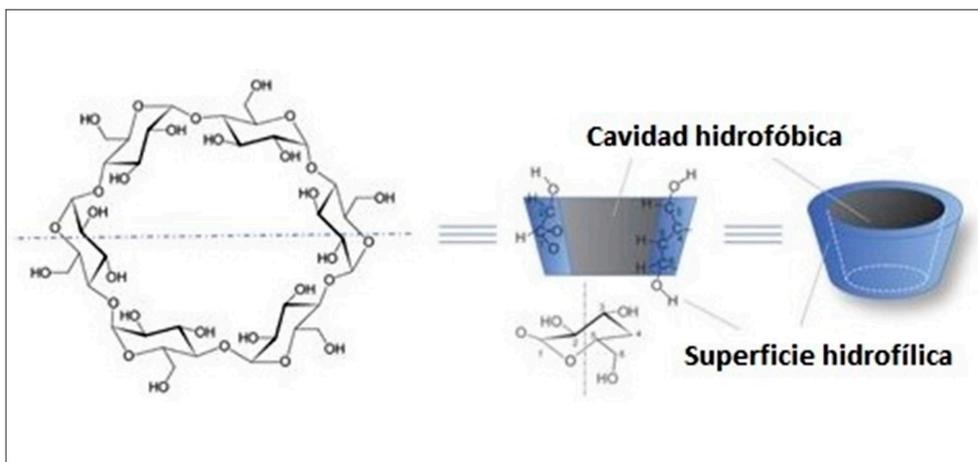


Figura 5. Estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina

En años recientes, la industria de alimentos ha mostrado gran interés en el desarrollo de formulaciones a base de  $\beta$ -CD y compuestos aislados de extractos naturales. Al ser incorporados en sistemas como las  $\beta$ -CD, compuestos como el d-limoneno, timol y *trans*-anetol incrementaron diversas propiedades de los alimentos tales como, la calidad de la mezcla de los alimentos, la actividad antimicrobiana, el sabor, la solubilidad y la estabilidad (Fang, Comino & Bhandari, 2013; Kfoury, Auezova, Greige-Gerges, Ruellan & Fourmentin, 2014; Tao, Hill, Peng & Gomes, 2014).

Aceites esenciales también han sido incorporados en  $\beta$ -CD. Por ejemplo, los aceites esenciales de alba y estragón, los cuales son ricos en estragol, se encapsularon en diversos tipos de CD ( $\alpha$ ,  $\beta$  y metilada al azar). Los resultados mostraron que este tipo de sistemas proporcionan una liberación controlada del estragol, así como un incremento en la actividad de captación del radical DPPH y la fotoestabilidad del compuesto incorporado en las CD. Estas formulaciones pueden ser utilizadas en aromaterapia, cosmética y alimentos (Kfoury, Auezova, Ruellan, Greige-Gerges & Fourmentin, 2015). Por otra parte, aceites esenciales de canela, ricos en cinamaldehído y timol, han sido incorporados en estos sistemas y se ha comprobado que pueden mejorar la estabilidad de ambos compuestos en condiciones de almacenamiento menores a 84% de humedad relativa y una temperatura de 25 °C (Ponce-Cevallos, Buera & Elizalde, 2010).

## 12.7. Otros Sistemas de Liberación Nanoparticulados

### 12.7.1. Nanoemulsiones

Estos sistemas son dispersiones líquidas termodinámicamente estables compuestas de aceite, agua y surfactante, con un tamaño de glóbulo entre 20 y 200 nm. Las nanoemulsiones son preparadas para incrementar la solubilidad de activos farmacéuticos en sistemas acuosos y para proporcionar una liberación controlada del activo en su sitio de aplicación. En este contexto, compuestos como la azadiractina (extraída de *Azadirachta indica*, neem) o aceites esenciales obtenidos de *Cuminum cyminum* han sido incorporados en nanoemulsiones, proporcionando la liberación controlada de los compuestos activos e incrementando la actividad biológica de los mismos (i.e. antioxidante y hepatoprotectora) (Jerobin, Sureshkumar, Anjali, Mukherjee & Chandrasekaran, 2012; Mostafa et al., 2015).

