

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



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS CRUDOS DE LA SEMILLA
DE *Ebenopsis ebano* (ÉBANO)**

Por

MC YOLANDA ARACELI GRACIA VÁSQUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Acentuación en Alimentos

Junio de 2008

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
CRUDOS DE LA SEMILLA
DE *Ebenopsis ebano* (ÉBANO)**



DRA. MA. GUADALUPE ALANÍS GUZMÁN
Directora de Tesis

DRA. MAYELA BAUTISTA JUSTO
Directora Externa

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS CRUDOS DE LA SEMILLA
DE *Ebenopsis ebano* (ÉBANO)**



Comité de Tesis

Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán
Director de la Tesis

Dra. Adriana Núñez González
Secretario

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Vocal

Dra. Mayela Bautista Justo
Vocal

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS CRUDOS DE LA SEMILLA
DE *Ebenopsis ebano* (ÉBANO)**

Comité Académico de Doctorado

Subdirectora de Estudios de Posgrado
Dra. Diana Resendez Pérez

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme dado la vida y permitido gozar de la familia con la que ahora comparto todo mi tiempo y mi cariño.

A MIS PADRES

Carlos y Ma. Elena

Porque con su sabiduría y buenos consejos siempre nos han acompañado, encausado, brindado la confianza y el apoyo para que en el caminar por la vida vayamos tomando decisiones que nos han llevado a realizarnos en nuestra vida personal y profesional, los quiero mucho.

A MI SUEGRA

Sra. Carmen

Que aunque no está cerca de nosotros siempre tiene una palabra de aliento para reconocer nuestro trabajo y motivarnos para no desistir en todo lo que realizamos, la quiero.

A MIS ABUELITOS

Oralia y Manuel

Porque de ellos he aprendido que luchando se pueden lograr muchas cosas para salir adelante en la vida a pesar de la adversidad, los quiero.

A MI ESPOSO

José María

Porque sin tu apoyo, confianza y cariño yo no hubiera logrado todo lo que hasta ahora tengo, te quiero y te respeto mucho.

A MIS HIJOS

Claudia Araceli y Eder Fernando

Carlos Antonio

José Alejandro.

Por todos los momentos que he dejado de estar y convivir con ustedes para poder concluir este proyecto, esperando siempre darles un buen ejemplo de vida y carrera, los quiero.

A MI NIETO

Fernando Alain

A ti chiquito que llegas en este momento y vienes a llenarnos de plenitud, te quiero.

A MIS HERMANOS

Ma. Elena y Jesús Gilberto

Sandra Leticia y Luis Gerardo

Martha Deyanira y Miguel

Irma y Carlos Alberto

Porque siempre he contado con su apoyo y su cariño, los quiero.

A TODOS MIS SOBRINOS

Que no los puedo mencionar porque son muchos pero ya saben que los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán

Porque a lo largo de diez años me ha guiado y brindado su confianza, experiencia y apoyo para realizar mis estudios de Maestría y ahora de Doctorado, además de permitirme aprender muchas cosas que me han dado la oportunidad crecer en lo personal y en lo profesional, la admiro mucho, gracias por todo.

Dr. Ricardo A. Gómez Flores

Porque me dio la oportunidad y confianza para de desarrollar gran parte del proyecto en el Laboratorio de Inmunología a su digno cargo y además permitirme crecer compartiendo conmigo toda su experiencia y valioso tiempo, gracias.

Dra. Adriana Núñez González

Gracias, por su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto para poder concluirlo con éxito. Mi admiración y respeto

Dra. Mayela Bautista Justo

Gracias por su amistad, apoyo y consejos, por su paciencia y por compartir conmigo toda su experiencia en la realización de este proyecto.

Dra. Patricia Taméz Guerra

Gracias por su apoyo y por compartir su valioso tiempo y conocimientos para que este proyecto se concluyera.

Al personal del Laboratorio de Inmunología

Diana, Laura, Tomás, Carlos Pfeiffer, Carlos Arzate, Nora, Denisse y especialmente a Queta no solo por el apoyo que me brindaron durante mi estancia en el mismo, sino por la amistad que surgió durante ese tiempo, gracias a todos.

A Mayra

Por tu valiosa amistad que surgió y creció durante todo este tiempo, por tus consejos y apoyo, gracias.

A la Facultad de Ciencias Biológicas

Por permitirme ser parte de sus estudiantes de posgrado y por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Químicas

Especialmente

QFB Emilia E. Vásquez Farías que durante su periodo como Directora de la Facultad me brindó el apoyo y facilidades para realizar este proyecto, además de su amistad y ánimo para la conclusión de mis estudios de Doctorado.

QFB Gloria Nelly Páez Garza

Subdirectora Administrativa de la Facultad por su apoyo, amistad, confianza y siempre palabras de aliento para concluir mis estudios.

Dra. Ma. Aurora Hernández Benítez

Jefe de la Carrera de QFB al darme apoyo y ánimo para concluir este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MC Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Por su amistad y apoyo, porque hemos compartido bonitos y difíciles momentos juntas y por en el trabajo realizado en el Laboratorio a su digno cargo y a Jesús Zaragoza por su apoyo en el desarrollo del Proyecto.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología

Dra. Martha Alicia Suárez Herrera, David Melgoza y Carlos Castillo por su apoyo en el desarrollo de la investigación.

A Eva, Ivonne y Sandra

Mis queridas amigas y compañeras, porque durante la realización de este proyecto de vida nos sucedieron muchas cosas y siempre me estuvieron apoyando y dando ánimo para no desistir, las quiero.

A todas aquellas personas que involuntariamente omito y que de alguna manera formaron parte de este proyecto tan importante en mi vida

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
NOMENCLATURA	xix
RESUMEN Y ABSTRACT	xxii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general.	4
3.2 Objetivos particulares	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Descripción botánica del <i>Phitecellobium flexicaule</i>	5
4.1.1 Clasificación.	5
4.1.2 Denominación.	5
4.1.2.1 Nombres científicos.	5
4.1.2.2 Nombres comunes.	6
4.1.3 Características taxonómicas.	6
4.1.4 Área de distribución.	8
4.2 Usos actuales y potenciales del ébano.	10
4.3 Valor nutricional de las leguminosas.	12
4.4 Propiedades medicinales de las plantas.	15
4.5 Compuestos químicos de las plantas.	18
4.5.1 Polifenoles.	18
4.5.2 Clasificación de los polifenoles vegetales.	19
4.6 Acción de los antioxidantes en los alimentos.	21
4.7 Acción de los antioxidantes en el ser humano.	24
4.8 Propiedades relevantes de los antioxidantes para la salud humana.	30
4.9 Microorganismos.	30
4.9.1 <i>Escherichia coli</i>	33

4.9.2	<i>Salmonella</i>	35
4.9.3	<i>Candida albicans</i>	37
4.10	Cáncer	38
4.11	Sistema inmune.	40
5	MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1	Área de estudio.	44
5.2	Diseño del muestreo.	45
5.3	Tratamientos.	46
5.4	Procedimiento químico-analítico.	47
5.4.1	Composición proximal.	47
5.4.2	Polifenoles totales.	47
5.4.3	Grado de polimerización.	48
5.4.4	Actividad antioxidante.	48
5.5	Preparación de extractos.	49
5.5.1	Extractos acuosos.	49
5.5.2	Extractos metanólicos.	49
5.6	Actividad biológica.	50
5.6.1	Reactivos.	50
5.6.2	Animales de experimentación.	50
5.6.3	Línea celular.	51
5.6.4	Viabilidad celular.	51
5.7	Actividad antibiótico <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Cándida albicans</i>	52
5.7.1	Preparación del stock de microorganismos (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , y <i>Cándida albicans</i>)	52
5.7.2	Efecto antibiótico contra <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	52
5.7.3	Efecto antibiótico contra <i>Cándida albicans</i>	53
5.7.4	Efecto citotóxico <i>in vitro</i> contra línea celular L5178Y-R.	53
5.7.5	Efecto <i>in vitro</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo.	54
5.7.6	Efecto <i>in vitro</i> sobre la proliferación de linfocitos de bazo.	55
5.7.7	Efecto <i>in vitro</i> sobre la activación de macrófagos peritoneales.	56
5.8	Diseño del experimento.	57
5.9	Análisis estadístico.	58
6	RESULTADOS	59
6.1	Composición química.	59
6.1.1	Análisis proximal.	59
6.1.2	Polifenoles totales.	60
6.1.3	Grado de polimerización.	62
6.2	Actividad antioxidante.	66
6.2.1	Extractos acuosos.	66
6.2.2	Extractos metanólicos.	71
6.3	Actividad antimicrobiana.	77
6.3.1	Efecto de los extractos sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	77
6.3.2	Efecto de los extractos sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	86
6.3.3	Efecto de los extractos sobre el crecimiento de	

