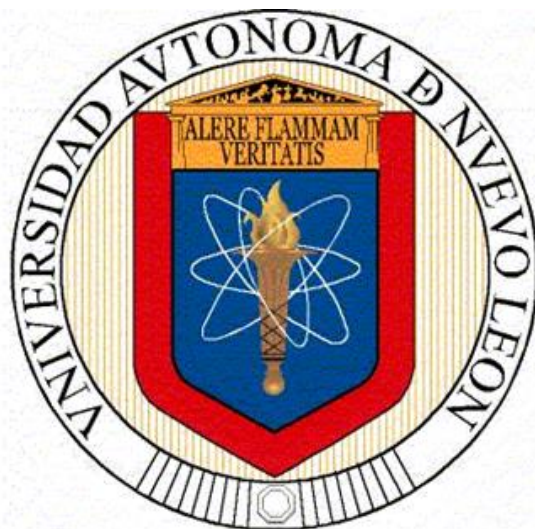


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS
DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

POR

Q.B.P. OSCAR ALBERTO PÉREZ NARVÁEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA**

ENERO, 2018

Efecto antioxidante y citoprotector de extractos
de plantas con actividad antimicrobiana.

Comité de Tesis




Dr. Eduardo Sánchez García

Presidente



Dra. Catalina Leos Rivas

Secretario



Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal



Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal



Dra. María Porfiria Barrón González

Vocal

Efecto antioxidante y citoprotector de extractos
de plantas con actividad antimicrobiana

Dirección de Tesis



Dr. Eduardo Sánchez García

Director



Dra. Ledy E. García Becerra

Director externo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme continuar con mis estudios para prepararme de la mejor manera gracias al trabajo y esfuerzo de sus doctores, profesores y académicos, así como de sus instalaciones y laboratorios.

Al Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca No. 745689 para el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Sánchez García por darme la oportunidad de trabajar y desarrollarme en el laboratorio con toda la libertad y confianza durante la maestría, por el apoyo, los consejos, el tiempo, dirección, y por el equipo y material conseguido por su dedicación y esfuerzo para que los proyectos de investigación sean un éxito con el fin de que siga avanzando la ciencia en beneficio de la sociedad y de los que trabajan para la misma. Gracias por ser el director de mi tesis, muy agradecido.

A la Dra. Catalina Leos Rivas y a la Dra. Catalina Rivas Morales por su confianza al permitirme trabajar con toda libertad y respeto en mis actividades en el laboratorio de Química Analítica; por su gran apoyo, consejos y amabilidad. Excelentes doctoras y personas. Muchas gracias.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño y Dra. María Porfiria Barrón González por su apoyo, consejos, correcciones, ayuda, disponibilidad y amabilidad, gracias por ser parte de este esfuerzo, muchas gracias.

A la Dra. Ledy E. García Becerra por el apoyo, enseñanza, tiempo y por ser parte del comité de Tesis como asesora externa, muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada para el desarrollo de este trabajo. Muy agradecido.

Gracias al Maestro Sergio García González por su apoyo, consejos, ayuda, enseñanza, experiencia, confianza y respeto, gracias también por el tiempo tan agradable y ameno, es una excelente persona. Muchas gracias.

Gracias al MC David Alejandro Hernández Marín por su enseñanza, tiempo, dirección, sugerencias, consejos y experiencia en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo, gracias.

Gracias a Alex, Tere, Tania, Luis, Joel, Aria, Roger, Andrea, Raymundo, Karla, Damaris, Karla e Ivonne de fito y especialmente a Jessy y Mizaél por las cepas y a todos por ser un buen equipo de trabajo, también a los doctores y compañeros del otro lado del laboratorio, mi más sincero agradecimiento por el apoyo y la ayuda, muchas gracias.

Muchas gracias al Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, a todos los doctores que nos impartieron clases, muy agradecido por sus enseñanzas, apoyo y tiempo; y a los amigos y compañeros de la maestría, en especial a los de Microbiología, por todo este tiempo compartido de esfuerzo, dedicación y desveladas, pero sobre todo de amistad y convivencia, de respeto, paciencia y perdón por los errores cometidos por su servidor. ETERNAMENTE AGRADECIDO.

DEDICATORIA

Agradezco al ETERNO por la vida, las bendiciones y la ayuda. BARUJ HaSHEM.

A mi esposa Mariana Cuesy León:

Por su amor, apoyo, amistad, paciencia y ayuda durante todo este tiempo, te amo.

A mis padres Severiano Pérez Pérez y Araceli Narváez Rivera:

Por su amor y apoyo incondicional, por ser mis mejores amigos en la vida, los amo.

A la familia:

Por el amor que me han brindado.

A mis amigos:

Porque son mi familia, por su amistad cercana y a distancia; por todas las experiencias.

A mis gatitos:

Porque son un motor de amor y alegría, de recuerdos y melancolía, los amo.

Necesito de su amor y de su comprensión,

En los días buenos y en los malos.

Siempre los he tenido presentes,

Todos los días de mi vida.

Eternamente agradecido,

Ronroneando mi corazón.

ÍNDICE

	TÍTULO	PÁGINA
	RESUMEN	i
	ABSTRACT	ii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
	2.1. Actividad antimicrobiana.	3
	2.2. Antioxidante.	4
	2.3. Citotoxicidad.	5
	2.4. Efecto citoprotector.	6
	2.5. Plantas utilizada en este estudio.	8
	2.5.1. <i>Arbutus xalapensis</i> Kunt.	8
	2.5.1. <i>Mimosa malacophylla</i> Gray.	10
	2.5.1. <i>Teucrium cubense</i> Jacquin.	11
3.	JUSTIFICACIÓN	13
4.	HIPÓTESIS	14
5.	OBJETIVOS	15
6.	MATERIAL Y MÉTODO	16
	6.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	16
	6.2. Material vegetal.	16
	6.3. Obtención de los extractos etanólicos.	16
	6.3.1. Rendimiento del extracto.	17
	6.4. Evaluación de actividad antimicrobiana.	17
	6.4.1. Evaluación preliminar.	17
	6.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida.	18
	6.5. Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH.	18
	6.6. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS ^{•+} .	19
	6.7. Capacidad citoprotectora.	20
	6.7.1. Evaluación de la toxicidad preliminar mediante hemólisis.	20
	6.7.2. Citoprotección de extractos no hemolíticos mediante AAPH.	21

6.8. Tamizaje fitoquímico preliminar.	22
6.9. Análisis estadístico	24
7. RESULTADOS	25
7.1. Obtención de extractos y su rendimiento.	25
7.2. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana.	25
7.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB).	26
7.4. Capacidad antioxidante.	26
7.5. Citotoxicidad preliminar.	28
7.6. Citoprotección.	28
7.7. Tamizaje fitoquímico preliminar.	29
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Plantas utilizadas en el estudio.	16
2	Extractos etanólicos obtenidos de las plantas con actividad antimicrobiana.	25
3	Rendimiento porcentual de los extractos etanólicos.	25
4	Halos de inhibición (mm) de los extractos evaluados.	26
5	CMI y CMB (mg/mL) de los extractos seleccionados.	26
6	Metabolitos o grupos funcionales presentes en los extractos.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	<i>Arbutus xalapensis</i> Kunth.	9
2	<i>Mimosa malacophylla</i> Gray.	10
3	<i>Teucrium cubense</i> Jacquin.	11
4	Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH.	27
5	Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical ABTS ^{•+} .	27
6	Comparación del porcentaje de hemólisis entre los extractos.	28
7	Comparación del porcentaje de citoprotección entre los extractos.	29

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

2,4-DFNH	Dinitrofenilhidrazina
AAPH	2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato
ABTS	2,2-Azino-bi-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico
ACE	Extracto acuoso de <i>Chamomilla recutita</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Ax-h	Hoja de <i>Arbutus xalapensis</i>
Ax-t	Tallo de <i>A. xalapensis</i>
Bi(NO ₃) ₃	Nitrato de bismuto
BuOH	Butanol
C ₆ H ₃ B ₃ O ₇	Ácido pícrico
CHCl ₃	Cloroformo
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COX	Ciclo de oxigenasa
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DPPH	1,1-difenil 2-picrilhidracil
ET	Equivalentes de Trolox
EtOH	Etanol
FeCl ₃	Cloruro férrico
H ₂ O ₂	Agua oxigenada o Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
KI ₃	Yoduro de potasio
KMNO ₄	Permanganato de potasio
MetOH	Metanol
MH	Mueller-Hinton

MM	Método de extracción por maceración
Mm-h	Hoja de <i>Mimosa malacophylla</i>
Mm-t	Tallo de <i>M. malacophylla</i>
MS	Método de extracción por Soxhlet
MTT	3-(4,5-dimeriltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
Na ₂ S ₂ O ₄	Hidrosulfito de sodio
NADP	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
R [•]	Radical alquilo
ROO [•]	Radicales peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCR	Suspensión de células rojas
SiO ₂	Óxido de silicio
Tc-h	Hoja de <i>Teucrium cubense</i>
Tc-r	Raíz de <i>T. cubense</i>
Tc-t	Tallo de <i>T. cubense</i>
TEAC	Antioxidante equivalente a Trolox ^{MR}

RESUMEN

Los productos naturales son importantes a nivel mundial ya que son utilizados por sus propiedades en diferentes ámbitos como el farmacéutico, alimentario, etc. Por otro lado, el uso indiscriminado de antibióticos ha hecho que los microorganismos causantes de infecciones en seres humanos generen resistencia haciendo difícil combatir dichas enfermedades, por lo que es vital desarrollar nuevas terapias antimicrobianas. En los últimos años se ha incrementado el interés en los efectos benéficos de gran variedad de productos de origen natural, no solo por las propiedades antimicrobianas sino también por los efectos antioxidantes y citoprotectores, entre otros. En el presente trabajo se determinaron propiedades antimicrobianas, antioxidantes y citoprotectoras en las plantas colectadas en el municipio de Santiago, Nuevo León, México; obteniendo extractos etanólicos crudos de hoja, tallo y raíz (en su caso) de *A. xalapensis*, *M. malacophylla* y *T. cubense* los cuales fueron probados contra cepas de importancia nosocomial: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*; observándose mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* obteniendo una CMB de 2.6 ± 0.3 mg/mL y 2.9 ± 0.5 mg/mL de los extractos de tallo y hoja de *A. xalapensis* respectivamente, además fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante mediante los métodos de DPPH de $1,112.1 \pm 70.6$ μ moles ET/g y $1,206.6 \pm 68.6$ μ moles ET/g respectivamente y ABTS^{•+} de $1,864.0 \pm 135.6$ μ moles ET/g y $1,750.7 \pm 110.1$ μ moles ET/g respectivamente. Ningún extracto de los seleccionados por su buena actividad antimicrobiana y antioxidante presentó actividad hemolítica significativa, observándose el valor más alto de 3.1 ± 0.4 % en el de tallo de *A. xalapensis* a una concentración de 1,000 ppm; mientras que la capacidad citoprotectora de este extracto para eritrocitos humanos contra la hemólisis inducida por AAPH estuvo de manifiesto con un 98.5 ± 0.9 % a una concentración de 400 ppm, siendo a esa concentración la mayor actividad protectora que presentaron los extractos de hoja de *A. xalapensis*, y de hoja, tallo y raíz de *T. cubense*. En base a los resultados obtenidos de los extractos de tallo y hoja de *A. xalapensis*, se recomienda continuar con estudios posteriores contra otros microorganismos de importancia médica, líneas celulares y modelos animales; así como el aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos con la finalidad de su posible utilización como fármacos en beneficio para el ser humano.

ABSTRACT

Natural products are important around the world because they are used for their properties in different areas such as pharmacist, food, etc. Furthermore, indiscriminate use of antibiotics has induced microorganisms cause infections in humans generate resistance making it difficult to control such diseases, so it's vital to develop new antimicrobial therapies. In recent years, interest in beneficial effects of a great variety of products of natural origin has increased, not only for antimicrobial properties but also antioxidant and cytoprotective effects, among others. In the present study, antimicrobial, antioxidant and cytoprotective properties were evaluated in plants collected in municipality of Santiago, Nuevo León, Mexico; obtaining the leaf, stem and root (if any) ethanol extracts of *A. xalapensis*, *M. malacophylla* and *T. cubense* against strains of nosocomial importance such as *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*; the greatest antimicrobial activity against *S. aureus* were the *A. xalapensis* stem and leaf extracts, MBC of 2.6 ± 0.3 mg/mL and 2.9 ± 0.5 mg/mL respectively, and the highest antioxidant activity by the methods of DPPH ($1,112.1 \pm 70.6$ μ mol ET/g $1,206.6 \pm 68.6$ μ mol ET/g respectively) and ABTS⁺ ($1,864.0 \pm 135.6$ μ mol ET/g 1750.7 ± 110.1 μ mol ET/g respectively). Those extracts selected in this study, for their good antimicrobial and antioxidant activity were not hemolytic, the highest value was 3.1 ± 0.4 % of *A. xalapensis* stem at a 1,000 ppm of concentration; while cytoprotective capacity of this extract for human erythrocytes against AAPH-induced hemolysis was $98.5 \pm 0.9\%$ at 400 ppm of concentration, being to that concentration the best protective activity (100%) presented by the *A. xalapensis* leaf extract, and the *T. cubense* leaf, stem and root extracts. The results obtained suggest the extracts of stem and leaf of *A. xalapensis* for further studies against other microorganisms of medical importance, in cell lines and animal models, as well as for the isolation and identification of the active compounds in order to establish the principles for its possible use as beneficial drugs for the human.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son de gran importancia en todo el mundo a nivel industrial, médico, farmacéutico y alimentario. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población en vías de desarrollo utiliza la medicina tradicional para cubrir sus necesidades primarias de salud. Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés hacia los productos naturales y sus posibles usos en la industria farmacéutica, debido a que son posible fuente de nuevos medicamentos que sean más seguros y eficaces; ya que alrededor del 30% de los fármacos utilizados en países industrializados proceden o se han sintetizado a partir de productos vegetales, por lo que los extractos de plantas son una fuente interesante de nuevos medicamentos (Vega et al. 2013; Yáñez 2014; Contreras 2015).

Esto es puesto de manifiesto en investigaciones científicas de plantas medicinales y comestibles, además se ha observado que los efectos benéficos reportados podrían atribuirse a la presencia de compuestos químicos o sustancias que son biológicamente activas llamados fitoquímicos. Su estudio ha demostrado que los principios activos de algunos especímenes resultan ser mucho más eficaces que los compuestos sintéticos, además son químicamente biodegradables y de bajo impacto ambiental; por otro lado, muchos de los metabolitos obtenidos para su estudio no presentan efectos secundarios sobre el organismo, ya que en la mayoría de los casos, al utilizar las dosis adecuadas no presentan toxicidad, es por esto y por la gran diversidad de plantas con las que cuenta México, que los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana son un campo relevante de investigación (García et al. 2010; Madrigal et al. 2014; Contreras 2015).