### 12.7.2. Micro/nanocomplejos

Con el objetivo de disminuir la susceptibilidad de los productos naturales e incrementar su estabilidad durante el proceso de almacenamiento, la encapsulación en micro/nanocomplejos ha sido aplicada recientemente en la industria de alimentos y nutracéuticos. Dependiendo de la naturaleza del polímero que se utilice, estos sistemas pueden ofrecer mayor adherencia a la superficie de la mucosa intestinal, además de protección y liberación controlada de sustancias naturales activas. Por ejemplo, al ser evaluados *in vitro*, complejos elaborados a base de quitosán y  $\alpha$ -tocoferol mostraron una liberación controlada y mayor protección de este compuesto activo en fluido intestinal simulado (Luo, Zhang, Whent, Yu & Wang, 2011). En otro estudio, complejos de alginato o quitosán con aceite esencial de eucalipto presentaron eficiencia de encapsulación entre 90 y 92%, además de una liberación sostenida del aceite (Chang & Dobashi, 2003; Ribeiro et al., 2013).

### 12.7.3. Nanogeles

Los nanogeles son partículas nanométricas formadas por redes de polímero que se encuentran entrecruzadas, física o químicamente, y que tienden a hincharse cuando interactúan con un buen solvente. Los nanogeles son considerados sis-

temas con mucho potencial debido a su alta capacidad de carga del activo, alta estabilidad y sus propiedades de liberación. Nanogeles elaborados a partir de quitosán y aceite esencial de *Mentha piperita*, rico en ácido cinámico, han sido desarrollados para el control de *Aspergillus flavus*, mostrando que la incorporación del producto natural en el sistema mantiene e incrementa la actividad antifúngica del mismo (Beyki et al., 2014).

#### 12.7.4. Niosomas

Los niosomas son autoensamblajes vesiculares de surfactantes no iónicos, los cuales son parecidos a los liposomas en su arquitectura y pueden ser utilizados como una alternativa efectiva a los sistemas liposomales debido a su bajo costo, gran estabilidad, facilidad de almacenaje y factibilidad de producción a escala industrial. Un ejemplo de este tipo de sistemas de liberación se desarrolló usando antioxidantes, como el ácido gálico (AG), curcumina (CU), ácido ascórbico (AA) y quercetina (QC), y Tween 60. Las formulaciones mostraron que la coencapsulación de AG/CU y AA/QC influyen en las características químicas y eficiencias de encapsulación de los activos con respecto a las formulaciones simples de cada uno de los antioxidantes. Además, aparentemente, los antioxidantes encapsulados presentaron un incremento en su capacidad para reducir radicales libres, lo cual podría haberse debido a un efecto sinérgico (Tavano, Muzzalupo, Picci & De Cindio, 2014).

### 12.8. Conclusión

En los últimos años se han desarrollado diversas formulaciones a base de sistemas particulados, por ejemplo, micropartículas, liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas,  $\beta$ -ciclodextrinas, entre otros, y productos naturales como aceites esenciales, extractos de distintas polaridades y compuestos aislados. Dichas formulaciones presentan características fisicoquímicas especiales, las cuales permiten la aplicación de los productos naturales de una manera más eficiente y segura en comparación con las formas convencionales de administración. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* obtenidos en numerosas investigaciones sustentan el gran potencial que tienen los sistemas particulados para ser utilizados en la formulación de componentes activos de origen natural. Estas formulaciones podrían ser empleadas en diversas aplicaciones industriales incluyendo la alimentaria, la farmacéutica, la agroquímica y la cosmética.

## Referencias

- Álvarez-Román, R., Cavazos-Rodriguez, M.R., Chávez-Montes, A., Castro-Rios, R., Waksman de Torres, N., Salazar-Cavazos, M.L. et al. (2011). Formulacion y caracterizacion de nanocapsulas con antioxidante natural para su aplicación cutánea. *Química Hoy Chemistry Sciences*, 1(4), 29-35.
- Beirão da Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Serra, A.T., Moldão Martins, M. et al. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and *in vitro* bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 190-199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043>
- Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M. et al. (2014). Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 54, 310-319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Bhattacharyya, S.S., Paul, S., De, A., Das, D., Samadder, A., Boujedaini, N. et al. (2011). Poly (lactide-co-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: Cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(3), 270-281. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.010>
- Buri, P., Puisieux, F., Doelker, E., & Benoit, J.P. (1985). *Formes pharmaceutiques nouvelles: aspects technologique, biopharmaceutique et médical*. Paris, Fr: Lavoisier Tec & Doc.
- Çam, M., İçyer, N.C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 117-123. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>
- Castangia, I., Caddeo, C., Manca, M.L., Casu, L., Latorre, A.C., Díez-Sales, O. et al. (2015). Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries. *Carbohydrate Polymers*, 134, 657-663. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.037>