<i>Candida albicans</i>	95
6.4 Actividad antitumoral.....	104
6.4.1 Efecto de los extractos crudos de <i>Ebenopsis ebano</i> sobre la citotoxicidad de la línea celular tumoral L5178Y-R <i>in vitro</i>	104
6.5 Actividad inmunorreguladora.....	113
6.5.1 Efecto de los extractos crudos de <i>Ebenopsis ebano</i> sobre la citotoxicidad de linfocitos de timo de ratón <i>in vitro</i>	113
6.5.2 Efecto de los extractos crudos de <i>Ebenopsis ebano</i> sobre la citotoxicidad de linfocitos de bazo de ratón <i>in vitro</i>	124
6.5.3 Efecto de los extractos crudos de <i>Ebenopsis ebano</i> sobre la citotoxicidad de macrófagos peritoneales de ratón <i>in vitro</i>	135
7. DISCUSIÓN.....	146
Análisis proximal.....	147
Contenido de compuestos polifenólicos.....	149
Actividad antioxidante.....	153
Actividad antibiótico.....	154
Actividad antitumoral e inmunorreguladora.....	156
8. CONCLUSIONES.....	161
9. LITERATURA CITADA.....	164
10. APÉNDICE	
Apéndice A: Diagrama de flujo de preparación de tratamientos.....	175
Apéndice B: Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuoso y metabólico) entre Microorganismos.....	176
Apéndice C: Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuoso y metabólico) entre células.....	181
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	186

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición química proximal de semillas de <i>Ebenopsis ebano</i> en diferentes estados de madurez	60
2. Contenido de polifenoles totales en extractos crudos acuosos de semillas de <i>Ebenopsis ebano</i> con diferentes tratamientos.	61
3. Contenido de polifenoles totales en extractos crudos metanólicos de semillas de <i>Ebenopsis ebano</i> con diferentes tratamientos.	62
4. Contenido de polifenoles de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en extractos crudos acuosos de semillas de <i>Ebenopsis ebano</i> para diferentes tratamientos	65
5. Contenido de polifenoles de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en extractos crudos metanólicos de semillas de <i>Ebenopsis ebano</i> para diferentes tratamientos	66
6. Actividad antioxidante de la semilla de <i>Ebenopsis ebano</i> frente a DPPH. Extractos crudos acuosos	67
7. Actividad antioxidante de la semilla de <i>Ebenopsis ebano</i> frente a DPPH. Extractos crudos metanólicos	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Planta de <i>Ebenopsis ebano</i>	6
2. Hojas de <i>Ebenopsis ebano</i>	7
3. Espinas de <i>Ebenopsis ebano</i>	7
4. Fruto de <i>Ebenopsis ebano</i>	8
5. Tallo de <i>Ebenopsis ebano</i>	8
6. Efecto del extracto acuoso crudo T1 sobre la actividad antioxidante.	68
7. Efecto del extracto acuoso crudo T2 sobre la actividad antioxidante.	69
8. Efecto del extracto acuoso crudo T3 sobre la actividad antioxidante.	69
9. Efecto del extracto acuoso crudo T4 sobre la actividad antioxidante.	70
10. Efecto del extracto acuoso crudo T5 sobre la actividad antioxidante.	70
11. Efecto del extracto acuoso crudo de T1 a T5 sobre la actividad antioxidante.	71
12. Efecto del extracto metanólico crudo T1 sobre la actividad antioxidante.	73
13. Efecto del extracto metanólico crudo T2 sobre la actividad antioxidante.	74
14. Efecto del extracto metanólico crudo T3 sobre la actividad antioxidante.	74
15. Efecto del extracto metanólico crudo T4 sobre la actividad antioxidante.	75

16. Efecto del extracto metanólico crudo T5 sobre la actividad antioxidante.	75
17. Efecto del extracto metanólico crudo de T1 a T5 sobre la actividad antioxidante.	76
18. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	80
19. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	81
20. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	82
21. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	83
22. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	84
23. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	85
24. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	89
25. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	90
26. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	91
27. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	92
28. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	93
29. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i>	94
30. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	98
31. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	99
32. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	100

33. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	101
34. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	102
35. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	103
36. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.....	107
37. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.....	108
38. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.....	109
39. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.....	110
40. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento del linfoma L5178Y.....	111
41. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento del Linfoma L5178Y.....	112
42. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	118
43. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	119
44. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	120
45. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	121
46. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	122
47. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de linfocitos tímicos.....	123
48. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.....	129
49. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.....	130

50. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.	131
51. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.	132
52. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.	133
53. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de linfocitos de bazo.	134
54. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	140
55. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	141
56. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	142
57. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	143
58. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	144
59. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales.	145
60. Anexo B. Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuosos y metanólicos) entre microorganismos	176
61. Anexo C. Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuosos y metanólicos) entre células.	190

NOMENCLATURA

abs.	Absorbancia
a de C	Antes de Cristo
AIM-V	Medio de cultivo
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
C	Carbono
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cel/ml	Células por mililitro
cm	Centímetro
Con A	Concanavalina A
°C	Grados Celsius
Co A	Coenzima A
CO ₂	Dióxido de carbono
DO	Densidad Óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et. al.</i>	y colaboradores
etc.	Etcétera
Exp	Experimento

Fig.	Figura
g	Gramos
h	Hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
ICC	Infusión Cerebro Corazón
IIC	Índice de Inhibición de Crecimiento
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µL/pozo	Microlitros por pozo
m	Metro
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mg/mL	Miligramos por mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
ng/tubo	Nanogramos por tubo
nm	Nanómetros
NO ₂	Nitrito
No.	Número
o-	orto
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p-	para
%	Porcentaje
rpm	Revoluciones por minuto

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo desarrollado en este instituto)
SDS	Lauril sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TAR	Reactividad Antioxidante Total
USA	Estados Unidos de Norteamérica
YM	Yeast Most