Por otro lado, los antioxidantes que se encuentran en las plantas tienen la propiedad de participar en el control del estrés oxidativo que afecta a sistemas biológicos que han sido sometidos a una prolongada exposición a agentes oxidantes como: la radiación (UV, γ), la alimentación, diversos contaminantes, drogas, toxinas, productos del metabolismo, y procesos isquémicos entre otros. Por lo antes mencionado los productos naturales pueden servir de fuente para la obtención de compuestos antioxidantes que tengan efectos benéficos como los antiinflamatorios y antitumorales, ya que diferentes

estudios e investigadores están de acuerdo en que los efectos anticancerosos de los compuestos bioactivos se debe parcialmente a su capacidad de contrarrestar, reducir y también reparar el daño causado por el estrés oxidativo y la inflamación (Kohen y Nyska 2002; Enciso et al. 2010; Madrigal-Santillán et al. 2012; Contreras 2015).

Los compuestos fenólicos como los taninos, flavonoides y algunos terpenos, actúan como antioxidantes, infiriendo así un efecto citoprotector; con respecto a esto, los compuestos fenólicos aislados de diversas plantas han mostrado efecto gastroprotector, antisecretor, antiinflamatorio e inhibidor de la migración de las células inflamatorias además de actividad inhibitoria de radicales libres (Ancheta y Guzman 2011). Moléculas como la quercetina, que presenta propiedades antioxidantes, se le han atribuido efectos citoprotectores como: hepatoprotector, cardioprotector y neuroprotector, por lo que puede reducir el riesgo de enfermedades asociadas a hígado, corazón o sistema nervioso (Maalik et al. 2014).

En México, el uso y conocimiento de plantas medicinales se desarrolló en las culturas prehispánicas debido principalmente a 3 razones: 1) la atención a sus enfermedades, 2) la extensa flora, 3) la amplitud en número de grupos indígenas que conservan sus propias tradiciones (Castro et al. 2014).

En el presente estudio se determinaron las propiedades antimicrobianas de los extractos etanólicos de hoja, tallo y raíz (en su caso) de las plantas *Arbutus xalapensis*, *Mimosa malacophylla* y *Teucrium cubense* por medio de la técnica de difusión en pozo en agar y el método de dilución en microplaca de 96 pozos contra microorganismos de importancia nosocomial; se realizó la cuantificación de su capacidad antioxidante con los métodos 1,1-difenil 2-picrilhidracil (DPPH) y 2,2-Azino-bi-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico (ABTS⁺⁺); se evaluó su toxicidad preliminar de los extractos que presentaron buena actividad antimicrobiana y antioxidante mediante la prueba de hemólisis; y se determinó su efecto citoprotector utilizando el método 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) diclorhidrato (AAPH); todo con la finalidad de incrementar el conocimiento científico sobre las propiedades benéficas de dichas plantas y establecer los principios para su posible utilización como fármacos benéficos para el ser humano.

2. ANTECEDENTES

2.1. Actividad antimicrobiana

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal son eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas y al mismo tiempo pueden mitigar muchos de los efectos secundarios que se asocian a menudo con antimicrobianos sintéticos (Yáñez 2014).

La actividad antimicrobiana de productos provenientes de las plantas tiene un enorme potencial terapéutico, dicho efecto es atribuido a la presencia de compuestos fitoquímicos como los fenoles, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, entre otros. Los cuales pueden actuar como reguladores del metabolismo intermedio, activar o bloquear reacciones enzimáticas, afectar directamente una síntesis enzimática o alterar estructuras de membrana (De Saravia et al. 2012).

Dentro de los metabolitos encontrados en plantas están los flavonoides que son metabolitos secundarios de tipo fenólico, entre los que se incluyen flavanonas, flavanonoles, flavonas y flavonoles entre otros, con actividad farmacológica variada entre las que destacan: antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmódica, antimicrobiana, citoprotectora, analgésica, antiespasmódica (Aguilar 2014).

Yáñez 2014 determinó que los extractos de paico, tomillo, matico, ortiga, hierba luisa, albahaca, ambo y guayaba, poseen actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* y también encontraron que los extractos vegetales que presentaron mayor cantidad de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de estos dos microorganismos fueron los extractos etanólicos de paico y tomillo.

La actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales de *Piper auritum*, una planta aromática tropical, se debe a la presencia de terpenoides, fundamentalmente los que contienen grupos oxigenados. De igual forma, se demostró el efecto antimicrobiano de fenilpropanoides presentes en los aceites esenciales, su carácter lipofílico es capaz de afectar la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares y pueden inhibir enzimas o procesos celulares específicos (Sánchez et al. 2013).

2.2. Antioxidante

El estrés oxidativo de los sistemas biológicos es causado por un lado por prolongadas exposiciones a agentes oxidantes, y por otro lado a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema, y en ocasiones el estrés oxidativo se presenta por la combinación de ambos efectos; además está asociado frecuentemente a la formación de radicales libres los cuales se caracterizan por ser átomos o moléculas que tienen un electrón libre desapareado, esto lo convierte en una especie muy reactiva que es capaz de reaccionar con otras especies químicas de su entorno, causando daños en los tejidos vivos. A este respecto las especies reactivas del oxígeno (ROS), presentan gran incidencia en la patología de diversas enfermedades tales como: cáncer, cardíacas, cerebrales, arterioesclerosis y envejecimiento prematuro, entre muchas otras (Mesa et al. 2010). Los ROS producen daños considerables a compuestos celulares vitales como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Uno de los trastornos más comunes provocados por los desórdenes del estrés oxidativo son los tumores cancerígenos, algunos tratables si se descubren a tiempo y otros irreversibles (Contreras 2015).

Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que causan daños a las mencionadas biomoléculas (Mesa et al. 2010). La citoprotección es en gran medida debida a los polifenoles que tienen capacidad antioxidante como agentes quelantes de iones de metales de transición, uniéndose a estos y reduciendo su capacidad de generar radicales libres; además, tienen capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas que inhiben oxigenasas celulares y por tanto la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno.

Los compuestos fenólicos como taninos y flavonoides; y algunos terpenos, actúan como antioxidantes, infiriendo así un efecto citoprotector, que en diferentes plantas ya se ha comprobado su efecto gastroprotector, antisecretor, antiinflamatorio e inhibidor de la migración de las células inflamatorias y actividad ante los radicales libres; los flavonoides son considerados protectores celulares, conociendo su actividad como antioxidantes, además del incremento de prostaglandinas, las principalmente disminuidas a la hora de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) posterior al uso de

antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Sandoval et al. 2010; Ancheta y Guzman 2011; Manrique 2014).

Flavonoides aislados de las hojas de *Satureja brevicalex* Epl. “wayra muña” fueron caracterizados como apigenina y naringenina, siendo la apigenina el flavonoide más importante. Estos demostraron tener actividad antioxidante superior al 90% y actividad antiinflamatoria a la dosis de 200 mg/kg similar al diclofenaco; y esta actividad es dependiente de su estructura química, por tener grupos fenólicos libres. (Aguilar 2014).

Las hojas de *Marrubium vulgare* conocido vulgarmente como "marrubio" contienen 34 componentes incluidos α -eudesmol, β -citronelol, formiato de citronelilo y germacreno D, que son considerados antioxidantes muy eficientes (Kadri et al. 2011). Hay evidencia de que el extracto de *M. vulgare* contiene ciertas cantidades de flavonoides con actividad antioxidante, como la luteolina, apigenina, 2"-O- β glucuronido y 2"-O- β glucósidos, además de vicenina y vitexina (Castro et al. 2014; Elberry et al. 2015).

Diferentes estudios realizados en variedades de nopal europeos y asiáticos han demostrado actividad antioxidante, con reducciones en significativas de ROS en pacientes y prevención de patologías crónicas (Madrigal et al. 2014).

2.3. Citotoxicidad

En lo que respecta al análisis citotóxico, la investigación de la acción de extractos de plantas sobre eritrocitos de sangre humana es importante para determinar cualquier actividad hemolítica, ya que es un indicador de citotoxicidad general y bioactividad. El ensayo de hemólisis *in vitro* ha sido empleado por diferentes grupos de investigación para la evaluación toxicológica de diversas plantas (Gandhi y Cherian 2000; Oliveira et al. 2009). Las propiedades de la membrana de los eritrocitos son el resultado de proteínas especializadas del citoesqueleto y de la membrana, así como de altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, la energía obtenida de la degradación anaeróbica y la reducción compleja de NADP a NADPH vía de pentosa fosfato, así como el transporte de oxígeno molecular y el hierro de la hemoglobina (Hb), las hace susceptibles a los daños por la formación de ROS, lo que finalmente conduce a una pérdida de Hb desde el interior, pero la protección contra los ROS y la reparación

del daño oxidativo son muy sólidas. De hecho, se conoce una diversidad de sistemas antioxidantes para proteger y reparar los hematíes (Zwieten et al. 2014); la medición de la hemólisis oxidativa en las membranas eritrocitarias representa un buen modelo para estudiar compuestos antioxidantes y pro-oxidantes (Sulaiman y Hussain 2012; García et al. 2016).

Los fitoquímicos presentes en un extracto pueden mostrar actividad hemolítica ya que pueden cambiar estructuralmente la membrana de los eritrocitos (Kumar et al. 2011). Oliveira et al. 2009 probaron un total de 71 extractos de plantas amazónicas encontradas en la Reserva Forestal Adolpho Ducke del Instituto Nacional para la Investigación Amazónica (INPA) (Manaus, Amazonas, Brasil) y sólo 3 de *Elaeoluma nuda* presentaron acción hemolítica, el extracto metanólico de la hoja a una concentración de 500 µg/mL y los extractos acuoso y metanólico de las ramas a concentraciones de 250 µg/mL.

Vinjamuri et al. 2015 realizaron ensayos hemolíticos y de viabilidad celular del extracto hexanoico de hojas de *Bridellia ferruginea* Benth resultando hemolítico a concentraciones >20 ng/mL mediante la prueba de hemólisis, pero no tuvo efecto citotóxico a estas concentraciones en las líneas celulares MCF-7 mediante el ensayo MTT.

Mediante hemólisis, Lakshmi et al. 2014, reportaron que el extracto metanólico de la hoja de *Nymphaea nouchali* no mostró actividad hemolítica ya que a concentraciones de 40, 60, 80 y 100 µg/mL obtuvieron esta actividad a < 2.5 %.

2.4. Efecto citoprotector

La citoprotección es la habilidad de los fármacos, originalmente de las prostaglandinas, para prevenir lesión en la mucosa gástrica, producida por una variedad de agentes ulcerogénicos y necrotizantes (Ancheta y Guzman 2011).

El efecto citoprotector de las sustancias, protege a las células del organismo frente a los efectos dañinos del estrés oxidativo provocado por radiación ionizante y quimioterapia principalmente. Diversos productos naturales han sido estudiados, en los

intentos de identificar efectos protectores contra los agentes que causan el efecto nocivo (Madrigal et al. 2014).

Varghese et al. 2013 investigaron la actividad nefroprotectora de extractos hidroalcohólicos del fruto de *Benincasa hispida* en ratas con nefrotoxicidad inducida con paracetamol, encontrando que los extractos de la fruta a dosis de 200 y 400 mg/kg prevenía la nefrotoxicidad inducida, los resultados fueron confirmados por observaciones histopatológicas donde se demostró que los daños degenerativos causados por el paracetamol se restablecieron con el tratamiento de los extractos hidroalcohólicos de *B. hispida* (Al-Snafi 2015).

Jin et al. 2014 estudiaron el efecto citoprotector de extractos metanólicos de *Moringa oleifera* en células neuronales, observando que la acumulación de especies reactivas de oxígeno fue menor en los cultivos de células tratadas con el extracto. En otro estudio en 2016 Babaee et al. mostraron el efecto citoprotector de *Pinus eldarica* contra el estrés oxidativo de células endoteliales de cordón umbilical humano, observando un alto contenido de compuestos fenólicos en dicha planta.

Al-Hashem 2010 investigaron los efectos gastroprotectores de un extracto acuoso de *Chamomilla recutita* (ACE) que se administró por vía oral contra las úlceras gástricas inducidas con etanol en ratas macho Wistar y se proporcionaron evidencias de la regulación de la protección gástrica (Madrigal et al. 2014). En el estudio de Huamán et al. 2009, el extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* presenta actividad antiulcerosa frente a etanol 96° a 400 mg/kg con un porcentaje de inhibición de 28.3 %. Sandoval et al. 2010 demostraron en el estudio de actividad antioxidante y citoprotectora de *Solanum tuberosum*, variedad tomasa, que la fracción sobrenadante posee actividad antioxidante en dosis de 5 mL/kg de peso y que la fracción del precipitado brinda citoprotección a la mucosa gástrica de manera dosis dependiente (Manrique, 2014).

La hemólisis de los eritrocitos ha sido ampliamente utilizada como un modelo *ex vivo* en el estudio de ROS inducida por la interrupción de las membranas celulares. La

propiedad inhibitoria de muchos antioxidantes sobre la hemólisis inducida por AAPH está bien documentada (Pieroni et al. 2011; Costa et al. 2016).

Los extractos acuosos (300, 400 y 800 µg/mL) y etanólicos (150, 200 y 400 µg/mL) de *Nigella sativa*; y acuosos (100, 150, 200 y 400 µg/mL) y etanólicos (1200, 1800 µg/mL) de *Portulaca oleracea* mostraron efectos citoprotectores en eritrocitos de ratas Wistar, dependientes de la concentración. La adición de los extractos una hora después del AAPH redujo pero no eliminó las actividades protectoras de los extractos (Karimi et al. 2011).

Pieroni et al. 2011 observaron en eritrocitos humanos el efecto protector, ante la hemólisis inducida por AAPH, de la fracción *n*-BuOH y del extracto metanólico de hojas de *Miconia albicans* a una concentración de 0.59 mg/mL y 4.3 mg/mL respectivamente.

Sulaiman y Hussain 2012 mostraron que las antocianinas atenuaron, de forma dependiente de la concentración, la hemólisis inducida por compuestos azo, como el AAPH; y los efectos citoprotectores de las mismas se observaron cuando se agregaron simultáneamente con los compuestos azo, mientras que su adición tardía durante 2 y 3 h disminuyó pero no abolió su efecto protector.

2.5. Plantas utilizadas en este estudio

2.5.1. *Arbutus xalapensis* Kunt

2.5.1.1. Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Género: *Arbutus*

Especie: *xalapensis*

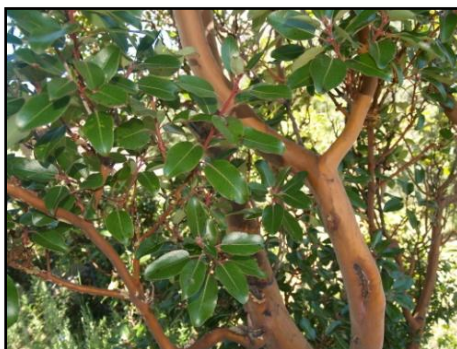


Figura 1. *Arbutus xalapensis* Kunth.
© Carlos Velazco.