- Cavazos-Rodríguez M.R. (2011). *Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica*. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Chang, C.P., & Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257-262. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.07.002>
- Coradini, K., Lima, F.O., Oliveira, C.M., Chaves, P.S., Athayde, M.L., Carvalho, L.M., & Beck, R.C.R. (2014). Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 178-185. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.04.009>
- Cortés-Rojas, D.F., Souza, C.R.F., & Oliveira, W.P. (2014). Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. *Journal of Food Engineering*, 127, 34-42. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.027>
- Das, J., Das, S., Paul, A., Samadder, A., & Khuda-Bukhsh, A.R. (2014). Strong Anticancer Potential of Nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 Adenocarcinoma via a Ca<sup>2+</sup>-dependent Mitochondrial Apoptotic Pathway. *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(3), 140-150. <http://doi.org/10.1016/j.jams.2013.07.009>
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Paul, A., & Khuda-Bukhsh, A.R. (2013). Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo[a]pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: Mitochondria mediated apoptotic signalling cascades. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 670-680. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.037>
- Deladino, L., Navarro, A.S., & Martino, M.N. (2013). Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 163-169. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.030>
- Fang, Z., Comino, P.R., & Bhandari, B. (2013). Effect of encapsulation of d-limonene on the moisture adsorption property of  $\beta$ -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 164-169. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.016>

- Ferreira-Ribeiro, A., Torres-Garruth-Ferreira, C., Fernandes dos Santos, J., Mendes-Cabral, L., & Pereira de Sousa, V. (2015). Design of experiments for the development of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa*. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2). <http://doi.org/10.1007/s11051-015-2883-y>
- Figuroa-Espinoza, A. (2014). *Incorporación de extractos de semillas de Anona muricata L (Annonaceae) en nanopartículas poliméricas para su uso en el control de Aedes aegypti L (Diptera: Culicidae)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Guadarrama-Lezama, A.Y., Dorantes-Alvarez, L., Jaramillo-Flores, M.E., Pérez-Alonso, C., Niranjani, K., Gutiérrez-López, G.F. et al. (2012). Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annuum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112(1-2), 29-37. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.032>
- Guerrero-Barboza, A., Álvarez-Román, R., Perales-Flores, J.D., Barajas-Aguilar, N.C., Ramirez-González, E., & Galindo-Rodríguez, S.A. (2014). Nanopartículas poliméricas no biodegradables cargadas con CoQ10 para su potencial administración oral. *Química Hoy Chemistry Sciences*, 4(3), 1-5.
- Han, L., Fu, Y., Cole, A. J., Liu, J., & Wang, J. (2012). Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. *Fitoterapia*, 83(4), 721-731. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.02.014>
- Herculano, E.D., de Paula, H.C.B., de Figueiredo, E.A.T., Dias, F.G.B., & Pereira, V.D.A. (2015). Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 484-491. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.001>
- Jerobin, J., Sureshkumar, R.S., Anjali, C.H., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2012). Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1750-1756. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.064>
- Joye, I.J., & McClements, D.J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and micro-particles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(5), 417-427. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>

- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., & Fourmentin, S. (2014). Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chemistry*, 164, 454-461. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.052>
- Kfoury, M., Auezova, L., Ruellan, S., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156-164. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.073>
- Leimann, F.V., Gonçalves, O.H., Machado, R.A.F., & Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 430-436. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.025>
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77-83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L.L., & Wang, Q. (2011). Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145-152. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.020>
- Marc-Strasser, P.N. (2014). Antiulcerogenic Potential Activity of Free and Nanoencapsulated *Passiflora serratodigitata* L. Extracts. *BioMed research international*, 2014(1), 434067. <http://doi.org/10.1155/2014/434067>
- Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S.M. (2015). Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 203-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.019>
- Mostafa, D.M., Kassem, A.A., Asfour, M.H., Al Okbi, S.Y., Mohamed, D.A., & Hamed, T.E.S. (2015). Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: In-vitro and in-vivo eva-