RESUMEN

Ebenopsis ebano es una planta nativa del noreste de México, de la cual se alimentan los pobladores de la región en sus diferentes estados de madurez; ya sea cocidas cuando son tiernas, y tostadas cuando son maduras. En este estado de madurez, es utilizado inclusive como sustituto de café, pero por su posible efecto biológico no ha sido validado. En el presente trabajo se evaluaron sus semillas desde el punto de vista químico y biológico para determinar el aporte de macronutrientes solubles en agua y metanol, expresados como polifenoles totales y derivados de polifenoles, y por su actividad antioxidante, antibiótica, antitumoral e inmuno-reguladora. Los tratamientos aplicados a las semillas fueron: tierna cruda (T1), tierna cocida (T2), madura cruda (T3), madura tostada (T4), y su forma disponible comercialmente (T5). Se observó que las semillas aportan los principales macronutrientes, en proporción equivalente a otras leguminosas, con relación a los fitocompuestos (polifenoles) se expresaron como derivados de: ác. gálico, ác. cafeico, quercetina y malvidin-3-glucósido, observándose que en todos los tratamientos (T1 a T5) y extractos (acuoso y metanólico) predominan los derivados del ácido cafeico, siendo estos estadísticamente diferentes al contenido de ác. gálico y ác. cafeico ($p < 0.05$), no observándose la presencia de malvidin-3-glucósido. Al comparar los diferentes tratamientos se observó un mayor contenido de compuestos en el T5, siendo estadísticamente diferente en los diferentes tratamientos ($p < 0.05$); sin embargo, al cuantificar los compuestos y expresarlos como polifenoles totales, se observó el mayor contenido en el T2, existiendo diferencia estadística entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), tanto en el extracto acuoso como en el metanólico. Con relación a la actividad antioxidante, se observó un efecto más marcado entre los tratamientos del extracto metanólico, presentando mayor actividad el T2 (72.89% de inhibición), siendo estadísticamente diferentes todos los tratamientos ($p < 0.05$). En el extracto acuoso, se observó el mismo comportamiento, siendo el porcentaje de inhibición del 55.83 % para el T2 ($p < 0.05$). Con respecto a actividad antibiótica, se observó el mayor efecto de inhibición de crecimiento con el T5, dando para *E. coli* una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/ml en el extracto acuoso ($p < 0.05$) y de 250 µg/ml con el metanólico ($p < 0.05$); y para *Salmonella*, de 250 µg/ml en el extracto acuoso ($p < 0.05$). El extracto metanólico que mejor controló *Salmonella* fue el T4, con una CMI de 250 µg/ml para T4 en ($p < 0.01$). En el caso de *C. albicans*, no se observaron diferencias significativa con el extracto acuoso. Para los extractos metabólicos, las CMI de los T2, T3 y T5 se observaron hasta con 125 µg/ml, y se incrementó hasta 84.3% a 500 µg/ml ($p < 0.05$). Al comparar el efecto de los tratamientos en los extractos acuoso contra las células tumorales L5178Y-R y células sanas de linfocitos de timo y bazo contra los T3, T4 y T5, se observó la mayor inhibición de crecimiento para las células tumorales que para las células sanas ($p < 0.01$), ($p < 0.05$). En el caso de los extractos metabólicos, se observó mayor inhibición de crecimiento con las células sanas. Al relacionar las diferentes actividades biológicas con el contenido de compuestos polifenólicos, no se observó una relación directa; sin embargo, puede ser que la actividad sea debido a la presencia de los mismos, o bien a otro tipo de fitonutrientes. Por lo anterior se puede concluir que los componentes presentes de la semilla de *Ebenopsis ebano* pudieran emplearse en la industria farmacéutica, de cosméticos y/o alimentaria.

ABSTRACT

Ebenopsis ebony is a native plant of the northeast of Mexico, is consumed by the settlers of the region in its different states from maturity; cooked when are tender and toasted when they are mature, including in this state of maturity it is used like substitute of coffee by his possible biological potential, which, has not been validated. In the present work the seeds were evaluated chemical and biologically determining the contribution of macronutriments, soluble water and metanol compounds, expressed as: total polyphenols, derivates of polyphenols, antioxidant, antibiotic, antitumoral and immunoregulatory activity. The treatments applied to seeds were: tender raw (T1), tender cooked (T2), mature raw (T3), toasted mature (T4), and toasted mature available commercially (T5). It is observed that the seeds contribute with the main macronutriments, in proportion equivalent to other leguminous, in relation to the phytochemicals (polyphenols) were expressed like derivates of: gálic acid, cafeic acid, quercetin, and malvidin-3-glucoside being observed that in all treatments (T1 to T5) and extracts (watery and methanolics) the derivatives of cafeic acid predominate, being these statistically different from the content from gálic acid and cafeic acid ($p < 0.05$), not being observed the presence of malvidin-3-glucoside. When comparing the different treatments a greater content of compound is observed in T5, being statistically different between different treatments ($p < 0.05$), nevertheless when evaluate total compounds and expressing them as polyphenols is observed the greater content for T2, existing statistical difference between the different treatments ($p < 0.05$), as much in the watery extract as in the methanolic. In relation to the antioxidant activity a more noticeable effect between the treatments of the methanolic extract is observed, presenting greater activity the T2 (72.89% of inhibition), being statistically different all the treatments ($p < 0.05$). In the watery extract, he himself behavior is observed, being % of inhibition of 55.83 for the T2 ($p < 0.05$). In the antibiotic activity for *E. coli* is observed greater effect of inhibition of growth in the T5 with MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 125 μ g/ml in the watery extract of ($p < 0.05$) and the methanolic extract greater % of inhibition for T5 with CMI of 250 μ g/ml ($p < 0.05$). For *Salmonella* greater % inhibition of growth with CMI 250 μ g/ml in watery extract T5 ($p < 0.05$) and CMI of 250 μ g/ml T4 in the methanolic extract ($p < 0.01$). *C. albicans* is not observed statistically significant inhibition for the watery extract in different treatments. Methanolic extracts the CMI of the T2, T3 and T5 is observed up to 125 μ g/ml, although % of inhibition are greater for the concentrations of 250 and 500 μ g/ml (up to 84,3 %) ($p < 0.05$) When comparing the effect of the treatments in the watery extracts against the tumoral cells (L5178Y-R) and normal cells (lymphocytes of thymus and bazo) in T3, T4 and T5 is observed greater effect of inhibition of growth for the tumoral cells that normal cells ($p < 0.01$), ($p < 0.05$). In case of the methanolic extracts this same behavior is not observed, since greater inhibition of growth for the normal cells is observed that the tumoral cells. When relating the different biological activities to the polyphenolics compound content direct relation is not observed, nevertheless, can be that the activity must to the presence of such, or, to another type of phytonutrients. Reason why this type of evaluations can be concluded is important since the component presents of the seed of *Ebenopsis ebony* can have impact in the pharmaceutical cosmetic and food industry.

1. INTRODUCCIÓN

Durante largo tiempo, las plantas han sido una fuente valiosa de productos naturales utilizados para el mantenimiento de la salud humana, especialmente en la última década, con estudios más intensivos para terapias naturales. El uso de compuestos de plantas para propósitos farmacéuticos gradualmente se ha incrementado. De acuerdo a la Organización Mundial de la salud las plantas podrían ser la mejor fuente para obtener una variedad de drogas. Cerca del 80% de los individuos en países desarrollados utilizan la medicina tradicional, por lo que las plantas se deben investigar para entender mejor sus características, seguridad y eficacia.

Frecuentemente la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia. Es necesario realizar en los extractos de plantas medicinales un ensayo general inicial donde sea posible identificar su verdadero potencial biológico. El ensayo hipocrático es una de estas pruebas iniciales a las que se deben de someter los extractos crudos de las plantas. Este permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, da información toxicológica inicial, orienta sobre qué otras pruebas biológicas se deben de efectuar con el extracto y guía el fraccionamiento químico del mismo según la actividad biológica de dichas fracciones.

Ebenopsis ebano conocido comúnmente como ébano, es una leguminosa silvestre que se distribuye con alta productividad en el noreste de la república mexicana. Sus semillas son consumidas como complemento alimenticio por habitantes de la región. Existen estudios en dónde se evaluaron nutricionalmente semillas crudas y cocidas de esta leguminosa cuyos resultados determinaron que además de los macronutrientes, contienen otro tipo de compuestos, los cuales se encuentran en menor proporción, los polifenoles. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y a los alimentos les confieren cualidades deseables e indeseables. Históricamente fueron considerados como antinutricionales porque algunos, los taninos, mostraron que presentan efectos adversos en el metabolismo de los humanos; sin embargo, recientemente se han reconocido las actividades biológicas de estos compuestos relacionadas con beneficios a la salud.

Estudios nutricionales recientes analizan los alimentos por su efecto protector y prevención potencial de la enfermedad. Considerando la variabilidad en la cantidad y tipo de compuestos fenólicos que pueden estar presentes en las semillas de *Ebenopsis ebano* es de importancia evaluar su poder antioxidante, antibiótico, antitumoral e inmunorregulador.