2.5.1.2. Estudios previos

Uso tradicional de las ramas de *A. xalapensis* Kunth (syn *A. peninsularis* Rose y Golman) para problemas de circulación, cardiovasculares, fiebre y enfermedades gastrointestinales (Dimayuga et al. 1998; Sharma et al. 2016).

Meckes et al. 1995 probaron varios extractos incluyendo el metanólico crudo de la corteza de *A. xalapensis* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* donde mostró actividad antimicrobiana frente al estafilococo reportando halos de inhibición entre 10 mm y 15 mm, pero no así contra la Gram (-) y el hongo. El extracto etanólico de las ramas de *Arbutus peninsularis*, conocido como madroño (Dimayuga et al. 1998) y reportado por Sharma et al. 2016 como *A. xalapensis* por considerarse sinónima, ha sido probado contra microorganismos en la prueba de difusión en papel filtro (2.8 mg) obteniendo zonas de inhibición con diámetros de 10 a 15 mm para *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *C. albicans* y valores menores a 10 mm para *Streptococcus faecalis*, mientras que para *E. coli* no presentó inhibición (Dimayuga et al. 1998; Sharma et al. 2016).

Especies de *Arbutus*, como *A. unedo*, es ampliamente utilizado en la medicina tradicional alrededor del mundo, popularmente se le reconoce por sus propiedades diuréticas, antisépticas y su uso en enfermedades cardiovasculares e hipertensión. También realizaron una revisión para conocer la composición química y las aplicaciones biológicas de *A. unedo* para establecer su potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas y crónicas, y determinaron la riqueza química en compuestos fenólicos y la

variedad de actividades biológicas por lo que amplía la posibilidad de su uso como fuente de compuestos antioxidantes, antibacteriales, antihipertensivos y antiagregante plaquetario, entre otros (Hernández et al. 2015).

2.5.2. *Mimosa malacophylla* Gray

2.5.2.1. Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Mimosa*

Especie: *malacophylla*



Figura 2. *Mimosa malacophylla* Gray.
© Carlos Velazco.

2.5.2.2. Estudios previos

Hasta el momento no se tienen estudios de *M. malacophylla* sobre su actividad antimicrobiana, antioxidante o citoprotectora; sin embargo, la parte aérea (hojas) se ha utilizado medicinalmente, como diurética y para cálculos renales (Alvarado et al. 2010). En especies de *Mimosa* como *M. pudica* se ha reportado su uso para el tratamiento de varias dolencias y la parte más comúnmente usada es la raíz; mas la corteza, flor y fruto también se han utilizado y se ha evaluado su actividad antimicrobiana (Gandhiraja et al. 2009). Tamilarasi y Ananthi 2012 reportaron que la actividad antimicrobiana de

extractos de hoja de esta planta contra patógenos como *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus* y *Trycophyton rubrum* es debida a la presencia de alcaloides y taninos produciendo halos de inhibición entre 10 mm y 21 mm mediante el método de difusión en pozo. Otras, como los extractos etanólicos de las ramas de *M. brandegeei* y *M. xantii*, han mostrado actividad antimicrobiana mediante la prueba de difusión en papel filtro (2.8 mg/mL) contra *S. aureus* generando zonas de inhibición entre 10 y 15mm; *M. brandegeei* <10 mm para *B. subtilis*, pero ninguna de las *Mimosa* de este estudio mostraron actividad para *S. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans* (Dimayuga et al. 1998; Sharma et al. 2016).

2.5.3. *Teucrium cubense* Jacquin

2.5.3.1. Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Teucrium*

Especie: *T. cubense*



Figura 3. *Teucrium cubense* Jacquin.

© Brush F.

2.5.3.2. Estudios previos

Es usada extensivamente en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diabetes tipo 2. Román et al. 1991 reportaron que los extractos acuosos de esta planta reducían los niveles de glucosa en plasma de conejos saludables (Alonso et al. 2010). En un estudio de etnobotánica Godínez y Volpato 2008 registraron que la infusión de las hojas se emplea para el tratamiento de la influenza y los resfriados. El jugo de las hojas se aplica para curar el dolor de oídos. Las hojas fritas se toman para curar la bronquitis. La decocción se usa externamente contra los edemas e hinchazón de las piernas. En otro estudio, Pérez et al. 2009 registraron su uso como antidermatofítico.

Jacobo et al. 2011, evaluaron varios extractos acuosos de plantas medicinales mexicanas contra 3 especies de Gram (+), 5 Gram (-) y 3 especies de hongos y el extracto acuoso de *T. cubense* presentó actividad antimicrobiana con la prueba de difusión en papel filtro a una concentración de 375 µg/mL contra *Acinetobacter lwoffii* y a 750 µg/mL de concentración contra *P. aeruginosa* y *Candida albicans* generando zonas de inhibición con diámetros de 22 ± 3 mm, 10 ± 2 mm y 12 ± 3 mm para cada microorganismo respectivamente; pero no tuvo actividad a 75, 375 y 750 µg/mL de concentración contra especies como *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*; y los hongos *Candida tropicalis* y *Trichosporon belgeii*; y en el mismo estudio fue evaluada la citotoxicidad del extracto mencionado utilizando la prueba 3-(4,5-dimeriltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) en líneas celulares cancerígenas humanas MCF-7 y HeLa con una dosis efectiva 50 ($DE_{50} \geq 30$ µg/mL) resultando no ser citotóxico (Jacobo et al. 2011; Sharma et al. 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente resistencia de los microorganismos patógenos hacia los antibióticos convencionales y a la tendencia de consumir productos benéficos para la salud humana, en la actualidad, se hace notoria la necesidad de seguir explorando y descubriendo nuevos productos de origen natural con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y citoprotectoras, entre otras; por lo que es importante continuar con la investigación de nuevos especímenes para su posible uso.

4. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de las plantas *A. xalapensis*, *M. malacophylla* y *T. cubense* presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, microorganismos de importancia nosocomial, así como efecto antioxidante ante radicales DPPH y ABTS^{•+} y capacidad citoprotectora de eritrocitos humanos contra la hemólisis inducida por AAPH.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Stenotrophomonas maltophilia*, microorganismos resistentes a antibióticos de importancia nosocomial, además del efecto antioxidante y la capacidad citoprotectora de los extractos etanólicos de *Arbutus xalapensis*, *Mimosa malacophylla* y *Teucrium cubense*.

5.2. Objetivos específicos

1. Obtener los extractos etanólicos de las plantas de *A. xalapensis*, *M. malacophylla* y *T. cubense* así como su rendimiento.
2. Determinar de forma preliminar el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos obtenidos contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. maltophilia* mediante la técnica de difusión en pozo.
3. Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida de los extractos etanólicos activos contra las cepas antes mencionadas.
4. Cuantificar el efecto antioxidante de los extractos obtenidos con los métodos 1,1-difenil 2-picrilhidracil (DPPH) y 2,2-Azino-bi-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico (ABTS^{•+}).
5. Evaluar la toxicidad preliminar de los extractos que presentaron mayor actividad antimicrobiana y antioxidante mediante la prueba de hemólisis.
6. Medir el grado citoprotector de los extractos que no presentaron toxicidad mediante el método 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato (AAPH).
7. Identificar de forma cualitativa compuestos y grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos obtenidos mediante tamizaje fitoquímico preliminar.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron aislados clínicos resistentes a antibióticos: *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. maltophilia*. Estas se mantuvieron en tubos con Agar Mueller-Hinton (MH; DIFCO) a 4°C. Para la activación de cada una de las cepas se tomó una asada del medio de reserva y se sembró en 5 mL de caldo MH. Los tubos activados fueron incubados en una incubadora (FELISA® FE-291) durante 18 h a 37 °C.

6.2. Material vegetal

Para la realización del presente proyecto, las plantas fueron colectadas en los alrededores de la comunidad de la Cieneguilla, Santiago, Nuevo León [25.388239,-100.143886] (Tabla 1). Una parte de los especímenes colectados fueron colocados en prensas botánicas, para después ser depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, para su posterior identificación. La otra parte de las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente fueron trituradas en molino manual para grano y pulverizadas en una licuadora, por último fueron almacenadas en sobres de papel manila, a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, hasta su utilización.

Tabla 1. Plantas utilizadas en el estudio.

Planta	Nombre científico	Nombre común ¹	Parte Utilizada
1	<i>Arbutus xalapensis</i> Kunt	Madroño	Hoja
			Tallo
2	<i>Mimosa malacophylla</i> Gray	Charrasquilla	Hoja
			Tallo
3	<i>Teucrium cubense</i> Jacquin	Verbena blanca	Hoja
			Tallo
			Raíz

¹Citados de Alvarado et al. 2010.

6.3. Obtención de los extractos etanólicos

Para la obtención de los extractos, se pesaron 100 g de la planta seca y triturada en un matraz Erlenmeyer, utilizando una balanza (NIMBUS® NBL-214e), a los cuales se le

agregaron 500 mL de etanol (EtOH). La extracción del material vegetal se llevó a cabo por maceración en agitación constante a temperatura ambiente por un periodo de 24 h. Posteriormente el extracto obtenido se filtró con la ayuda de papel filtro (WHATMAN No.1). Después se procedió a evaporar el solvente a presión reducida utilizando un rotavapor (YAMATO BM 100). Finalmente, el extracto seco se almacenó en frascos de vidrio resguardados de la luz hasta su utilización y el solvente recuperado fue utilizado para realizar una nueva extracción de la planta donde fue utilizado (2 X).

6.3.1. Rendimiento del extracto

Una vez eliminado el solvente en su totalidad, se procedió a obtener el rendimiento del extracto utilizando la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido despues de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer

6.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

6.4.1. Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana

Para esto se utilizó el método de difusión del pozo en agar (Das et al. 2010), el cual consistió en sembrar por extensión con la ayuda de un asa de Driglasky, 100 μ L de las cepas previamente activadas, sobre placas de Petri con 20 mL de agar MH. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo estéril invertido (aprox. 8 mm de diámetro), el agar fue retirado con la ayuda de una espátula estéril y en cada pozo se agregaron 100 μ L de los extractos a evaluar; se utilizó como blanco 100 μ L de etanol absoluto, solvente en el cual fueron resuspendidos los extractos.

Las placas fueron incubadas durante 24 h a 37°C. El efecto antimicrobiano del extracto se evidenció mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición de crecimiento observado alrededor del pozo. Este ensayo se realizó por duplicado en tres ocasiones.

6.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó en los extractos de las plantas que mostraron actividad antimicrobiana preliminar en contra de las bacterias de estudio.

Para esto, se utilizó el método de dilución en microplaca de 96 pozos, en la cual diferentes concentraciones de los extractos fueron colocados en diferentes volúmenes de caldo MH previamente inoculado al 1 %, considerado un volumen final en el pozo de 200 μ L. Como controles se utilizaron: caldo MH, caldo MH con el microorganismo y caldo MH con el microorganismo y la cantidad de etanol absoluto correspondiente a cada una de las concentraciones evaluadas. La microplaca fue incubada a 37 °C por 24 h para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y por 48 h para *S. maltophilia*. La CMI fue interpretada como la concentración en la cual se inhibe el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar esto con los controles.

Para determinar la CMB se tomaron 20 μ L de cada pozo donde no se observó crecimiento aparente, los cuales fueron sembrados mediante la técnica de goteo de Miles y Mishra, en placas Petri con agar MH, debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h para las cepas *P. aeruginosa* y *S. aureus* y a 30°C por 48 h para *S. maltophilia*. La CMB fue definida como la concentración de los extractos que eliminó al 99.9 % de los microorganismos evaluados.

6.5. Capacidad antioxidante mediante el método de DPPH

Para la medición de la actividad antioxidante se utilizó el método de 1,1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH) con ligeras modificaciones, en la cual se preparó una solución de trabajo de DPPH a una concentración de 0.13 mM. Además, se utilizó una solución diluida de Trolox^{MR} a una concentración de 1 mM, la cual se guardó en un frasco protegido de la luz a temperatura ambiente para usarse el mismo día.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de baja iluminación (penumbra), el mismo día y en muestras frescas (no almacenadas), ya que los compuestos antioxidantes cambian su concentración con la exposición a la luz y al

oxígeno. Tanto las curvas de calibración como el análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

Las curvas de calibración se generaron colocando 100 μL de las soluciones de trabajo previamente preparadas, de 0 a 250 μL de la solución diluida de Trolox^{MR} con MetOH absoluto a un volumen final de 1 mL, para obtener una concentración final de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 nmol de Trolox^{MR} en tubos Eppendorf, posteriormente se agregaron 600 μL de la solución DPPH 0.13mM. Los tubos fueron tapados y mezclados por rotación.

Para las muestras biológicas, se colocaron diferentes concentraciones de los extractos en tubos Eppendorf completando con metanol absoluto para alcanzar un volumen final de 100 μL . Una vez hecho esto se agregaron 600 μL del reactivo DPPH 0.13 mM, los tubos se taparon y mezclaron por rotación.

Los tubos preparados de la manera previamente descrita fueron incubados durante 20 min en oscuridad total a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, todos los tubos fueron leídos a 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic GENESIS 20) habiendo calibrado a cero de absorbancia con metanol absoluto.

Los datos obtenidos fueron graficados para obtener la ecuación de la recta “ $y = mx + b$ ” con la que se calculó la cantidad (nmol) de equivalentes de Trolox^{MR} de la alícuota de la muestra problema. Conociendo este último dato, así como el volumen del extracto del cual dicha alícuota fue tomada, y el peso de la muestra seca que dará origen al volumen total del extracto, se calculó y se reportó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox^{MR} (TEAC) como μmoles equivalentes de Trolox^{MR} de la muestra por gramo de peso seco (nmoles ET/g) (Blois, 1958; Brand et al. 1995; Frankel y Meyer 2000; Fukumoto y Mazza 2000).

6.6. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS⁺⁺

Adicionalmente, la determinación de la actividad antioxidante se realizó con el método 2,2-Azino-bi-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico (ABTS⁺⁺), descrito por Re *et al.*, 1999, con ligeras modificaciones. La solución de ABTS⁺⁺ fue preparada en partes iguales (1:1) de dos soluciones previamente elaboradas en agua destilada: ABTS (7 mM) y solución de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a 2.45 mM. La mezcla se dejó reposar por

16 h en oscuridad a temperatura ambiente. También se preparó una solución diluida de Trolox^{MR} a 1 mM las cuales fueron guardadas en un frasco protegido de la luz a temperatura ambiente para usarse ese mismo día.