- uation. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 6-15. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.08.047>
- Pan-In, P., Tachapruetinun, A., Chaichanawongsaroj, N., Banlunara, W., Suk-samrarn, S., & Wanichwecharungruang, S. (2014). Combating Helicobacter pylori infections with mucoadhesive nanoparticles loaded with *Garcinia mangostana* extract. *Nanomedicine (London, England)*, 9(3), 457-468. <http://doi.org/10.2217/nnm.13.30>
- Pan-In, P., Wanichwecharungruang, S., Hanes, J., & Kim, A.J. (2014). Cellular trafficking and anticancer activity of *Garcinia mangostana* extract-encapsulated polymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 3677-3686. <http://doi.org/10.2147/IJN.S66511>
- Paul, S., Bhattacharyya, S.S., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R., Paul, S., Bhattacharyya, S.S. et al. (2010). Anticancer Potentials of Root Extract of *Polygala senega* and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form, Anticancer Potentials of Root Extract of *Polygala senega* and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, e517204. <http://doi.org/10.1155/2011/517204>, [10.1155/2011/517204](http://doi.org/10.1155/2011/517204)
- Peng, C., Zhao, S.-Q., Zhang, J., Huang, G.-Y., Chen, L.-Y., & Zhao, F.-Y. (2014). Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, 165, 560-568. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>
- Ponce Cevallos, P.A., Buera, M.P., & Elizalde, B.E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 70-75. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039>
- Rassu, G., Nieddu, M., Bosì, P., Trevisi, P., Colombo, M., Priori, D. et al. (2014). Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. *Phytomedicine*, 21(12), 1627-1632. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.017>

- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J.C., Dias, M.M., Barros, L., Barreiro, F. et al. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612-618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061>
- Ribeiro, J.C., Ribeiro, W.L.C., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Macedo, I.T.F., Santos, J.M.L., Paula, H. C. B. et al. (2014). Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 243-248. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.026>
- Ribeiro, W.L.C., Macedo, I.T.F., dos Santos, J.M.L., de Oliveira, E.F., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., de Paula, H.C.B. et al. (2013). Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 135(1), 24-29. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.014>
- Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., & Sáenz, C. (2015). The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2, Part 1), 1039-1045. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.038>
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52-62. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>
- Stecanella, L.A., Taveira, S.F., Marreto, R.N., Valadares, M.C., Vieira, M. de S., Kato, M.J. et al. (2013). Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: *In vitro* release and cytotoxicity studies. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(1), 153-159. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000128>
- Tachaprutinun, A., Meinke, M.C., Richter, H., Pan-In, P., Wanichwecharunguang, S., Knorr, F. et al. (2014). Comparison of the skin penetration of *Garcinia mangostana* extract in particulate and non-particulate form. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 307-313. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.001>

- Tan, C., Zhang, Y., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X., & Xia, S. (2014). Modulation of the carotenoid bioaccessibility through liposomal encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 692-700. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.011>
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., & Gomes, C.L. (2014). Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 247-255. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037>
- Tavano, L., Muzzalupo, R., Picci, N., & De Cindio, B. (2014). Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 82-88. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.058>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. et al. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2-11. <http://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 112-119. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.036>
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., & Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157, 246-251. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.037>

Este libro está dirigido a estudiantes, investigadores, profesionales e interesados en productos naturales y del sector salud. Ofrece protocolos para la investigación de plantas de la Medicina Tradicional con el objetivo de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes y encontrar el/los principios bioactivos. Ya que más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales químicamente modificados. Solamente del 5-15% de aproximadamente 250.000 plantas de uso medicinal se han investigado con este fin; esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos. Este documento nos brinda un panorama general sobre la investigación de las plantas para la solución de problemas de salud, por lo que se presentan técnicas *in vivo* e *in vitro* para llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica, así como formulaciones para la aplicación eficiente y segura de extractos y compuestos activos y tomando en cuenta la sustentabilidad incluyendo métodos de Cultivo de Tejidos Vegetales.