De acuerdo a los resultados obtenidos se detectó la presencia de compuestos polifenólicos, además de actividad antibiótica, antitumoral e inmunomoduladora; sin embargo, no se observa una relación directa entre los compuestos evaluados y dichas actividades químicas y biológicas.

2. HIPÓTESIS

Las semillas de *Ebenopsis ebano* presentan diferencias en el tipo y contenido de polifenoles, y en las actividades antioxidante, antibiótica, antitumoral e inmunomoduladora que dependen de su estado de maduración y tratamiento de cocción.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Realizar la caracterización química y evaluar las actividades antioxidante, antibiótica, antitumoral e inmunomoduladora de semillas de *Ebenopsis ebano* en diferentes estados de maduración.

3.2 Objetivos Particulares

- 3.2.1 Obtener extractos acuosos y metanólicos de semillas de *Ebenopsis ebano* en diferentes estados de maduración.
- 3.2.2 Determinar el tipo y concentración de compuestos polifenólicos de semillas de *Ebenopsis ebano* en diferentes estados de maduración.
- 3.2.3 Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos las semillas de *Ebenopsis ebano*.
- 3.2.4 Determinar la actividad antibiótico *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos las semillas de *Ebenopsis ebano*.
- 3.2.5 Determinar el efecto *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de las semillas de *Ebenopsis ebano* sobre la viabilidad del linfoma murino L5178Y.
- 3.2.5. Determinar el efecto *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de las semillas de *Ebenopsis ebano* sobre la viabilidad de linfocitos normales de timo y bazo, y de macrófagos peritoneales de ratón.

4. ANTECEDENTES

4.1 Descripción botánica del *Phitecellobium flexicaule*

4.1.1 Clasificación

Reino:	Vegetal
División:	Anthophyta
Clase:	Dicotiledoneae
Orden:	Fabales
Familia:	Leguminosae
Género:	<i>Phitecellobium</i>
Especie:	<i>flexicaule</i> (Benth.) Coult.

4.1.2 Denominación

4.1.2.1 Nombres científicos:

Phitecellobium flexicaule (Benth.) Coult (Correl y Johnston, 1970)

Phitecellobium ebano (Berl.) Muller (Estrada y Marroquín, 1992)

Ebenopsis flexicaulis (Benth.) Britt & Rose (Turner, 1959)

Siderocarpus flexicaulis (Benth.) Small (Turner, 1959)

Ebenopsis ebano (Berl.) Barneby & Grimes (Bonner)

4.1.2.2 Nombres comunes:

Ébano

Texas Ebony (Correl y Johnston, 1970)

4.1.3 Características taxonómicas

Aspecto y Tamaño: Son arbustos o usualmente árboles pequeños (hasta 15 m de altura en la parte sur de su rango de distribución) con una copa redondeada de color oscuro y muy densa; tronco oscuro, de hasta 60 cm de grosor pero usualmente solo de 10 cm, ramas cortas y fuertes, bifurcadas, generalmente armadas con espinas estipulares verdaderas, la corteza es de color gris pálido en las ramas jóvenes (Correl y Johnston, 1970).



Fig 1. Planta de *Ebenopsis ebano*

Hojas: Alternas, compuestas, bipinnadas, 2.5-4.2 cm de largo, pinnas 2-3 pares por hoja, de 1-2.5 cm de largo, con 3-6 pares de folíolos por pinna, 0.6-1.0 cm de largo, 0.4-0.5 cm de ancho, oblongos a oblongo-obovados o anchamente obovados,

glabros y/o esparcida y diminutamente ciliadas en los bordes; glándulas pediceladas presentes, una en cada intersección de pares de pinnas (Estrada y Marroquín, 1992).



Fig 2. Hojas de *Ebenopsis ebano* Fig 3. Espinas de *Ebenopsis ebano*

Flores: Blanco amarillentas, atractivas y aromáticas, dispuestas en racimos espigados, de 2 a 5 cm de largo, cilíndricas, densas, cáliz ligeramente campanulado; la corola de aproximadamente $\frac{1}{2}$ pulgada de largo, mucho más grande que el cáliz, de 5 lóbulos; estambres numerosos, filamentos unidos en la base; ovarios glabrosos. La época de floración es de abril a julio (Vires, 1986).

Fruto: Vaina de 6 a 13 cm de largo y 1.8-3 cm de ancho, ligeramente aplanada, bivalvada, las valvas con coriáceas rectas a ligeramente curvadas, redondeadas y/o apiculadas en el ápice, persistentes por largo tiempo, tardíamente deshiscentes, internamente septadas; semillas transversas en la vaina, separadas por delgados tejidos, alrededor de $\frac{1}{2}$ pulgada de longitud y $\frac{1}{4}$ de pulgada de ancho, marrón rojizas, con forma de frijol, de revestimiento grueso.



Fig. 4. Fruto de *Ebenopsis ebano*

Tallo: Rojo oscuro a púrpura o marrón, muy durable, duro, pesado, gravedad específica de 1.04.



Fig. 5. Tallo de *Ebenopsis ebano*

4.1.4 Área de distribución

Su rango de distribución comprende el estado norteamericano de Texas y estados del noreste de México.

En Texas desde las costas de la Ensenada de Matagorda hasta la planicie del Bajo Río Grande. Abundante en el Condado de Cameron. Comúnmente plantadas en las calles de Brownsville, Texas. En México en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y también en Baja California (Vires, 1986).

Varios autores han catalogado, de acuerdo a su criterio, a las comunidades vegetales donde se desarrolla el ébano en México. Así, Rzedowski (1981), menciona al *Phitecellobium flexicaule* como componente del Bosque Espinoso, una comunidad ecológica totalmente definida en el país, la cual se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. En ella, el ébano se presenta intercalado con otras especies fisonómicamente más abundantes, en un diseño de mosaico (Estrada López, 1995).

La distribución geográfica del Bosque Espinoso en el Estado de Tamaulipas corresponde, de acuerdo a Puig, citado por Estrada López (1995) al área de la aislada Sierra del Sur, donde *Phitecellobium flexicaule* y *Phoebe tampicensis* domina, constituyendo una variante del Bosque Tropical Caducifolio. En González-Medrano, Rzedowski (1978), señala que hacia el norte, cerca de Matamoros, la comunidad formada por el Bosque Espinoso se convierte en una variante del mezquital, con árboles de 6-8 m de altura y con *Phitecellobium flexicaule*-*Prosopis glandulosa*-*Cercidium macrum* como la asociación dominante. Esa misma comunidad ecológica es reconocida por Miranda y Hernández X., citados por Rzedowski (1978) en la zona este del estado de Nuevo León, donde la única variante la constituye la presencia de *Cordia boissieri* como otra de las especies dominantes. Rzedowski (1978), reconoció una comunidad formada por *Phitecellobium flexicaule* y *Phyllostylon brasiliensis* en

el sureste de San Luis Potosí, con árboles de 6 a 8 m de altura, cubriendo el 30% de la zona y otras de 2 a 4 m de altura, formando un estrato muy denso. Este bosque se desarrolló sobre terrenos con nula o escasa pendiente y con un suelo somero con lutita o marga como roca madre.

Remanentes de poblaciones de ébano son reportadas por González Sánchez (1985) en los municipios de Anáhuac, Sabinas Hidalgo, Garza García y Monterrey, en el estado de Nuevo León. Árboles aislados de *Pithecellobium flexicaule* han sido observados en diversas zonas de los municipios de San Nicolás de los Garza, Guadalupe, Monterrey y General Terán, Nuevo León (González-Quijada, 1999).

Rojas-Mendoza (1965), incluye a *Pithecellobium flexicaule* dentro de una comunidad denominada Matorral Alto Espinoso, distribuida fisiográficamente en la mayor parte del estado de Nuevo León, oriente y algo del sur del mismo estado; oriente de Coahuila y zonas aisladas de Tamaulipas.