El procedimiento se llevó a cabo en condiciones de baja iluminación (penumbra), todo el mismo día y en muestras frescas (no almacenadas). De la solución del radical catiónico, se tomó 1 mL y se aforó a 50 mL con metanol absoluto, posteriormente se ajustó a una absorbancia de 1 ± 0.1 a 734 nm. Una vez ajustado, se generaron curvas de calibración colocando 100 μ L de la solución de trabajo previamente preparadas, de 0 a 350 μ L de la solución diluida de Trolox^{MR} con MetOH absoluto a un volumen final de 1 mL, para obtener una concentración final de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 nmol de Trolox^{MR} en tubos Eppendorf, posteriormente se agregaron 1400 μ L de la solución ABTS⁺ a cada tubo. Los tubos fueron tapados y mezclados por rotación. Tanto las curvas de calibración como el análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

Para las muestras biológicas se tomaron 1400 μ L del reactivo previamente preparado, los cuales se mezclaron con 100 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos activos obtenidos ajustando a un volumen final de 1 mL, los tubos fueron incubados durante 30 min, protegidos y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, todos los tubos fueron leídos a 734 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic GENESIS 20) habiendo calibrado a cero de absorbancia con metanol absoluto.

Los datos obtenidos fueron graficados y procesados de la forma previamente descrita, reportando el resultados final del análisis como nmoles ET/g (Re et al. 1999; Tawaha et al. 2007).

6.7. Capacidad citoprotectora

6.7.1. Evaluación de la toxicidad preliminar de los extractos etanólicos seleccionados mediante la prueba de hemólisis

Para el bioensayo de hemólisis, se obtuvo sangre humana de donadores sanos, la sangre fue mezclada con EDTA (1.5 mg/mL de sangre) para luego ser separada del suero centrifugándola en una centrífuga CLAY ADAMS[®] SERO-FUGE[®] a 1,000 rpm por 5 min a 37°C. El paquete celular obtenido fue lavado cuatro veces en solución

amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH = 7.4, eliminándose el sobrenadante por succión cuidadosa con una pipeta Pasteur. Los eritrocitos se utilizaron posteriormente para preparar una suspensión (SCR) al 5% v/v en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4).

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos sobre los eritrocitos, los glóbulos rojos previamente obtenidos se incubaron con diferentes concentraciones de los extractos durante 30 min a 37 °C protegidos de la luz. El control negativo fue establecido por los eritrocitos sin tratamiento alguno y para el control positivo se añadió agua destilada para producir hemólisis osmótica de los eritrocitos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el grado de hemólisis se determinó mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm de la absorción de la Hb liberada en el sobrenadante, en el lector de microplacas (BIOTECK EPOCH); estas lecturas fueron registradas como “Absorbancia del tratamiento a la concentración dada en partes por millón (Abs Tx)”. Por último, se calculó el porcentaje de hemólisis utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left[\frac{\text{Abs Tx} - \text{Abs Ctrl} (-)}{\text{Abs Ctrl} (+) - \text{Abs Ctrl} (-)} \right] \times 100$$

(Pérez et al. 2003; Cantillo et al. 2007; Oliveira et al. 2009; Kumar et al. 2011; Lakshmi et al. 2014; García et al. 2016).

6.7.2. Bioensayo de citoprotección de los extractos no hemolíticos mediante el método de AAPH

Se empleó el método propuesto por Karimi et al. 2011, con ligeras modificaciones. Para esto, se obtuvo una suspensión de eritrocitos de la manera previamente descrita. En este caso la suspensión fue ajustada al 10% v/v en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4). Esta suspensión de glóbulos rojos se preparó para ser utilizada ese mismo día. La hemólisis inducida fue mediante la adición del reactivo 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) diclorhidrato (AAPH) a 150 mM preparado en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4).

Para evaluar el efecto citoprotector de los extractos sobre la hemólisis inducida por AAPH, los glóbulos rojos previamente obtenidos se incubaron con diferentes concentraciones de los extractos más el compuesto azo AAPH a 200 rpm durante 5 h a 37 °C en una incubadora de rotación LUZEREN® THZ-100. Como control negativo de

la hemólisis se utilizó el amortiguador de fosfatos con la solución de eritrocitos sin incluir el AAPH y el control positivo al compuesto azo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (5 h), el grado de hemólisis se determinó en los sobrenadantes mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm en el lector de microplacas BIOTECK EPOCH, estas lecturas fueron registradas como “Absorbancia del tratamiento a la concentración dada en partes por millón (Abs Tx)”. Por último, se calculó el porcentaje de citoprotección utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Citoprotección} = \left[1 - \frac{\text{Abs Tx} - \text{Abs Ctrl (-)}}{\text{Abs Ctrl (+)} - \text{Abs Ctrl (-)}} \right] \times 100$$

6.8. Tamizaje fitoquímico preliminar

También se llevó a cabo un análisis fitoquímico cualitativo con el fin de identificar metabolitos y grupos funcionales presentes en cada uno de los extractos etanólicos; para esto se utilizaron las siguientes pruebas químicas: Permanganato de potasio (dobles enlaces), el 2,4-dinitrofenilhidrazina (grupo carbonilo), Liebermann-Burchard (esteroles y triterpenos), Baljet (sesquiterpenlactonas), Antrona (carbohidratos), Bicarbonato de sodio (grupo carboxilo), Cloruro férrico (taninos), Dragendorff (alcaloides), Shinoda (flavonoides), así como para cumarinas, quinonas y saponinas (Verde et al. 2016).

Prueba de permanganato de potasio (Dobles enlaces): Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol (MetOH) y se adicionó, gota a gota, la solución de KMNO_4 (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.

2,4-dinitrofenilhidrazina (Grupo Carbonilo): Se preparó la solución de reacción con 100 mg de 2,4-DFNH (dinitrofenilhidrazina) + 10 mL de etanol (EtOH) + 3 mL de HCl (ácido clorhídrico) y se aforó a 100 mL con agua destilada, de ésta se añadieron unas gotas a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indicó la presencia de un grupo carbonilo.

Prueba de Liebermann-Burchard (Esteroles y Triterpenos): El reactivo se preparó mezclando 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de CHCl_3 (cloroformo) y 3 gotas de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) concentrado. Una gota del reactivo se le añadió a la muestra (1-

2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver; la presencia de una coloración azul o morada será positiva para esteroides y si es rojiza para triterpenos, esto en el lapso de 1 h, particularmente los insaturados.

Prueba de Baljet (Sesquiterpenlactonas): Se emplearon 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de su utilización. La solución A se preparó pesando 1 g de ácido pícrico ($C_6H_3B_3O_7$) y disolviéndolo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesaron 10 g de NaOH (hidróxido de sodio), disolviéndolos en 100 mL de agua. Para la prueba se colocaron de 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma una coloración anaranjada o rojiza oscura.

Antrona (Carbohidratos): En un tubo de ensayo se colocaron 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, se adicionó por las paredes del tubo una solución recientemente preparada de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interfase se presenta un anillo color azul-verdoso o violeta.

Prueba de Shinoda (Flavonoides): Se disolverá 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de HCl (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 como anaranjado, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

Prueba de bicarbonato de sodio (Grupo Carboxilo): Se agregaron unas gotas de la solución de $NaHCO_3$ (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 al observarse el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

Prueba de cloruro férrico (Taninos): Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol, añadiendo unas gotas de $FeCl_3$ (cloruro férrico) al 5 % en etanol; la prueba es positiva si produce una coloración verde oscura o negra.

Prueba de Dragendorff (Alcaloides): Se corre una cromatografía en capa delgada con el extracto y se revela con reactivo de Dragendorff, siendo positiva si se produce una

mancha anaranjada que debe persistir más de 24 h; y también se realiza la prueba directamente en el extracto: se coloca una pequeña cantidad de muestra disuelta en etanol y se agrega una o dos gotas del reactivo Dragendorff, la prueba es positiva si se produce un precipitado anaranjado.

- Preparación del reactivo:
 - Solución A: Se disolvieron 0.85 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (nitrato de bismuto) en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua.
 - Solución B: Se disolverán 8.0 g de KI_3 (yoduro de potasio) en 20 mL de agua destilada.

Cumarinas.- Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en una solución de NaOH (hidróxido de sodio) al 10 %; si se produce una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba es positiva.

Quinonas: 2 a 3 mg de muestra se le añadirán 1 o 2 gotas de H_2SO_4 (ácido sulfúrico), será positiva para quinonas se colorea de rojo y se confirma al añadir 2-3 gotas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (hidrosulfito de sodio) al 5% decolorando la solución y se regenera el color añadiendo de 2-3 gotas de H_2O_2 (agua oxigenada) al 30 %.

Saponinas: En un tubo de ensayo se colocará la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, y si al agitarse se forma una espuma abundante y permanente por más de 15 min, la prueba se considera positiva.

6.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS, ver 20.0 (SPSS Inc., Chicago IL) mediante el cual se comprobaron todos los supuestos de la estadística paramétrica mediante ANOVA simple de 2 factores con la prueba de Tukey y Dunnet (en su caso), con un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de extractos y su rendimiento

Las plantas *A. xalapensis*, *M. malacophylla* y *T. cubense* fueron separadas en hojas, tallo y raíz (en su caso), y se obtuvieron 7 extractos etanólicos (Tabla 2).

Tabla 2. Extractos etanólicos obtenidos de las plantas con actividad antimicrobiana.

Planta	Nombre científico	Nombre común ²	Extracto	Parte	Clave
1	<i>A. xalapensis</i> Kunt	Madroño	1	Hoja	Ax-h
			2	Tallo	Ax-t
2	<i>M. malacophylla</i> Gray	Charrasquilla	3	Hoja	Mm-h
			4	Tallo	Mm-t
3	<i>T. cubense</i> Jacquin	Verbena	5	Hoja	Tc-h
			6	Tallo	Tc-t
			7	Raíz	Tc-r

²Citados de Alvarado et al. 2010.

En este estudio, el extracto de hoja de *T. cubense* fue el de mayor rendimiento con un 20.4 %, mientras que el de menor fue el tallo de *M. malacophylla* con 4.9 % (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento porcentual de los extractos etanólicos.

Extracto ³	Rendimiento porcentual (%)
Ax-h	19.6
Ax-t	6.1
Mm-h	10.3
Mm-t	4.9
Tc-h	20.4
Tc-t	6.3
Tc-r	9.7

³*A. xalapensis* (Ax), *M. malacophylla* (Mm), *T. cubense* (Tc), -h (hoja), -t (tallo) y -r (raíz).

7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

En la prueba de difusión del pozo en agar, el extracto que presentó mayor zona de inhibición contra *S. aureus* y *S. maltophilia* fue el de raíz de *T. cubense* con un halo de inhibición de 16.7 ± 0.6 mm y 16.3 ± 0.6 mm respectivamente, y para *P. aeruginosa* fue el extracto con mayor actividad fue el de tallo de *A. xalapensis* con 17.2 ± 1.0 mm (Tabla 4).

Tabla 4. Halos de inhibición (mm) de los extractos evaluados.

Extractos ⁴	<i>S. aureus</i> ^b	<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>S. maltophilia</i> ^{ab}
Ax-h^b	16.4 ± 0.5	16.3 ± 0.5	12.4 ± 0.5
Ax-t^b	16.5 ± 0.6	17.2 ± 1.0	13.7 ± 0.6
Mm-h^a	12.6 ± 0.5	10.8 ± 1.0	12.3 ± 0.6
Mm-t^a	11.7 ± 0.5	11.2 ± 1.1	11.7 ± 0.6
Tc-h^a	13.3 ± 0.6	11.7 ± 1.4	13.1 ± 1.0
Tc-t^b	12.7 ± 0.6	12.0 ± 0.7	15.0 ± 1.0
Tc-r^b	16.7 ± 0.6	12.7 ± 0.6	16.3 ± 0.6

⁴ Los valores se muestran como Media ± DE de al menos 3 experimentos por triplicado. El diámetro del pozo (Ø = 8 mm) fue incluido. ANOVA. Tukey. Diferencia significativa p≤0.05.

7.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB)

Los resultados obtenidos del ensayo de CMI/CMB indican que los extractos de *A. xalapensis* hoja y tallo, fueron los que presentaron la mayor actividad antimicrobiana con rangos de CMI de 2.5 ± 0.2 mg/mL a 2.6 ± 0.5 mg/mL y de CMB de 2.6 ± 0.3 mg/mL a 2.9 ± 0.5 mg/mL. Seguido de los extractos de *T. cubense* y al final los de *M. malacophylla* no presentaron buena actividad en el presente estudio (Tabla 5).

Tabla 5. CMI y CMB (mg/mL) de los extractos seleccionados.

Extracto ⁵	<i>S. aureus</i> ^a		<i>P. aeruginosa</i> ^b		<i>S. maltophilia</i> ^b	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Ax-h^{abc}	2.6 ± 0.5	2.9 ± 0.5	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0
Ax-t^a	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.3	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0
Mm-h^d	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0
Mm-t^d	29.0 ± 1.7	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0
Tc-h^{bc}	7.3 ± 0.3	7.4 ± 0.4	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0
Tc-t^c	11.3 ± 0.8	11.4 ± 0.7	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0
Tc-r^{ab}	3.8 ± 0.8	3.9 ± 1.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0

⁵ Los valores se muestran como la media ± desviaciones estándar de al menos 3 experimentos por triplicado. ANOVA. Prueba de Tukey. Diferencia significativa p≤0.05. El promedio del inóculo inicial y final fue de 5.4 x 10⁸ y 9.7 x 10¹⁰ UFC/mL respectivamente.

7.4. Capacidad antioxidante

Mediante el método DPPH, los resultados obtenidos de la curva de calibración promedio (y= -0.0305x + 1.27, R²= 0.9978), mostraron que los extractos de hoja y tallo

de *A. xalapensis* presentaron mayor capacidad de secuestrar el radical DPPH con valores de $1,206.6 \pm 68.6$ $\mu\text{moles ET/g}$ y $1,112.1 \pm 70.6$ $\mu\text{moles ET/g}$ respectivamente. Por otra parte, la actividad antioxidante de los demás extractos resultó ser mucho menor presentando rangos entre 67.2 ± 3.3 $\mu\text{moles ET/g}$ a 319.3 ± 16.3 $\mu\text{moles ET/g}$ dependiendo el extracto analizado (Figura 4).

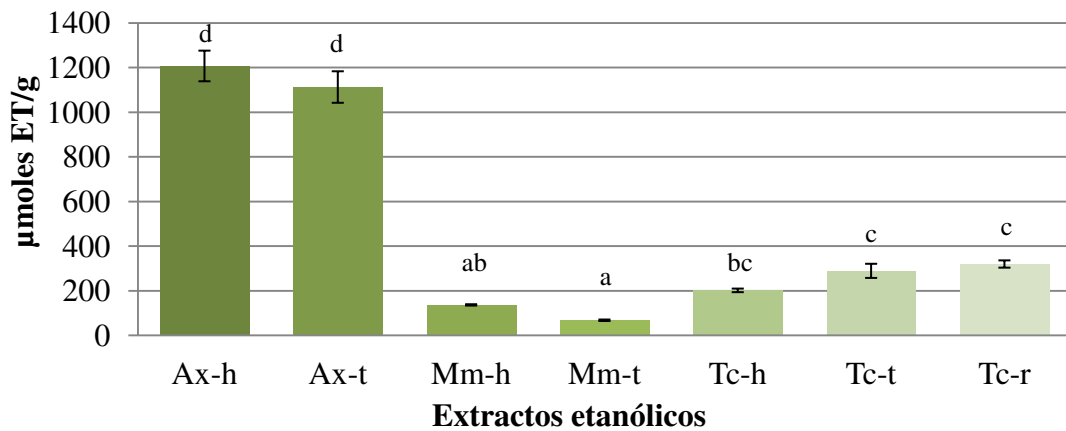


Figura 4. Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH. Los valores representan Media \pm DE de los datos del experimento (n=6). ANOVA con Tukey. Significancia $p \leq 0.05$.