Jurado y Reid (1989) mencionan que el ébano, en las áreas de distribución antes mencionadas, se presentan en forma de mosaicos, junto con otras especies más abundantes, no obstante, son alteradas por causas antropogénicas y directa o indirectamente por una explotación irracional (Estrada López, 1995).

4.2 Usos actuales y potenciales del ébano

Varios autores coinciden al mencionar los usos potenciales del ébano. Así, refieren que su madera, debido a la dureza y durabilidad, se utiliza para postes,

fabricación de muebles y gabinetes, de mangos para cuchillería fina, en construcciones marinas, armazones de casas y puentes de caminos, como combustible, de la cual se obtiene carbón de alta calidad, etc. Además es frecuentemente plantado como árbol de sombra y con fines ornamentales. Las semillas son consumidas por muchas comunidades de la República Mexicana, particularmente el noreste del país, las cuales se consumen cocidas, cuando están verdes y tostadas cuando están maduras, éstas últimas enteras (sin la cáscara) o molidas para ser empleadas como sustituto del café. También se utilizan las semillas para confeccionar artículos de joyería (Correl y Johnston, 1970; Vires, 1986; Bonner F).

Respecto al uso de la semilla en la alimentación humana, el consumo de la misma como complemento alimenticio es tradición en muchas zonas rurales del estado de Nuevo León, principalmente aquellas ubicadas dentro de su rango de distribución, como por ejemplo el municipio de General Terán. En las poblaciones del mencionado municipio la semilla es comercializada cocida verde y tostada madura, en ambas formas se consume sin la cáscara o cubierta. Además, la semilla tostada, después de molida, la utilizan para preparar una bebida similar al café.

La semilla del ébano es conocida en las localidades del noreste del país como “maguacta”.

Potencialmente el ébano puede ser usado como productor eficiente de vainas y semillas, siguiendo el modelo de aprovechamiento agrícola propuesto por Felker y Bandursky (1979) para *prosopis* spp. Sustancias tales como resinas, polifenoles,

aminoácidos, etc. contenidas en las dos estructuras antes mencionadas, pueden ser utilizadas en procesos industriales muy variados (Estrada López, 1995).

Tomando como base la composición química proximal y el perfil de aminoácidos de la semilla de ébano cruda Giral *et al.* (1978), esta puede ser considerada como una fuente potencial de alimento para humanos y animales, y después de su evaluación nutricional y de algunos estudios de orden tecnológico, podría ser usada para consumo masivo, ya sea en su forma natural, procesada o suplementada con otros nutrimentos; además, la totalidad de la semilla o alguno de sus componentes pueden tener aplicación en la industria de alimentos como ingredientes.

4.3 Valor nutricional de las leguminosas

Las leguminosas fueron de los primeros alimentos cultivados por el hombre, el frijol se domesticó en Latinoamérica en 4000 a de C. precediendo en casi 1000 años al maíz. Una alimentación saludable debe contener gran variedad de alimentos para satisfacer las necesidades nutricionales y mantener un óptimo estado de salud. Aumentar el consumo de vegetales incluido el de leguminosas secas ha sido una de las principales estrategias utilizadas en este propósito. Las leguminosas secas contienen una alta proporción de hidratos de carbono (50 a 65%), de vitaminas y minerales, bajo contenido de lípidos y son consideradas una fuente proteica. Últimamente su consumo se ha asociado con la prevención de enfermedades crónicas no trasmisibles debido a su contenido de sustancias bioactivas; su costo en términos relativos es muy bajo. (Dávila *et al.*, 2003; Prada *et al.*, 2005).

Un producto está esencialmente compuesto por componentes nutritivos procedentes directamente del medio ambiente o resultantes de los procesos de síntesis realizados por el organismo vivo, a partir de los aportes del suelo y del agua en el caso de los vegetales, o de la ración consumida en el de los animales. El conjunto de todos estos compuestos constituye el potencial nutritivo teórico: llegarán a ser efectivos en la medida en que estos compuestos (glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales) sean aprovechados por el hombre o los animales (Adrián *et al.*, 2000).

La información sobre el contenido de nutrimentos de los alimentos representa gran importancia, ya sea por la necesidad de contar con datos actualizados sobre el contenido de dichos nutrimentos de productos regionales ya sea por su volumen o consumo o por las diversas aplicaciones tales como la evaluación nutricional de la población, planificación de dietas, elaboración de productos u otras actividades relacionadas. (Maldonado, 2000).

Como grupo, las leguminosas contienen aproximadamente dos veces más proteínas que los cereales, en una porción y aproximadamente la mitad de las proteínas de la carne magra (Charley, 2001).

Las leguminosas o legumbres son las semillas secas de las plantas que pertenecen a la familia de las leguminosas, de donde proviene el nombre dado a los alimentos de este grupo. Las leguminosas aportan el 20% de la proteína alimenticia consumida en todo el mundo (Nielsen, 1991; Charley, 2001).

Las leguminosas son una parte importante de la dieta humana en muchos países del mundo, y principalmente en las áreas tropical y subtropical. Desde la antigüedad el hombre ha sabido seleccionarlas e incorporarlas a su dieta y hoy se consideran como alimento básico, ya que constituyen un buen aporte de proteínas, vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B₆) y elementos minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, K, Mg) (Marangoni *et al.*, 1988).

Las semillas de leguminosas junto con los granos de cereales, fueron los primeros alimentos seleccionados por el hombre; esta selección fue probablemente muy difícil para el caso de las leguminosas; por dos razones: es una familia botánica amplia, con aproximadamente 600 géneros y alrededor de 13 000 especies; y aunque parezca irónico, esta familia tiene gran estima por su importancia en la dieta humana y animal, contiene una amplia variedad de factores tóxicos, por lo que se pueden considerar como plantas de cierto riesgo en su consumo (Valle y Lucas, 2000).

Asimismo, son una excelente fuente de carbohidratos y fibra alimentaria así como ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico), la inclusión de la fibra dietética en la dieta diaria de los seres humanos parece desempeñar una importante función para la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades crónicas (Cabrera y Cárdenas, 2006). Sin embargo, el valor nutritivo de las semillas de las leguminosas está limitado por la presencia de sustancias tóxicas y antagónicas, a la digestión tales como inhibidores de enzimas, fitatos, factores de flatulencia, compuestos alergénicos, los cuales deben ser eliminados para lograr una utilización efectiva de las leguminosas. Su inactivación por tratamiento térmico, ha sido motivo

de investigación en los últimos años, ya que se mejora considerablemente el valor nutritivo de estas semillas (Marangoni *et al.*, 1988).

4.4 Propiedades medicinales de las plantas

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerle, 1988; Sheldon *et al.*, 1997; Shrestha y Dhillon, 2003; Katewa *et al.*, 2004). De acuerdo con la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales base de la medicina verde, han sido utilizadas desde tiempo remoto en el tratamiento y prevención de enfermedades, por ser ellas fuente de un sin número de compuestos químicos biológicamente activos que le confieren sus propiedades terapéuticas.

A pesar del auge de los productos farmacéuticos obtenidos sintéticamente, el número de investigaciones realizadas a las plantas ha ido en incremento obteniéndose compuestos que aventajan a los de origen artificial debido a que poseen una mayor potencia y seguridad o han sido utilizadas como punto de partida para la obtención por vía semisintética de productos con mayores cualidades terapéuticas. Se recomienda que el empleo de las plantas medicinales tradicionales se efectúe sobre una base científica donde pueda ser validada su efectividad y la relativa inocuidad de las mismas (Rodríguez *et al.*, 2004).

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de 2 extractos (fluido y acuoso) de la especie *Plecthranthus amboinicus* cosechado en Cuba. El extracto fluido presentó un amplio rango de actividad frente a los diferentes grupos microbianos estudiados (bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos levaduriformes y dermatófilos) siendo superior el extracto acuoso de dicha especie vegetal (Ménendez y Pavón, 1999).

Las plantas medicinales constituyen una alternativa curativa utilizada por el hombre desde la antigüedad. La búsqueda y desarrollo de nuevos productos derivados de plantas medicinales con acción farmacológica y que carecen de efectos secundarios importantes, constituye un aspecto de gran importancia en la medicina, ya que amplía el arsenal terapéutico de la misma. Se recomienda que el empleo de las plantas medicinales tradicionales se efectúe sobre una base científica donde pueda

ser validada su efectividad y la relativa inocuidad de las mismas (Rodríguez *et al.*, 2004).

La resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse por eso se hace cada vez más necesaria la búsqueda de nuevos compuestos (Guerra *et al.*, 2004).

Desde la antigüedad el hombre a utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en las preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos (Ali-Shtayed *et al.*, 1998; Sanabria *et al.*, 1998; Cowan, 1999; De los Ríos *et al.*, 1999). Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Cáceres *et al.*, 1990; Dimayuga y García, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Sanabria *et al.*, 1998; Rangel *et al.*, 2001).

El conocimiento de las drogas vegetales ha sido profundo y ampliamente difundido en los pueblos desde los tiempos más antiguos hasta la fecha en que vienen siendo utilizados indiscriminadamente para satisfacer las necesidades básicas de salud pero sin ninguna base científica (Zárate *et al.*, 1999).

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años (Farnsworth *et al.*, 1985). Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo (Akerle, 1988). Es necesario el estudio científico del potencial farmacológico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad (Farnsworth *et al.*, 1989; Suárez *et al.*, 1996).

4.5 Compuestos químicos de las plantas

4.5.1 Polifenoles

No obstante, junto a estas sustancias potencialmente nutritivas, además contiene diversos componentes que no poseen este carácter nutricional: la celulosa de los vegetales, los taninos y flavonoides de las frutas y de las legumbres, el ácido fítico de los granos o el ácido oxálico de las espinacas y del ruibarbo, son compuestos totalmente naturales pertenecientes a la categoría de los factores no nutricionales. Incluso algunos poseen actividad antinutricional como los ácidos fítico y oxálico que actúan como descalcificantes por su propiedad de formar compuestos insolubles con diversos cationes metálicos divalentes, que no están disponibles desde un punto de vista nutricional. Sin embargo, además de la actividad antinutricional, pueden presentar actividad antioxidante. Los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención de cambios indeseables en el sabor y calidad de los alimentos. Además inhiben la iniciación y el progreso de enfermedades en humanos tales como

enfermedades coronarias, carcinogénesis, enfermedad neuronal, y degeneración muscular relacionada con la edad (Adrian *et al*, 2000; Shih *et al.*, 2002).

4.5.2 Clasificación de los polifenoles vegetales

Una clasificación de los polifenoles puede ser en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico. Así se tienen compuestos del tipo C6-C1, derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables. De menor significación son los compuestos de tipo C6-C2, derivados del ácido fenilacético; citando como ejemplo el ácido homogenístico. El grupo de fenoles simples más extenso es el C6-C3, que constituyen los cinamoil derivados. Estos compuestos junto con los C6-C1 y C6-C2, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal, como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales. Dentro de este grupo C6-C3, se encuentran también las cumarinas que son compuestos de tipo bicíclico y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes (Urquiaga y Leighton, 2000).

En la formación de polifenoles, participan dos rutas metabólicas, la vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores, y la vía del ácido siquímico. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos forma los ácidos policétidos íntegramente. Pero estas estructuras donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno, son muy

inestables, y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

Mientras que la ruta del ácido siquímico, que es dependiente de la luz forma p-cumaroil CoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

Fenoles complejos son también los flavonoides e isoflavonoides, grupo que comprende más de 400 estructuras químicas ampliamente representadas en la mayoría de las plantas superiores. Estos compuestos están principalmente unidos a azúcares, aunque también se pueden encontrar en sus formas libres.

Los flavonoides se clasifican en función del grado de oxidación del anillo central (B), siendo las flavonas con 650 estructuras químicas y los flavonoles con más de 1000, las formas moleculares más frecuentes. En este grupo también se incluyen las proantocianidinas que pueden formar polímeros, que son las catequinas o taninos condensados, pero estos compuestos a diferencia de los polímeros del ácido gálico, no experimentan hidrólisis. En general, los flavonoides son pigmentos cuya gama de colores comprende del blanco al rojo y los tonos violáceos, aunque hay algunos que no presentan coloraciones.

De particular interés es el grupo de las antocianidinas, pigmentos responsables de las coloraciones rojo, azul y violeta; en general (Palazón *et al.*, 2001).

Las antocianinas y los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por la planta. Hay una gran variedad de grupos de compuestos (más de

4000 flavonoides de plantas han sido identificados) Estos compuestos son importantes en la calidad de los alimentos por su contribución a la apariencia, sabor y los beneficios a la salud (Lee *et al.*, 2002, Cabrita *et al.*, 2003).

4.6 Acción de los antioxidantes en los alimentos

Los antioxidantes son compuestos que tienen la propiedad de impedir o retardar el enranciamiento de las grasas, interfiriendo en las primeras fases de la peroxidación. En general, son compuestos polifenólicos, más o menos liposolubles, que no deben ser tóxicos ni comunicar sabores extraños a los alimentos. Los antioxidantes actúan en el periodo de inducción, cortando las reacciones de formación de peróxidos (Primo, 1998).

El papel de los antioxidantes es controlar en parte el deterioro que pueden sufrir las grasas prolongando de ésta forma la vida útil de los alimentos (Valle y Lucas, 2000).

Los antioxidantes son especialmente eficaces en evitar o retardar la oxidación de los lípidos, la cual provoca efectos adversos organolépticos como modificaciones en el sabor, olor, color, o en ocasiones, textura, por ejemplo viscosidad y disminuye el valor nutricional de los aceites y grasas a través de la oxidación de vitaminas, especialmente las liposolubles, y los ácidos grasos esenciales. También resultan afectados algunos aminoácidos (Desrosier, 1997; Silvestre, 1998).

Por otro lado la oxidación de los lípidos produce compuestos tóxicos y mutagénicos como los peróxidos, el malonaldehído, hidrocarburos policíclicos aromáticos y colesterol oxidado, entre otros (Silvestre, 1998).

Antioxidantes naturales en las grasas. Tocoferoles: la adición de aceite de germen de trigo a las grasas retarda su enranciamiento oxidativo. El mismo efecto antioxidante se obtiene con el residuo insaponificable del aceite de germen de maíz, algodón, soya, etc., y se debe a la presencia de tocoferoles. Los tocoferoles puros tienen gran actividad antioxidante, aquellos aceites que los contienen son menos enranciables y las mezclas con estos aceites mejoran la estabilidad de los más enranciables.

La estructura fenólica de los tocoferoles, causa de sus propiedades antioxidantes, tienen grandes analogías con la de los antioxidantes sintéticos, utilizados como aditivos de alimentos grasos.

Sinergistas y Desactivadores. Sustancias como los ácidos ascórbico, tartárico, cítrico y fosfórico, potencian la acción de los antioxidantes de tipo fenólico. Este efecto potencializador, en cierto modo sinergista, se debe a su acción secuestradora de los metales, principalmente hierro y cobre que, como se ha visto catalizan la formación de radicales y de peróxidos, en la primera fase del enranciamiento. Por eso se llama, a esos compuestos, sinergistas desactivadores y se utilizan en alimentos completos o en las grasas extraídas.

El ácido ascórbico, el palmitato de ascorbilo, el ácido cítrico y sus ésteres, se utilizan para este objeto. Los ésteres se preparan para facilitar su disolución en las grasas. Además estos compuestos, tienen una acción potenciadora de los antioxidantes y mejoradora de estabilidad de las grasas, el ácido etilendiaminotetracético, varios aminoácidos y los polifosfatos.

El ácido ascórbico y sus derivados son, asimismo, reductores y consumen oxígeno, contribuyendo también a la estabilidad porque pueden reducir al antioxidante fenólico consumido, para regenerar el antioxidante fenólico consumido, y dejarlo activo. Otros reductores, como el bisulfito sódico, también retrasan el enranciamiento.