Con respecto al bioensayo de actividad antioxidante con el reactivo ABTS^{++} , se confirma la capacidad antioxidante de los extractos de hoja y tallo de *A. xalapensis* de captar el radical ABTS^{++} con valores de $1,750.7 \pm 110.1$ $\mu\text{moles ET/g}$ y $1,864.0 \pm 135.6$ $\mu\text{moles ET/g}$ respectivamente, así mismo la actividad de los demás extractos fue similar a la reportada con el reactivo DPPH con rangos entre 143.4 $\mu\text{moles ET/g}$ a 447.8 $\mu\text{moles ET/g}$ (Figura 5).

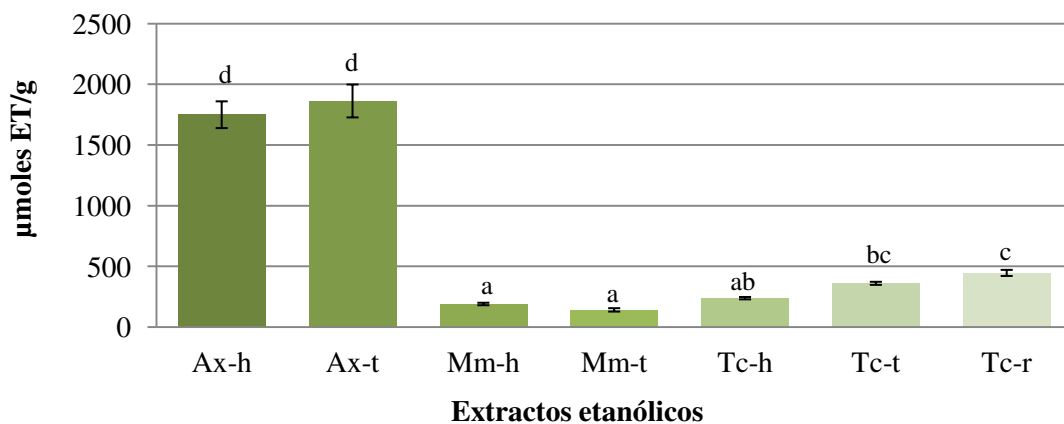


Figura 5. Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical ABTS^{++} . Los valores representan Media \pm DE de los datos del experimento (n=6). ANOVA con Tukey. Significancia $p \leq 0.05$.

7.5. Citotoxicidad preliminar

Mediante la prueba de hemólisis, se probaron los extractos que resultaron con buena actividad antimicrobiana y antioxidante, descartando los de *M. malacophylla*.

El extracto del tallo de *A. xalapensis* mostró el mayor porcentaje de daño a los eritrocitos suspendidos en PBS con 3.1 ± 0.4 % a una concentración de 1,000 ppm. A una concentración de 100 ppm ningún extracto presentó hemólisis. En todos los casos se observó una leve hemólisis dependiente de la concentración, con excepción del extracto de tallo de *T. cubense* que no generó hemólisis en las concentraciones probadas en este estudio (Figura 6).

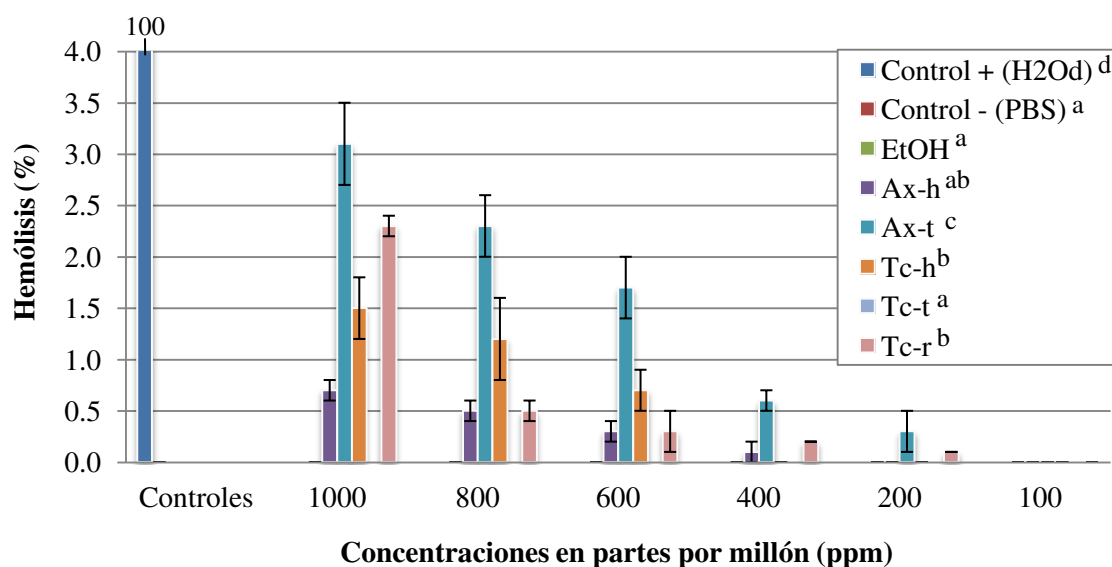


Figura 6. Comparación del porcentaje de hemólisis entre los extractos. Los valores se muestran como la Media \pm DE. Al menos 3 experimentos por triplicado. ANOVA Dunnet. Significancia $p \leq 0.05$.

7.6. Citoprotección

Los extractos que no presentaron hemólisis significativa fueron analizados mediante el método de AAPH.

Los extracto de hoja y tallo de *T. cubense* a concentraciones entre 400 y 1000 ppm, el extracto de hoja de *A. xalapensis* entre 400 y 800 ppm, y el extracto de raíz de *T. cubense* entre 400 y 600 ppm se observó un 100 % de citoprotección ante la hemólisis inducida por AAPH. El extracto de tallo de *A. xalapensis* presentó su valor más alto de

citoprotección a 400 ppm con $98.5 \pm 0.9 \%$ y el menor con $79.1 \pm 5.3 \%$ a una concentración de 100 ppm ante el compuesto azo (Figura 7).

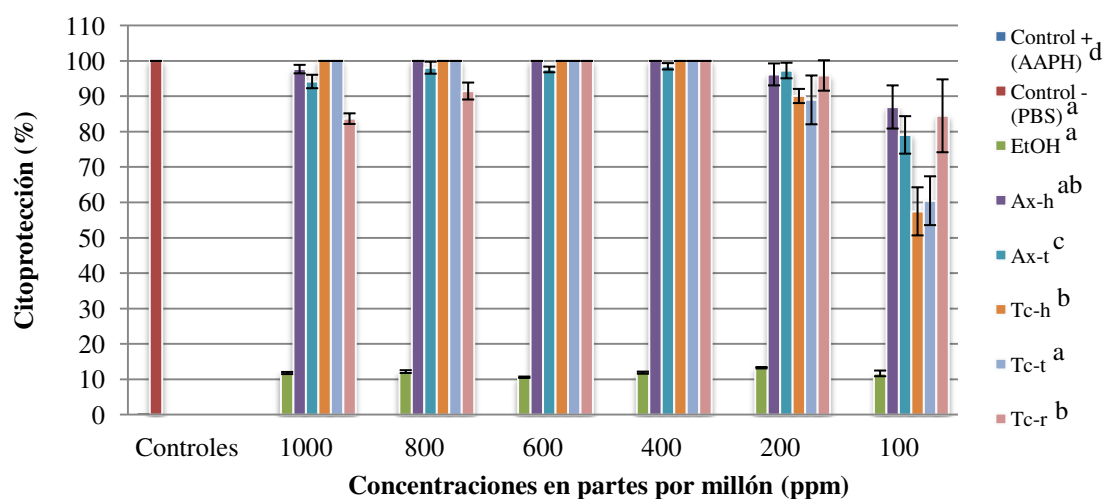


Figura 7. Comparación del porcentaje de citoprotección entre los extractos. Los valores se muestran Media \pm DE. Al menos 3 experimentos por triplicado. ANOVA Dunnet. Significancia $p \leq 0.05$.

7.7. Tamizaje fitoquímico cualitativo

Mediante pruebas fitoquímicas se pudieron identificar metabolitos y grupos funcionales presentes en los extractos (Tabla 6).

Tabla 6. Metabolitos o grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos.

Metabolitos o grupos funcionales	Ax-h	Ax-t	Mm-h	Mm-t	Tc-h	Tc-t	Tc-r
Enlaces dobles	-	+	-	-	-	-	+
Grupo carbonilo	-	-	+	-	-	-	+
Esteroles	+	-	+	+	+	-	-
Triterpenos	-	+	-	+	-	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	+	-	+	-	-	+
Carbohidratos	+	+	+	+	+	+	+
Grupo carboxilo	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	-	-	-	-	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	+	+	-	-	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+
Quinonas	+	+	-	+	-	-	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-

8. DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad antimicrobiana preliminar muestran que todos los extractos probados presentaron actividad contra los aislados clínicos seleccionados, obteniendo halos de inhibición de entre 10.8 mm y 17.2 mm, dependiendo del extracto y de la cepa. Estos resultados son similares a los observados por Meckes et al. 1995 al probar el metanólico crudo de la corteza de *A. xalapensis* observando halos de inhibición de entre 10 mm y 15 mm contra *S. aureus* mediante la técnica de pozo en agar; y también a Dimayuga et al. 1998 que aunque utilizaron la técnica de difusión del papel filtro, reportaron los mismos resultados contra esta bacteria utilizando el extracto etanólico de las ramas de *Arbutus peninsularis* (madroño), el cual, de acuerdo a Sharma et al. 2016, es sinónimo de *A. xalapensis*. En otro estudio, Orak et al. 2011 mediante la técnica de difusión en pozo observaron que el extracto acuoso de *Arbutus unedo* generó halos de inhibición similares a los reportados para *A. xalapensis* en un rango entre 10.5 mm a 21.1 mm, siendo poco mayor (1.28 veces) éste último resultado al observado en el presente estudio contra estos estafilococos pero también no observaron actividad contra *E. coli* y *Salmonella enteritidis*; sin embargo, Jurica et al. 2017 reportaron que el extracto acuoso y metanólico de la hoja *A. unedo* mostraron halos de inhibición contra *P. aeruginosa* de 10 mm y de entre 12.4 mm y 14 mm respectivamente, siendo poco menores a los que observamos contra la pseudomona utilizando la misma técnica. En lo que respecta a la planta *T. cubense*, en un estudio previo Jacobo et al. 2011 utilizaron el extracto acuoso de esta planta mediante la técnica de difusión de papel filtro y reportaron halo de inhibición de 10 mm contra *P. aeruginosa* y sin actividad contra *S. aureus*, siendo menor a los resultados obtenidos en este estudio con el etanólico; además, observamos actividad contra el estafilococo, siendo comparables los resultados con los que obtuvieron Vlase et al. 2014 con el extracto etanólico de *Teucrium chamaedrys* (20 mm) y con los reportados por Chedia et al. 2013 con el extracto metanólico de *Teucrium polium* contra *P. aeruginosa* (15-16 mm) y *S. aureus* (10-13 mm) mediante el método de difusión en papel filtro. Así mismo, los resultados son comparables con los reportados por Sarac y Ugur 2007 donde probaron varios extractos etanólicos del género *Teucrium* tales como *T. chamaedrys*, *T. polium*, *T. divaricatum* spp. *villosum* mediante la técnica de difusión en papel filtro contra *S. maltophilia* ya que

ninguno tuvo actividad contra esta Gram negativa, aunque mediante la misma técnica, Zampini et al. 2005 utilizando el extracto etanólico de *Zuccagnia punctata* perteneciente a la familia Fabaceae si observaron actividad antimicrobiana contra la misma bacteria obteniendo halos de inhibición entre 15 a 25 mm. En el caso de la planta *M. malacophylla* no se han reportado estudios previos pese a que es utilizada la parte aérea (hojas) como medicinal (Alvarado et al. 2010). En especies de *Mimosa* como *M. pudica* si se ha evaluado su actividad antimicrobiana (Gandhiraja et al. 2009), como Tamilarasi y Ananthi 2012 mediante el método de difusión en pozo reportando halos de inhibición en un rango entre 13 mm y 17 mm utilizando el extracto etanólico de su hoja contra *P. aeruginosa*; estos resultados son mayores a los reportados contra la pseudomona utilizando los extractos de *M. maltophylla* en este estudio. En otras *Mimosa*, como los extractos etanólicos de las ramas de *M. brandegeei* y *M. xantii*, han mostrado actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, que aunque emplearon la prueba de difusión en papel filtro, generaron zonas de inhibición similares con rango entre 10 mm y 15 mm (Dimayuga et al. 1998; Sharma et al. 2016).

Con respecto a los resultados obtenidos en los ensayos CMI/CMB la cepa más sensible a los extractos fue *S. aureus* obteniendo rangos de CMI de 2.5 mg/mL a >30 mg/mL y de CMB de 2.6 mg/mL a >30 mg/mL de acuerdo al extracto probado, por otro lado, no se determinó la CMI/CMB de las cepas *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* debido a que la concentración requerida para inhibir a dichos microorganismos superó los 16 mg/mL y los 30 mg/mL de acuerdo a la cepa probada. Resultados similares de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *A. unedo* fueron reportados por Bouyahya et al. 2016, quienes obtuvieron CMI/CMB de 1 mg/mL y 4 mg/mL contra *S. aureus* y 8 mg/mL y >8 mg/mL contra *P. aeruginosa*; así como con los obtenidos por Jurica et al., en 2017 para el extracto acuoso 25.6 mg/mL y 51.2 mg/mL y para el metanólico >25.6 para ambas concentraciones respectivamente, de la hoja de *A. unedo* contra la dicha pseudomona. Por su parte, Chedia et al. 2013, utilizando el extracto metanólico de *T. polium* obtuvieron CMI/CMB de 25 mg/mL y 50 mg/mL contra *S. aureus*, siendo mayores a las reportadas en nuestro trabajo, sin embargo similares contra *P. aeruginosa* con valores de 12.5 mg/mL y 25 mg/mL respectivamente; y comparables con los resultados de Sghaier et al. 2007, trabajando con el aceite esencial de *Teucrium*

ramosissimum obteniendo una CMB de 2.5 mg/mL contra los estafilococos. Con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación con *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, la poca actividad de los extractos seguramente es debida al tipo de envoltura celular de dichos microorganismos ya que estos son del grupo de los Gram negativos los cuales tienen como límite una membrana externa que les confiere resistencia a la mayoría de los compuestos antimicrobianos tanto de origen químico/sintético como de origen natural, esta estructura rodea la pared celular cual restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través del lipopolisacárido, es decir, la hace impermeable a los solutos lipófilos, sin dejar de mencionar a las porinas que son proteínas que producen poros o canales inespecíficos que permiten el paso a pequeñas moléculas a través de la membrana externa por lo que constituyen una barrera selectiva ya que permiten el paso a solutos hidrofílicos <600 daltons (Nikaido y Vaara 1985); además, presentan otra estructura denominada espacio periplásmico la cual contiene enzimas que son capaces de descomponer moléculas extrañas introducidas desde el exterior por lo que las hace más insensibles al efecto antimicrobiano (Duffy y Power 2001; Laciari et al. 2009; Bouyahya et al. 2016). Resultados similares han sido reportados por diversos investigadores como Meckes et al. 1995, quienes probaron varios extractos incluyendo el extracto metanólico de la corteza de *A. xalapensis* y Orak et al. 2011 con el extracto metanólico de la hoja de *A. unedo*, ambas investigaciones contra *S. aureus* y *E. coli* donde reportaron actividad antimicrobiana contra el estafilococo pero no contra el coliforme, y mencionan que la pared de los microorganismos Gram positivos poseen una pared de peptidoglicano, que aunque gruesa, las moléculas antimicrobianas pueden filtrarse con cierta facilidad (Tortora et al. 2013). Además, concordando con Akrouf et al. 2010 y Chedia et al. 2013 existen bacterias que muestran zonas de inhibición importantes por el método de difusión pero no siempre son las que presentan CMI y CMB más bajos, como se observó en el caso de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, en el presente estudio y esto puede ser debido a la solubilidad del extracto, el rango de difusión en agar, la evaporación, la dosis, entre otros.