En el uso industrial de los antioxidantes debe tenerse en cuenta su volatilidad y estabilidad y, en resumen, su capacidad para resistir los tratamientos térmicos de los alimentos y permanecer ejerciendo su acción protectora en el producto terminado (Primo, 1998).

Es muy variada la diversidad de alimentos en los que se ha logrado extender su durabilidad en virtud del empleo de antioxidantes: aceites vegetales, grasa de origen animal, especias, productos cárnicos, lácteos, pesqueros, de aves, huevos deshidratados, cereales elaborados, papas fritas, productos de repostería, etc. (Silvestre, 1998).

4.7 Acción de los antioxidantes en el ser humano

La supresión de la activación metabólica de precarcinógenos por medio de la mono-oxigenación fue postulada como uno de los mecanismos de anticarcinogénesis y los antioxidantes fenólicos inhiben las mono-oxigenasas microsomales. Otros mecanismos reconocidos que ejercen efectos protectores se deben a la inducción de enzimas detoxificantes.

Lamentablemente se requieren concentraciones relativamente altas para la inhibición efectiva de la carcinogénesis por inducción de enzimas detoxificantes (Silvestre, 1998).

Un mecanismo propuesto para explicar la menor enfermedad cardiovascular está mediado por la capacidad de los componentes antioxidantes polifenólicos que protegen la oxidación de las partículas de lipoproteínas de baja densidad, de acuerdo con la hipótesis oxidativa de aterogénesis. Los polifenoles son un grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilo (Leighton y Urquiaga, 1999).

La hipótesis oxidativa de aterogénesis permite explicar numerosas observaciones sobre factores de riesgo y sobre relaciones entre nutrición y arteroesclerosis Steinberg *et al.* (1989). Propone, que el proceso de aterogénesis se desencadena cuando en la pared arterial, en el subendotelio, los macrófagos captan descontroladamente a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), ricas en colesterol, transformándose en células espumosas que se acumulan. En el espacio subendotelial

los macrófagos captan las LDL, pero, en lo que es central a esta hipótesis, solo captan las LDL previamente oxidadas. Las captan porque estas células tienen receptores específicos, llamados receptores de aseo o receptores multiligandos Krieger y Hertz (1994). Se desarrolla así la placa o ateroma, elemento central en la lesión vascular arteroesclerótica (Leighton y Urquiaga, 1999; Yu *et al.*, 2002).

En cada partícula de LDL, junto a una molécula de proteína muy grande, hay aproximadamente 1 700 moléculas de colesterol y 2 700 de ácidos grasos, de los cuales la mitad son ácidos grasos poliinsaturados. Para evitar la oxidación, cada partícula LDL protege sus casi 5 000 moléculas lipídicas con solo 6 moléculas de alfa-tocoferol y cantidades mucho menores de carotenoides y otros antioxidantes.

Cuando los antioxidantes de las LDL se agotan, los ácidos grasos se fragmentan y oxidan produciendo daño en la proteína de la partícula. El daño de la proteína modifica sus cargas de superficie y se hace “reconocible” por los receptores de aseo de los macrófagos y, simultáneamente, irreconocible a los receptores para LDL nativa o no oxidada presentes en general en todas las células, con excepción de los macrófagos (Leighton y Urquiaga, 1999).

La composición del extracto de compuestos polifenólicos se analizó por HPLC como describe Lamuela-Raventós y Waterhouse (1994). Los compuestos polifenólicos fueron divididos en cinco clases e identificados de acuerdo a sus propiedades espectrales y cuantificados como sigue: flavan-3.ol como equivalentes de catequina y derivados del ácido benzoico como equivalentes de ácido gálico a 280 nm; hidroxicinamatos como derivados del ácido cafeico a 316 nm; flavonoles como

equivalentes de rutina a 365 nm; antocianinas como equivalentes de malvidina a 520 nm (Meyer *et al.*, 1997). En suma el ácido ascórbico fue determinado a 280 nm todos juntos con los flavan-3-ol y benzoatos (Heinonen *et al.*, 1998).

Las leguminosas son extensamente consumidas en México y han recibido considerable atención ya que contienen compuestos fenólicos. Recientemente algunas investigaciones han mostrado que los polifenoles presentan propiedades anticarcinogénicas anti-arteroescleróticas.

El tratamiento térmico reduce la cantidad de compuestos fenólicos del frijol entero en un 70% para la variedad negra y 60% para la variedad blanca. El efecto antimutagénico de los compuestos polifenólicos presentes en el caldo después del tratamiento térmico fue de 9.4 ± 0.1 y 1.9 ± 0.1 mg (equivalentes de catequina) para ambas variedades, respectivamente. El efecto antimutagénico de compuestos fenólicos presentes en el caldo de frijoles negros fue de 50% contra la mutagenicidad inducida por AFB₁ (40 ng/tubo) (Loarca-Piña *et al.*, 2002).

Está completamente demostrado que los componentes fenólicos del vino inhiben la susceptibilidad de las LDL a la oxidación *in vitro* (Kinsella *et al.*, 1993; Frankel *et al.*, 1995; Vinson y Hontz, 1995; Abu-Amsha *et al.*, 1996; Caldú *et al.*, 1996; Hurtado *et al.*, 1997; Leighton y Urquiaga, 1999).

Estudios *in vivo* de consumo agudo demuestran que la ingestión de vino tinto está asociada con un aumento de la capacidad antioxidante del plasma (Whitehead *et al.*, 1995; Maxwell y Thorpe, 1996; Serafín *et al.*, 1998; Leighton y Urquiaga, 1999).

El consumo regular de vino tinto aumenta la resistencia de las LDL a la oxidación, constituyendo una muy buena evidencia para explicar el efecto del vino según la hipótesis oxidativa de aterogénesis.

En los valores obtenidos para la capacidad antioxidante total del plasma, medida como TAR (Reactividad Antioxidante Total) se observa que con una dieta Mediterránea TAR aumenta a los 30 días por efecto de la dieta en un 28% y luego de la suplementación con vino, a los 60 días, en un 56% respecto al día 0. En el grupo de la dieta rica en grasas, se observa un aumento de un 23% sobre los valores basales, solo luego de la suplementación con vino. El contenido de polifenoles plasmáticos es mayor en el grupo de la dieta mediterránea.

Los principales grupos de polifenoles presentes en el vino son en alguna medida compuestos biodisponibles. Son compuestos que pasan del tubo digestivo a la circulación, donde se encuentran no modificados o parcialmente metabolizados. Luego de su metabolización retienen sus propiedades antioxidantes (Leighton y Urquiaga, 1999).

Los fenoles incluyendo los flavonoides protegen las células del cuerpo en contra del (“anti-“) daño causado por el oxígeno (“oxidación”) el cual es liberado como un producto de la energía del metabolismo. Una pequeña cantidad de oxígeno liberado se forma de los altamente reactivos radicales libres; los cuales atacan y dañan las células del cuerpo par tomar el electrón perdido que necesitan

Los antioxidantes aportan un electrón de ellos mismos. Ellos neutralizan los radicales libres y ayudan a prevenir el daño a las células del cuerpo y tejidos.

Mucha de la actividad antioxidante de algunos alimentos está relacionada con su contenido fenólico, no solamente de su vitamina C. Algunas investigaciones sugieren que muchos flavonoides son antioxidantes más potentes que la vitamina C y E.

Las antocianinas son pigmentos que de acuerdo a su contenido varían los colores de algunos alimentos. Han sido descritos como una fuente potencial de gran valor como antioxidantes.

Actualmente las antocianinas son entre un gran grupo de pigmentos flavonoides los responsables de los colores rojo, azul y colores intermedios en flores y frutos.

Las cerezas tienen un score alto ORAC, el cual parece estar correlacionado con su contenido de antocianinas. El rango es aproximadamente 80-300 mg de antocianinas en 3.5 onzas (100g) de cerezas oscuras picadas, comparado con 2-40 mg de antocianinas de la misma cantidad de cerezas ligeramente coloreadas.