Los resultados antes mencionados también pueden estar condicionados en algunos casos al tipo de solvente utilizado en la extracción de los metabolitos secundarios

presentes en las plantas, ya que del acuoso se pueden obtener algunos como los taninos y los terpenoides, pero del etanólico se pueden obtener, aparte de los ya mencionados, flavonoles, polifenoles, esteroides y alcaloides (Pandey y Tripathi 2014) que son compuestos que pueden presentar actividad antimicrobiana, de acuerdo con Espinoza 2003, pues estos compuestos pueden inhibir o dañar la síntesis de la pared celular así como inhibir la síntesis de ADN/ARN por poseer estructuras similares a las purinas y pirimidinas que se intercalan con los ácidos nucleicos formando puentes de hidrógeno, alterando de esta forma su estructura tridimensional (Yáñez 2014). Sin embargo, no garantiza la obtención de mayor contenido fenólico, por lo mencionado por Orak et al. 2011, pues en su investigación encontró que fue más alto dicho contenido el extracto acuoso de hojas de madroño de *A. unedo* que en su etanólico, siendo el más bajo éste último. En otro estudio, Jurica et al. 2017 han mencionado que el contenido fenólico total más alto que midieron podría explicarse por el uso de extracción asistida por ultrasonido, que facilita la extracción de compuestos fenólicos rompiendo las paredes de las células de hoja de *A. unedo*. Cabe mencionar también que con el solvente metanólico se pueden extraer mayor diversidad de componentes que del etanol incluyendo antocianinas, lactonas, flavones, saponinas y fenoles entre otros; sin embargo, Tawaha et al. 2007 no observaron diferencias significativas entre los extractos acuosos y metanólicos para la actividad antioxidante o contenido fenólico total, donde incluye a *Arbutus andrachne*. En contraste, Khoddami et al. 2013 demostraron que el metanol era un mejor disolvente para la extracción de compuestos fenólicos que el agua, como se esperaba según los datos de la literatura. En el presente trabajo se eligió el etanol como solvente por los diferentes componentes que se pueden extraer a diferencia del acuoso, así como su baja toxicidad en el proceso del bioensayo con respecto al metanol (Pandey y Tripathi 2014).

Es importante mencionar por lo anterior que el efecto antimicrobiano reportado en esta investigación puede deberse a la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos. Se sabe que una amplia variedad de fenoles y flavonoides poseen propiedades antimicrobianas y, en muchos casos, esta actividad se debe a la presencia de constituyentes activos (Bouyahya et al. 2016) como los polifenoles. Las actividades biológicas de estos componentes están relacionadas con las estructuras de las moléculas;

por sus grupos hidroxilo o por los anillos fenólicos que contienen, los compuestos fenólicos tienen la capacidad de unirse con las proteínas y la membrana bacteriana para formar complejos (Zongo et al. 2011). Por ejemplo, los flavonoides, son metabolitos secundarios y la mayoría de estos tienen múltiples propiedades medicinales (Harborne y Williams 2000) ya que son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas y son efectivos contra una amplia gama de microorganismos (El et al. 2013) por lo que tienen actividades antivirales, antibacterianas, antifúngicas, entre otras actividades biológicas tales como inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) (Zongo et al. 2011; Tovar 2013). Exhiben sus acciones a través de efectos sobre la permeabilidad de la membrana y la inhibición de enzimas unidas a la membrana como la ATPasa y fosfolipasa A2 (Akinpelu et al. 2009). Otros componentes son los taninos que están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas, esta capacidad es la base para sus dos propiedades principales: capacidad de curtir la piel y poder astringente (Manrique 2014) son polifenoles que están ampliamente en plantas y que se ha demostrado que poseen fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Ho et al. 2001). En nuestro estudio los metabolitos secundarios mencionados anteriormente fueron detectados de en las pruebas fitoquímicas preliminares y presumiblemente se les atribuyen la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja y tallo de *A. xalapensis*, y en la raíz de *T. cubense* principalmente. Resultados similares son reportados por El et al. 2013 en el examen fitoquímico de 3 fracciones de la raíz de *A. unedo* donde detectaron presencia de quinonas, antraquinonas reductoras, compuestos, antocianinas, taninos y flavonoides confirmando alto contenido de polifenoles así como otros investigadores que previamente mediante estudios fitoquímicos han demostrado que el extracto de hoja de esta especie contiene compuestos antioxidantes fenólicos, como flavonoides, taninos, glucósidos fenólicos, antocianinas, entre otros (Maleš et al. 2006; Fiorentino et al. 2007). Sin embargo, no se detectaron alcaloides, saponinas y cumarinas (El et al. 2013) siendo similar a lo observado en nuestro estudio, a excepción de las cumarinas. Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios conocido para usos medicinales desde hace siglos y una de sus propiedades biológicas comunes es su toxicidad contra las células de

organismos extraños (Akinpelu et al. 2009), estos metabolitos poseen estructuras complejas de propiedades alcalinas con átomos de nitrógeno en anillos heterocíclicos que se encuentran normalmente en las hojas de especies vegetales (Jara 2013); sin embargo, no se detectaron con el reactivo de Dragendorff (Verde et al. 2016) en nuestros extractos y de acuerdo con Zongo et al. 2011 su ausencia tiende a indicar que las actividades antimicrobianas podrían atribuirse a compuestos fenólicos. Otras como las saponinas, que son compuestos con actividad hemolítica, causando la ruptura y la liberación de pigmentos de hemoglobina característicos, tampoco fueron detectadas en la prueba preliminar para saponinas (Pandey y Tripathi 2014; Verde et al. 2016) pero en otras especies como *Elaeoluma nuda* se pueden encontrar en hojas y ramas y en cuyo extracto metanólico están presentes otros como fenoles, flavonoides y taninos, también cabe mencionar que en su estudio con *Paypayrola grandiflor* demostraron que posee compuestos fenólicos, pero no taninos ni saponinas (Oliveira et al. 2009). El análisis fitoquímico realizado sobre el extracto de *Jatropha curcas* reveló presencia de taninos, alcaloides, esteroides y saponinas, mientras que el extracto de hoja de *Newboulda laevis* contiene flavonoides, taninos y alcaloides (Akinpelu et al. 2009). Existen otros estudios como el que realizó Jara 2013 con el extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* donde fueron detectados en pruebas fitoquímicas preliminares las cumarinas además de alcaloides, flavonoides, taninos. En el presente trabajo se detectaron cumarinas en todos los extractos, éstas son sustancias fenólicas hechas de anillos de benceno fusionados y α -pyrone poseen un olor característico y varios de ellos tienen propiedades antimicrobianas (Das et al. 2010) por lo que no se descarta su actividad en la presente investigación. En lo que respecta a la familia Fabaceae, a la que pertenece el género *Mimosa*, se han detectado compuestos fenólicos, saponinas y terpenoides, que podrían ser responsables de algunas de sus propiedades medicinales (Bhalodia y Shukla 2011). Tamilarasi y Ananthi 2012 mencionaron que el efecto producido en *P. aeruginosa* utilizando el extracto metanólico de *M. pudica* fue debido a la actividad de alcaloides y taninos presentes en el extracto y en el análisis fitoquímico preliminar del extracto de etanol mostró la presencia de esteroides, carbohidratos, saponinas, flavonoides y taninos, exhibiendo actividad antimicrobiana, mientras que Gandhiraja et al. 2009 mediante el tamizaje fitoquímico preliminar del extracto de esa especie mostró

la presencia de componentes bioactivos como terpenoides, flavonoides, glucósidos, alcaloides, quininas, fenoles, taninos, saponinas y cumarinas. Esto contrastando con lo detectado en nuestro estudio con los extractos de hoja y tallo de *M. malacophylla*. Por otra parte, la familia Lamiaceae que incluye más de 3000 especies de plantas (principalmente pastos y arbustos) distribuidos en las regiones cálidas y tempestuosas del mundo y a la que pertenece el género *Teucrium* deben su fragancia y algunas de sus propiedades medicinales principalmente a la presencia de compuestos terpénicos como cineol, limoneno, mentol o timol, entre otros (Sharma et al. 2016). Las especies del género *Teucrium* son muy ricas en compuestos fenólicos con una actividad biológica muy fuerte (Chedia et al. 2013). Desde el punto de vista fitoquímico, varios estudios han informado de que este género es rico en diterpenoides, flavonoides, saponinas, taninos y aceite volátil han sido identificados (Vera et al. 2010). Esto es demostrado en un estudio previo Alonso-Castro *et al.*, en 2010 donde realizaron la caracterización química inicial extracto acuoso *T. cubense* mostrando que estas preparaciones contienen niveles más altos de alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos que los contenidos reportados para otras plantas antidiabéticas, siendo similares a los detectados en los extractos etanólicos de hoja, tallo y raíz de esta planta excepto por la presencia de alcaloides. Chedia et al. 2013 comprobaron altos contenidos de compuestos fenólicos totales en el extracto metanólico de *T. polium* que mencionan pueden contribuir a importantes actividades antirradicales y antimicrobianas refiriéndose además a que los hallazgos justifican el uso de diferentes órganos de plantas de las especies estudiadas en general, su área de distribución en el mundo por poblaciones humanas locales antiguas y reales. Con respecto al contenido de polifenoles, el extracto de especies de *Teucrium* de Rumania fue más rico que los extractos de hoja *T. chamaedrys* de Serbia, Montenegro y Turquía aunque ésta última tuvo una mayor concentración de flavonoides en comparación a la de Rumania (Stanković et al. 2010; Vlase et al. 2014). Por lo que de acuerdo con lo anterior, la presencia de principios activos depende de una serie de factores que incluyen la especie de la planta, los factores genéticos, la ubicación geográfica, condiciones de crecimiento, el tipo de suelo, la época y la temporada de cosecha, la forma en que se prepara, seca y almacena (Vlase et al. 2014). En nuestra investigación se detectaron ciertas diferencias con respecto a los metabolitos o grupos

funcionales identificados en relación a la parte de la planta en cuestión similar a Martínez et al. 2002, donde los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo, con excepciones de gran cantidad de estos componentes en los tubérculos de las cebollas, nosotros detectamos estos en tallo de *A. xalapensis* y *T. cubense*, también en la raíz de la Lamiaceae, y solo en hoja de *M. malacophylla*. Por lo tanto, varios estudios han reportado actividades antimicrobianas de extractos de plantas de varias partes como hojas, semillas y flores (Zongo et al. 2011). Flavonas, flavonoides y flavonoles son estructuras fenólicas con un grupo carbonilo. Son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección microbiana y con frecuencia se encuentran efectivos *in vitro* como sustancia antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos (Das et al. 2010). También las fitoalexinas que comprenden un amplio espectro de polifenoles, flavonoides y otros compuestos antimicrobianos de tipo proteico se sintetizan en las células y lugares de la planta sometidos al ataque microbiano directo, pero puede extenderse a las células adyacentes y a toda la planta. Por tanto, ayudan a controlar la infección original y también protegen a la planta contra nuevas infecciones microbianas como las raíces que liberan materiales orgánicos tales como aminoácidos, cetoácidos, vitaminas, azúcares, taninos, alcaloides, fosfolípidos y otras sustancias (Atlas y Bartha 2002).

Por lo que a través de las pruebas fitoquímica de los extractos, es posible determinar la presencia de diferentes clases de metabolitos secundarios que muestran una amplia variedad de actividades biológicas, como antimicrobianos (Zongo et al. 2011). Por lo expuesto anteriormente, los compuestos antimicrobianos de las plantas pueden inhibir el crecimiento bacteriano por diferentes mecanismos por lo que pueden tener un valor clínico significativo en el tratamiento de cepas microbianas resistentes. En especial los aceites y extractos vegetales son base de muchas aplicaciones, incluidas la conservación de alimentos tanto crudos como procesados, los productos farmacéuticos, la medicina alternativa y las terapias naturales (Chedia et al. 2013). Por lo tanto, respaldan las actividades antimicrobianas de los extractos utilizados en este estudio.

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS^{•+} se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam et al. 2013). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados (Tovar 2013).

El radical DPPH es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, no se dimeriza como en el caso de la mayoría de los radicales libres (Mishra et al. 2012); además es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica (Tovar 2013). La prueba con DPPH mide la capacidad de una sustancia para donar radicales de hidrógeno a este radical, por lo tanto, cuanto mayor sea el número de hidroxilos presentes en la muestra, mayor será su actividad antioxidante (Duarte et al. 2006; Pieroni et al. 2011); también el mecanismo de reacción del DPPH con los antioxidantes está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejor actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH está impedido estéricamente (Beserra et al. 2011). Por lo anterior, es probable que algunos componentes presentes en el extracto no hayan captado al radical DPPH pero si al radical ABTS^{•+}, ya que este último es captado por los electrones transferidos de los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos (Wootton et al., 2011) lo que hace que se pueda medir una mayor capacidad antioxidante.

En lo que respecta a la capacidad antioxidante, se encontró una alta correlación entre ambos ensayos (DPPH y ABTS^{•+}), tal como se observó en otras investigaciones (Babbar et al. 2011; Floegel et al. 2011), lo cual muestra que los extractos evaluados tienen actividades comparables por ambos métodos y por tanto que estos son reproducibles al

momento de medir la actividad antioxidante (Tovar 2013). Atendiendo esta última observación, los extractos de hoja y tallo de *A. xalapensis* presentaron mayor capacidad para captar tanto el radical DPPH como el radical ABTS^{•+}, siendo los de menor capacidad antioxidante los extractos de hoja y tallo de *M. malacophylla* en comparación con los demás extractos en este estudio. Cabe mencionar que fue mayor la captación del radical ABTS^{•+} con respecto al del radical DPPH en todos los extractos, lo cual concuerda con lo antes mencionado y con los resultados reportados por Floegel et al. 2011, donde compararon los métodos ABTS^{•+} y DPPH probando 50 frutas, vegetales y bebidas ricas en antioxidantes de la dieta de los Estados Unidos de Norteamérica, reportando que en el extracto metanólico de la espinaca encontraron hasta 2.06 veces más capacidad antioxidante con el reactivo ABTS^{•+} con respecto al DPPH, esto también concuerda con el trabajo hecho por Tovar 2013 donde determinó la actividad antioxidante mediante los reactivos DPPH y ABTS^{•+} de 30 plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera de Colombia, en este estudio se reportó que para el extracto metanólico de *Alchornea grandis* se encontró hasta 19.57 veces más la captación del radical ABTS^{•+} con respecto al DPPH.

Con respecto a esto, en el presente trabajo se determinó que la captación del radical ABTS^{•+} fue de 1.68 veces mayor a la del DPPH, para el extracto de *A. xalapensis*, lo cual se puede explicar debido a que este método se basa en la transferencia de electrones; por lo que los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos, donan uno o dos electrones para reducir el radical catión, dando una medida precisa de la capacidad antioxidante total en el punto final de reacción (Wootton et al. 2011; Tovar 2013) y además a que puede medir la actividad de compuestos antioxidantes tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Madrigal et al. 2013) o a que la actividad antioxidante fenólica como el ácido cumárico y el ácido isoferúlico, posiblemente presentes en el extracto, se encuentran inactivos hacia el DPPH y se pueden encontrar de manera significativa activos hacia ABTS^{•+} e incluso más activos que ciertos homólogos difenólicos (Nenadis et al. 2004).

Nuestros resultados también son comparables con los de Borchardt et al. 2008 donde evaluaron, mediante el método de DPPH, la capacidad antioxidante de semillas

(trituradas y algunas diluidas en polvo de celulosa) de 150 especies de plantas diferentes de la cuenca del río Mississippi pertenecientes a 45 familias entre las que incluyen Lamiaceae y Fabaceae reportando resultados desde 85.91 $\mu\text{moles ET/g}$ hasta 257.89 $\mu\text{moles ET/g}$ para la primera y desde 32.80 $\mu\text{moles ET/g}$ hasta 584.48 $\mu\text{moles ET/g}$ para la segunda familia; cabe señalar que en nuestro caso los extractos de *T. cubense* (hoja, tallo y raíz), que pertenece a la familia Lamiaceae, arrojaron valores de 201.2 ± 8.0 $\mu\text{moles ET/g}$ hasta 319.3 ± 16.3 $\mu\text{moles ET/g}$ y los extractos de *M. malacophylla* (hoja y tallo), perteneciente a la familia Fabaceae, tuvieron valores desde 67.2 ± 3.3 $\mu\text{moles ET/g}$ hasta 136.0 ± 3.0 $\mu\text{moles ET/g}$. Los extractos etanólicos de hoja, tallo y raíz de *T. cubense*, en este estudio, tuvieron valores de 201.2 ± 8.0 $\mu\text{moles ET/g}$, 288.6 ± 31.7 $\mu\text{moles ET/g}$ y 319.3 ± 16.3 $\mu\text{moles ET/g}$ respectivamente para captar el radical DPPH, que son más elevados que el del extracto etanólico de la planta *Teucrium chamaedrys* con valor de 87.77 ± 0.33 $\mu\text{moles ET/g}$ de captación de éste radical (Vlase et al. 2014), argumentando que es muy probable que sea debido a un mayor contenido de polifenoles principalmente.

En otro estudio Tawaha et al. 2007 reportaron que los extractos acuoso y metanólico de *Arbutus andrachne* mostraron los más altos niveles de actividad antioxidante contra el radical ABTS^{•+} con valores de 731 ± 5.4 $\mu\text{moles ET/g}$ y 720 ± 2.7 $\mu\text{moles ET/g}$ de peso seco; mientras que los más bajos niveles fueron de los extractos, acuoso y metanólico de *Cicer aretinum* (15.3 $\mu\text{moles ET/g}$ y 10.1 $\mu\text{mol ET/g}$ de peso seco), y del extracto acuoso de *Linum pubescens* (12.9 $\mu\text{mol ET/g}$ de peso seco) de un total de 51 especies de plantas seleccionadas de Jordania; además, Legssyer et al. 2004 mencionaron que esta actividad es debida a la presencia de compuestos polifenólicos como los taninos condensados y galatos de catequina, los cuales ya han sido reportados en el género *Arbutus*. En este estudio se confirma que dicho género tiene muy buena actividad antioxidante debido a los altos niveles de captación del radical ABTS^{•+} presentados por *A. xalapensis*, fueron casi 3 veces mayores que los reportados por Legssyer et al. 2004 en la planta *A. andrachne*. También obtuvieron resultados del extracto acuoso y metanólico del género *Teucrium*, reportando la capacidad antioxidante de *T. polium* frente al radical ABTS^{•+}, con valores de 42.3 ± 1.5 $\mu\text{moles ET/g}$ y 84.4 ± 2.8 $\mu\text{moles ET/g}$ respectivamente; mientras que en este trabajo se reporta que los

extractos etanólicos de hoja, tallo y raíz del mismo género pero de la especie, *T. cubense*, presenta valores 5 a 10 veces mayores.

Además en la presente investigación se observa relación entre la actividad antimicrobiana y la antioxidante, lo que también está directamente relacionado a la polaridad del solvente utilizado para obtener el extracto (Contreras 2015), ya que la capacidad antimicrobiana y antioxidante observada es atribuida a compuestos de tipo fenólico, como los flavonoides, los cuales se caracterizan por tener una polaridad alta debido a la gran cantidad de electrones en resonancia alrededor de su estructura. Por otro lado, los flavonoides interactúan con las membranas celulares, modificando las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas de éstas, alterando su permeabilidad y los procesos dependientes de la misma, además pueden cambiar la composición de los ácidos grasos o el contenido de fosfolípidos e incluso interactuar con las proteínas de membrana. Los cambios celulares, como los antes mencionados inducidos por flavonoides, pueden ser cruciales para su actividad farmacológica empleada en el tratamiento de ciertas enfermedades (Saija et al. 1995; Sulaiman y Hussain 2012).

En cuanto a la citotoxicidad de los extractos seleccionados por su capacidad antioxidante y antimicrobiana, se observó que los extractos probados a 1000 ppm presentaron una toxicidad baja de acuerdo con el criterio de Karimi et al. 2011, que reportaron una hemólisis leve ($< 6\%$) en eritrocitos de machos Wistar, suspendidos en PBS, ya que dicha hemólisis, mencionan, podría estar relacionada con el estrés mecánico de la agitación (3000 rpm, 10 min, 22°C) pues los extractos acuoso y metanólico de las plantas *Nigella sativa* y *Portulaca oleracea* no indujeron ninguna hemólisis significativa en comparación con el PBS en su estudio. En un estudio similar, Vinjamuri *et al.*, en 2015, realizaron ensayos del extracto hexánico de hojas de *Bridellia ferruginea* Benth reportando efecto hemolítico en concentraciones >20 ng/mL, por lo que al comparar dichos resultados con los obtenidos en la presente investigación donde probamos concentraciones de 5 a 500 veces mayores, podemos considerar que ninguno de nuestros extractos es significativamente hemolítico ($p \leq 0.05$), lo cual concuerda con Lakshmi et al. 2014, donde reportaron que el extracto metanólico de hoja de *Nymphaea nouchali* no mostró actividad hemolítica en concentraciones de 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$ ($< 2.5\%$). En

otro estudio, Oliveira et al. 2009 reportaron que el extracto metanólico de hoja de *Elaeoloma nuda* presentó acción hemolítica a una concentración de 500 µg/mL (ó 500 ppm), mientras que los extractos metanólico y acuoso de las ramas de la misma especie presentaron acción hemolítica a concentraciones de 250 µg/mL (ó 250 ppm) debido presumiblemente a la actividad hemolítica de las saponinas ya que estos metabolitos producen cambios en la membrana eritrocitaria causando ruptura y liberación de los pigmentos característicos de la hemoglobina; y en el examen fitoquímico preliminar se reveló que las hojas y ramas de *E. nuda* contenían este tipo de compuestos. Cabe mencionar que de los solventes como metanol y el agua se pueden obtener compuestos activos como las saponinas, mientras que del etanol no necesariamente (Pandey y Tripathi 2014) esto explica posiblemente el por qué no presentan actividad hemolítica de forma significativa (<3.1 %) los extractos etanólicos en la presente investigación.

En lo que respecta a la citoprotección de los eritrocitos humanos, los extractos seleccionados tuvieron importante actividad protectora de hasta un 100 %; estos resultados son comparables con los obtenidos en el estudio realizado por García et al. 2016, donde midieron el efecto protector de los extractos metanólicos del orujo de uva, ante la hemólisis inducida por el generador de radicales (AAPH), observando una inhibición significativa dependiente de la concentración y alcanzando valores de 85 - 95 %, explicando que la mayor actividad protectora del extracto se puede atribuir a los altos valores de contenido fenólico total y a que los extractos poseen efectos antioxidantes que se reducen al eliminar los radicales libres; por otro lado Chiang et al. 2013, probaron el efecto protector del extracto acuosos de tallo de *Flemingia macrophylla* frente a la hemólisis inducida por AAPH, en eritrocitos de ratas macho Sprague-Dawley, obteniendo resultados en la segunda y tercer hora de su periodo de incubación del 85 al 95 % y 95 al 100 % de inhibición de hemólisis respectivamente, en este estudio se menciona que el efecto protector depende de la dosis y del tiempo de incubación, además se hace una correlación del efecto protector con la potente capacidad antioxidante de los extractos; por lo que cabe mencionar que, aunque el extracto de tallo de *A. xalapensis* presentó una excelente capacidad antioxidante mediante los métodos de DPPH y ABTS^{•+}, en el ensayo de AAPH no alcanzó el 100 % de protección, debido probablemente al tipo de radicales generados, por lo que es importante recalcar que los

compuestos azoicos, como el AAPH, son útiles para estudiar el daño inducido por radicales libres en moléculas, membranas biológicas, y en la inhibición de la formación de radicales libres en sistemas modelo aun cuando no estén presentes en sistemas biológicos (Pieroni et al. 2011), ya que la descomposición de este compuesto da lugar a nitrógeno molecular y radicales alquilo (R^{\bullet}) que reaccionan con el oxígeno molecular para dar lugar a radicales peroxilo (ROO^{\bullet}) (Chisté et al. 2014); los cuales son los responsables de atacar predominantemente las membranas eritrocitarias y en una cierta etapa durante la oxidación, estos radicales permean las células (Shankar et al. 2007) provocando hemólisis. Por otro lado, el efecto citoprotector de los extractos seleccionados parece estar relacionado con su capacidad antioxidante ya que Chaudhuri et al. mencionan que los polifenoles parecen ser los responsables de la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo* y se ha sugerido la capacidad de ciertos polifenoles, como los flavonoides, que por su lipofilia, pueden repartirse en las membranas celulares y la restricción resultante de su fluidez pudiera obstaculizar estéricamente la difusión de radicales libres, disminuyendo así la cinética de las reacciones de los radicales libres (Chaudhuri et al. 2007). Además los polifenoles pueden extraerse con los solventes adecuados, y por el hecho de que los extractos no resultaron tóxicos para eritrocitos humanos se sugiere que los extractos con actividad antimicrobiana relevante puedan ser considerados con fines farmacológicos.

9. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los extractos etanólicos de las plantas en estudio en la presente investigación se concluye que:

El extracto de hoja de *T. cubense* fue el que presentó mayor rendimiento (20.4%).

El extracto de raíz de *T. cubense* fue el que presentó mayor inhibición contra *S. aureus* y *S. maltophilia* con un diámetro de inhibición de 16.7 ± 0.6 mm y 16.3 ± 0.6 mm respectivamente y para *P. aeruginosa* fue el de tallo de *A. xalapensis* con 17.2 ± 1.0 mm.

El extracto de tallo de *A. xalapensis* mostró la mayor actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* con CMI y CMB de 2.5 ± 0.2 mg/mL y 2.6 ± 0.3 mg/mL respectivamente.

Los extractos de hoja y tallo de *A. xalapensis* fueron los de mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS^{•+} con valores de $1,206.6 \pm 68.6$ μ moles ET/g y $1,112.131 \pm 70.6$ μ moles ET/g, y $1,750.7 \pm 110.1$ μ moles ET/g y $1,864.0 \pm 135.6$ μ moles ET/g respectivamente.

El extracto de tallo de *A. xalapensis* fue el que presentó mayor hemólisis con un 3.1 ± 0.4 % a una concentración de 1,000 ppm, no siendo significativa.

Los extractos de *A. xalapensis* y *T. cubense* tuvieron importante actividad protectora de hasta un 100 % a concentraciones de 400 y 600 ppm contra la hemólisis inducida por AAPH.

Las plantas *A. xalapensis* y *T. cubense* mostraron resultados prometedores antimicrobianos y antioxidantes como posibles tratamientos y/o coadyuvantes para el control de enfermedades infecciosas causadas por estos microorganismos.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda continuar con el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *A. xalapensis* y *T. cubense* para otras bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como para otros microorganismos tales como levaduras, hongos y parásitos de importancia médica.

Se sugieren realizar análisis químicos cuantitativos de los extractos con mayor capacidad antioxidante para determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos y cumarinas principalmente.

Es importante que se pueda llevar a cabo la separación y fraccionamiento principalmente del tallo de *A. xalapensis* y la raíz de *T. cubense* para un posible aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos.

Es relevante determinar la función plaquetaria y antiinflamatoria de los extractos que tuvieron importante actividad antimicrobiana y antioxidante.

Los extractos de tallo y hoja de *A. xalapensis* y la raíz de *T. cubense* por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, no hemolíticas y citoprotectora son sugeridos para posteriores estudios en líneas celulares, modelos animales, y con fines farmacológicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar FEJ, 2014. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las hojas de *Satureja breviculix* EPL. In *Crescendo* 1, 407-413.
- Akinpelu DA, Aiyegoro OA, Okoh AI. 2009. The bioactive potentials of two medicinal plants commonly used as folklore remedies among some tribes in West Africa. *African Journal Biotechnology* 8, 1660-1664.
- Akrout A, El J, Amouri S, Neffati M. 2010. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso. *Recent Research in Science and Technology* 2, 29-39.
- Al-Hashem FH. Gastroprotective effects of aqueous extract of *Chamomilla recutita* against ethanol-induced gastric ulcers. 2010. *Saudi Medical Journal*. 31: 1211-1216.
- Al-Snafi AE. 2015. Therapeutic properties of medicinal plants: a review of their detoxification capacity and protective effects (Part 1). *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 5, 257-270.
- Alam, N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143-152.
- Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Romo-Yañez, J., Camarillo-Ledesma, P., Gómez-Sánchez, M., Salazar-Olivo, L.A., 2010. The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 1-6.
- Alvarado M, Rocha A, Moreno S. 2010. De la Lechuguilla a las Biopelículas Vegetales.

Universidad Autónoma de Nuevo León: Monterrey, pp. 20-583.

Ancheta J, Guzman M. 2011. Efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo de ratones. Tesis de Doctorado en Medicina. Universidad Dr. José Matías Delgado. Facultad de Ciencias de la Salud. San Salvador, pp. 1-66.

Atlas RM, Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación S. A.: Madrid, pp. 3-667.

Babae F, Safaeian L, Zolfaghari B, Javanmard SH. 2016. Cytoprotective Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pinus eldarica* Bark against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. Iranian Biomedical Journal 20, 161-167.

Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Research International Journal 44, 391-396.

Beserra MMA, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, de Carvalho Magalhães CE, Maia GA, de Lemos TLG. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Research International 44, 2155-2159.

Bhalodia NR, Shukla VJ. 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research 2, 104-109.

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of stable radical. Nature 4617, 1199-1200.

Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NJ, Biesboer

- DD, Bey RF. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research* 2, 81-93.
- Bouyahya A, El, MN, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *British Biotechnology Journal* 14, 1-10.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 25-30.
- Cantillo J, Güette J, Baldiris R, Jaramillo B, Olivero J. 2007. Evaluación de la Toxicidad Aguda (CL50) frente a *Artemia franciscana* y la Actividad Hemolítica de los Extractos Acuáticos, en Diclorometano y Metanólico parcial de *Justicia secunda* (Vahl.). *Science & Technology* 257-258.
- Castro C, Villa N, Ramírez S, Mosso C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19, 101-120.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 42-48.
- Chedia A, Ghazghazi H, Brahim H, Abderrazak M. 2013. Secondary Metabolite, antioxidant and Antibacterial Activities of *Teucrium polium* L. Methanolic Extract. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 4, 1790-1797.
- Chiang HM, Chiu HH, Liao ST, Chen YT, Chang HC, Wen KC. 2013. Isoflavonoid-Rich *Flemingia macrophylla* Extract Attenuates UVB-Induced Skin Damage by

Scavenging Reactive Oxygen Species and Inhibiting MAP Kinase and MMP Expression. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013, 1-12.

Chisté RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. 2014. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. Life Sciences 99, 52-60.

Contreras PJE. 2015. Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC (Asteraceae). Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Facultad de Ciencias y Educación. Bogotá, pp. 1-50.

Costa RM, Magalhães AS, Pereira JA, Andrade PB, Valentão P, Carvalho M, Silva, BM. 2016. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study... Food and Chemical Toxicology 47, 860-865.

Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research 4, 104-111.

De Saravia SG, Borrego S, Lavin P, Valdés O, Vivar I, Battistoni P, Guiamet P. 2012. Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultural, in: VII Congreso de Medio Ambiente. La Plata, Argentina, Mayo 22-24.

Dimayuga RE, Virgen M, Ochoa N. 1998. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. Journal of Ethnopharmacology 36, 1: 33-43.

- Duarte-Almeida, JM, dos Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 446-452.
- Duffy CF, Power RF. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 527-529.
- El M, Dib A, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N. 2013. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society* 17, 381-385.
- Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr, SA, Nagy AA, Abdel-Sattar E. 2015. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus* 3, 37-44.
- Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso N, Valdivia E, Rodríguez R, Neyra K. 2010. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 76, 73-79.
- Espinoza I. 2003. Análisis fitoquímicos y actividad antibacteriana de *Tillandsia revurvata*. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciencias Biológicas y de la Salud. México, pp. 1-30.
- Fiorentino A, Castaldi S, Abrosca BD, Natale A, Carfora A, Messere A, Monaco P. 2007. Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 809-811.

- Floegel A, Kim D, Chung S, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 1043-1048.
- Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1925-1941.
- Fukumoto LR, Mazza G. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3597-3604.
- Gandhi VM, Cherian KM. 2000. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicology in Vitro* 14, 513-516.
- Gandhiraja N, Sriram S, Meena V, Srilakshmi JK, Sasikumar C, Rajeswari R. 2009. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of the Plant Extracts of *Mimosa pudica* L. Against Selected Microbes. *Ethnobotanical Leaflets* 13, 618-624.
- García-Becerra L, Mitjans M, Rivas-Morales C, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Vinardell MP. 2016. Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry* 194, 1081-1088.
- García BL, Verde SJ, Castro RR, Chávez MA, Oranday CA, Núñez GA, Rivas MC. 2010. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41, 28-36.
- Godínez-Caraballo D, Volpato G. 2008. Plantas medicinales que se venden en el mercado El Río, Camagüey, Cuba. *Revista mexicana de Biodiversidad* 79, 217-

241.

Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.

Hernández-Rodríguez P, Pabón BL, Rodríguez AM. 2015. Propiedades químicas y biológicas de *Arbutus unedo*: Una planta con potencial medicinal. *Revista Cubana de Farmacia* 49, 144-155.

Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC. 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 187–191.

Huamán O, Sandoval M, Arnao I, Béjar E. 2009. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina* 70(2): 97-102.

Jacobo-Salcedo MR, Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA, Carranza-Álvarez C, González-Espíndola LA, Domínguez F, Maciel-Torres SP, García-Lujan C, González-Martínez MR, Gómez-Sánchez M, Estrada-Castillón E, Zapata-Bustos R, Medellín-Milán P, García-Carrancá A. 2011. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Mexican Medicinal Plants. *Natural Product Communications* 6, 1925-1928.

Jara A. 2013. Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de Ciencias aplicadas y ambientales Facultad de Ciencia y Tecnología Química. Bogotá, pp. 1-61.

Jin SI, Kim HJ, Jeong JH, Jin DE, Choi SG, Heo HJ. 2014. Nutritional composition and cytoprotective effect of *Moringa oleifera* Lam. *Korean Journal of Food Science*

and Technology 46, 609-615.

Jurica K, Gobin I, Kremer D, Čepo DV, Grubešić RJ, Karačonji IB, Kosalec I. 2017. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. Journal of Herbal Medicine 8, 17-23.

Kadri A, Zarai Z, Békir A, Gharsallah N, Damak M. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. African Journal of Biotechnology 10, 3908-3914.

Karimi G, Aghasizadeh M, Razavi M, Taghiabadi E. 2011. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Nigella sativa* L. and *Portulaca oleracea* L. on free radical induced hemolysis of RBCs. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 19, 295-300.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules 18, 2328-2375.

Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicologic Pathology 30, 620-650.

Kumar G, Karthik L, Venkata K, Rao B. 2011. Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an in vitro study. 3 Biotech 40, 5534-5537.

Laciar A, Ruiz MLV, Flores RC, Saad JR. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). Revista Argentina de Microbiología 41, 226-231.

Lakshmi G, Smitha N, Ammu S, Priya C, Bhaskara RKB. 2014. Phytochemical profile,

in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea nouchali* Linn: an in vitro study. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6, 584.

Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V, Fourneau C, Laurens A, Hoerter J, Fischmeister R. 2004. Tannins and Catechin Gallate Mediate the Vasorelaxant Effect of *Arbutus unedo* on the Rat Isolated Aorta. Phytherapy Research. 894, 889-894.

Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, Mehmood A, Azhar S, Atif M, Karim S, Altaf Y, Tariq I. 2014. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13, 1561-1561.

Madrigal-Santillán E, Fragoso-Antonio S, Valadez-Vega C, Solano-Solano G, Pérez CZ, Sánchez-Gutiérrez M, Izquierdo-Vega JA, Gutiérrez-Salinas J, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, Sumaya-Martínez T, Fregoso-Aguilar T, Mendoza-Pérez J, Morales-González JA. 2012. Investigation on the protective effects of cranberry against the DNA damage induced by benzo[a]pyrene. Molecules 17, 4435-4451.

Madrigal-Santillán E, García-Melo F, Morales-González JA, Vázquez-Alvarado P, Muñoz-Juárez S, Zuñiga-Pérez C, Sumaya-Martínez MT, Madrigal-Bujaidar E, Hernández-Ceruelos A. 2013. Antioxidant and anticlastogenic capacity of prickly pear juice. Nutrients 5, 4145-4158.

Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Sumaya-Martínez MT, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, Morales-González Á, González-Rubio MG, Aguilar-Faisal JL, Morales-González JA, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I. 2014. Review of natural products with hepatoprotective effects. World Journal Gastroenterology 20, 14787-14804.

- Maleš Ž, Plazibat M, Vundac B, Žuntar I. 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae)*. *Acta Pharmaceutica* 56, 245–250.
- Manrique PEH. 2014. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "Nogal peruano". Tesis de Licenciatura en Química Farmaceutica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, pp.1-64.
- Martinez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J., 2002. Revisión. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 271-278.
- Meckes M, Villarreal ML, Tortoriello J, Berlin B, Berlin EA. 1995. A Microbiological Evaluation of Medicinal Plants Used by the Maya People of Southern Mexico. *Phytotherapy Research* 9, 244-250.
- Mesa-Vanegas M, Gaviria C, Cardona F, Sáez-Vega J, Trujillo SB, Rojano B. 2010. Antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum* genus. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15, 13-26.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036-1043.
- Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. 2004. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS⁺ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4669-4674.
- Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiological Reviews* 49, 1-32.

- Oliveira, V.M.A.D., Carneiro, A.L.B., Cauper, G.S.D.B., Pohlit, A.M., 2009. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amaz.* 39, 973-980.
- Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinci N. 2011. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Potential of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf. *Food Science and Biotechnology* 20, 1249-1256.
- Pandey A, Tripathi S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 115, 115-119.
- Pérez-Portero Y, Vásquez-Dávila MA, López FS, Leblanch ER, Bou YB. 2009. Plantas Antidermatofíticas, utilizadas en comunidades costeras del municipio Guamá, Santiago de Cuba. *Etnobiología* 7, 56-62.
- Pérez Márquez U, Murillo G, Tur E, Vinardell MP, Simón G, Pascual G. 2003. Evaluación de la irritación ocular mediante un ensayo de hemólisis y desnaturalización de la hemoglobina in vitro. *Revista de Toxicología* 20, 193-198.
- Pieroni LG, De Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. 2011. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 16, 9439-9450.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved... *Free Radical Biology & Medicine* 6, 1231-1237.
- Román-Ramos R, Flores-Sáenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A, Alarcón-

- Aguilar F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some anti-diabetic plants. *Archives of Medical Research* 22, 87-93.
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. 1995. Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of their Interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 481-486.
- Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. 2013. Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista de Protección Vegetal* 28, 204-210.
- Sandoval-Vegas M, Huamán-Guitierrez O, Oré-Sifuentes R, Loli-Ponce A, Ayala-Pío S. 2010. Efecto antioxidante y citoprotector del *Solanum tuberosum* (papa) en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *Anales de la Facultad de Medicina* 71, 6-11.
- Sarac N, Ugur A. 2007. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences* 4, 28-37.
- Sghaier MB, Chraief I, Skandrani I, Bouhlel I, Boubaker J, Kilani S, Neffati A, Mahmoud A, Hammami M, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. 2007. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae). *Chemistry & Biodiversity* 4, 1480-1486.
- Shankar CSS, Subramanyam MVV, Vani R, Devi SA. 2007. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro* 21, 1355-1364.
- Sharma A, Flores-Vallejo RC, Cardoso-Taketa A, Villareal ML. 2016. Antibacterial

Activities of Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 1-66.

Stanković M, Topuzović M, Marković A, Pavlović D, Solujić S, Nićiforović N, Mihailović V. 2010. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Different *Teucrium chamaedrys* L. extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 82-86.

Sulaiman AA, Hussain SA. 2012. Concentration and time dependent cytoprotective effects of anthocyanins against oxidative hemolysis induced by water and lipid soluble free radical initiators: an in vitro study. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* 1, 133-140.

Tamilarasi T, Ananthi T. 2012. Phytochemical Analysis and Anti Microbial Activity of *Mimosa pudica* Linn. *Research Journal of Chemical Sciences* 2, 72-74.

Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *J. Food Chemistry* 104, 1372-1378.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2013. *Microbiology An Introduction*. Pearson: New York, pp 68-69.

Tovar RJ. 2013. Determinación de la Actividad Antioxidante por DPPH y ABTS de 30 Plantas Recolectadas en la Ecorregión Cafetera. Tesis de Licenciatura en Química Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Pereira, pp. 1-133.

Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González MA, Rivera-Guillén MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. 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 Farmaceuticas 44, 24-30.

Vera-Ku M, Méndez-González M, Moo-Puc R, Rosado-Vallado M, Simá-Polanco P, Cedillo-Rivera R, Peraza-Sánchez SR. 2010. Medicinal potions used against infectious bowel diseases in Mayan traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology 132, 303-308.

Verde-Star MJ, García-González S, Rivas-Morales C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas MA, Verde-Star MJ. Eds. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona: OmniaScience, 1-40.

Varghese HS, Kotagiri S, Vrushabendra SBM, Archana SP, Raj GG. 2013. Nephroprotective activity of *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. fruit extract against paracetamol induced nephrotoxicity in rats. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Science 4, 322-332.

Vinjamuri S, Shanker D, Ramesh RS, Nagarajan S. 2015. In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4, 1263-1268.

Vlase L, Benedec D, Hanganu D, Damian G, Csillag I, Sevastre B, Mot AC, Silaghi-dumitrescu R, Tilea I. 2014. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. Molecules 19, 5490-5507.

Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. 2011. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-

Ciocalteu methods. Food Research International 44, 217-224.

Yánez GIA. 2014. Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, pp.1-11

Zampini IC, Vattuone MA, Isla MI. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. Journal of Ethnopharmacology 102, 450-456.

Zongo C, Savadogo A, Somda MK, Koudou J, Traore AS. 2011. In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H . B . & K . and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. International Journal of Phytomedicine 3, 182-191.

Zwieten RV, Verhoeven AJ, Roos D. 2014. Free Radical Biology and Medicine Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. Free Radical Biology and Medicine 67, 377-386.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Oscar Alberto Pérez Narváez

Candidato al Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: EFECTO ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Campo de Estudio: Antimicrobianos naturales para el control de microorganismos de importancia en salud.

Datos Personales: Nacido en la Ciudad de México, Distrito Federal; el 25 de diciembre de 1978, hijo de Severiano Pérez Pérez y Araceli Guadalupe Narváez Rivera.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, obteniendo el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2005, con la tesis titulada “Ecología larvaria del mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) en localidades del noreste de México”.

Experiencia Profesional: Maestro de tiempo completo impartiendo biología, física y química en nivel secundaria en el Instituto Verbo Monterrey (Redein, A. C.) de 2007 al 2016. Químico Laboratorista y Responsable Sanitario de 2005 a 2007.