Se sugiere en algunas investigaciones que el proceso degrada el contenido de antocianinas de las cerezas, reportando una pérdida de más de 50% de las antocianinas en cereza durante 6 meses de almacenamiento en congelación.

No existe actualmente una recomendación del consumo de antocianinas; sin embargo, la gente en USA consume alrededor de 200 mg de antocianinas diariamente.

Debido a su acción biológica y quizá interacciones que afectan la bioactividad, los fitonutrientes en frutas y vegetales son ideales para reducir el riesgo de algunos problemas severos crónicos de salud; por ejemplo, enfermedades del corazón y algunos cánceres (Arts y Hollman, 2005).

Estudios recientes con animales sugieren que el consumo abundante de frutas y vegetales con un alto score de ORAC puede ayudar a disminuir los procesos relacionados con el envejecimiento del cuerpo y el cerebro (Duyff, 1998).

Gran parte de la investigación moderna está enfocada a los téis debido a los efectos de tres ingredientes: antioxidantes (polifenoles), nutrientes y cafeína.

El té contiene altos niveles de antioxidantes llamados polifenoles o flavonoides. Estos compuestos son los más predominantes en el té verde y blanco. En el proceso del té negro otros antioxidantes son formados –teaflavina- este compuesto es más débil que los polifenoles en el té verde, pero todavía presentan actividad antioxidante en experimentos de laboratorio.

Los polifenoles en el té poseen 20 a 30 veces más la potencia antioxidante de la vitamina C y E. Los antioxidantes bajan la capacidad de los radicales libres de las células de dañar las moléculas que elabora nuestro cuerpo (Zang *et al.*, 2002).

La protección que algunos alimentos brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, han sido atribuidas a su alto contenido de varios antioxidantes.

La mayor parte de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales se la proporciona su contenido de vitamina E y C y carotenos, así como de diferentes polifenoles (Kaur y Lapoor, 2001).

La medición de los antioxidantes individuales por separado no permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de un fluido biológico por los efectos sinérgicos que pueden establecerse entre los antioxidantes presentes en él (Daymy-Pineda *et al.*, 1999).

Los radicales libres han sido relacionados con el desarrollo de diversas enfermedades como cáncer diabetes, cataratas y enfermedades cardiovasculares así como también estarían vinculadas con el proceso de envejecimiento. La producción de radicales libres y la subsiguiente peroxidación lipídica, son consecuencias normales del aumento del consumo de oxidantes que se da en el ejercicio. Los suplementos antioxidantes pueden desintoxicar los peróxidos durante el ejercicio y disminuir el daño muscular y el dolor.

4.8 Propiedades relevantes de los antioxidantes para la salud humana

Estas propiedades se pueden clasificar en: antirradicales, antimutagénicas, anticarcinogénicas, antiaterogénicas y antimicrobianas, así como retardar la

senescencia Hernández-Ángel y Prieto (1999). Además, pueden actuar como agentes reductores, quemadores de metales, entre otros (Karadeniz *et al.*, 2005; Jirovetz *et al.*, 2006).

4.9 Microorganismos

La resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse por eso se hace cada vez más necesaria la búsqueda de nuevos compuestos. En tal sentido este trabajo se propone evaluar la actividad antimicrobiana y toxicidad aguda oral de un extracto acuoso de *B. erecta* como elementos indispensables que garantizan el conocimiento y uso adecuado de esta planta medicinal. (Guerra *et al.*, 2004).

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en las preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos. (Ali-Shtayed *et al.*, 1998; Sanabria *et al.*, 1998; De los Ríos *et al.*, 1999). Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Cáceres *et al.*, 1990; Dimayuga y García, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Sanabria *et al.*, 1998; Rangel *et al.*, 2001).

La resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse por eso se hace cada vez más necesaria la búsqueda de nuevos compuestos (Guerra *et al.*, 2004).

Desde la antigüedad el hombre a utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en las preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos (Ali-Shtayed *et al.*, 1998; Sanabria *et al.*, 1998; De los Ríos *et al.*, 1999). Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Cáceres *et al.*, 1990; Dimayuga y García, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Sanabria *et al.*, 1998).

Durante un largo periodo del tiempo, las plantas han sido una fuente valiosa de productos naturales utilizados para mantener salud humana, especialmente, en la década pasada, con el desarrollo de estudios para ser utilizadas en terapias naturales Edeoga *et al.*, (2005). El uso de los compuestos de las plantas para propósitos farmacéuticos ha aumentado gradualmente. Según la Organización Mundial de la Salud las plantas medicinales son la mejor fuente para obtener una variedad de drogas. Cerca del 80% de individuos de los países desarrollados utilizan la medicina tradicional, que utiliza compuestos derivados de las plantas medicinales. Por lo tanto, las plantas se deben investigar para entender mejor sus características, seguridad y eficacia. El uso de los extractos y de los fitoquímicos, pueden ser una alternativa en los tratamientos terapéuticos. En los últimos años, un número importante de estudios

se han llevado a cabo en diversos países para probar tal eficacia. Muchas plantas se han utilizado debido a sus propiedades antimicrobianas, las cuales son debidas a los compuestos sintetizados en el metabolismo secundario de la planta. Estos productos son conocidos por sus compuestos activos, por ejemplo, los compuestos fenólicos, así como los taninos (Nascimento *et al.*, 2000).

4.9.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, no esporulado, móviles con flagelos peritricos o inmóviles aerobio-anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen un 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en laboratorios microbiológicos y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez-Ángeles, 2002).

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de

investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Souza *et al.*, 2001).

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, SIMO por líneas especialmente patógenas en esta localización que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través de agua y alimentos (Nataro y Kaper, 1998).

A nivel nacional las enfermedades infecciosas intestinales ocupan el cuarto lugar como causas de fallecimiento infantil. En la ciudad de Morelia, Michoacán el principal agente causal son cepas patógenas de *Escherichia coli*. de las cuales a la fecha se desconoce el prototipo específico al cual pertenecen (Carreras *et al.*, 2005).

E. coli es el microorganismo no-patógeno más cercano a *S. entérica*; los dos se diferencian aproximadamente por 100 millones de años y conservan su homología en alrededor del 90% a nivel genético. Mucha de las características de la virulencia que se distinguen entre *S. entérica* y *E. coli* son atribuibles a dos especies de *Salmonella*. Algunos clusters pequeños de especies específicas de genes de virulencia han sido identificados y determinados sus islotes de patogenicidad (Worley *et al.*, 2000).

4.9.2 *Salmonella*

El género *Salmonella* se ubica dentro del orden *Enterobacteriales* y la Familia *Enterobacteriaceae*. Sus miembros son bacilos Gram negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarium*) anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados. La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas. Las salmonelas se desarrollan entre 8 y 45°C y un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C (Walker, 1999).

A través de los años se han propuesto varios esquemas de clasificación que introdujeron controversias y confusión en la compleja nomenclatura y taxonomía de *Salmonella*, de tal forma que los científicos usan diferentes sistemas para referirse acerca de este género (DIFCO, 1977).

La *Salmonella* está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves, insectos y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (Kwon and Ricke, 1998; Worley *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista epidemiológico las salmonelas se pueden clasificar en tres grupos: las que no tienen preferencia por algún grupo huésped (infectan tanto al hombre como los animales), las que infectan solo al hombre: *S. Typha*, *S. paratyphi* A y *S. paratyphi* C y las que están adaptadas a un hospedero en especies animales.

Salmonella es uno de los géneros bacterianos que se encuentra asociado a brotes de enfermedades de origen hídrico, ya que son aislados de agua fresca, aguas servidas, agua dulce y agua salada, además de ciertos alimentos (Palacios *et al.*, 1999). Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo y en el agua, así como en salmuera con 20% de sal (Kwon & Ricke, 1998; Ng *et al.*, 1999).

El género *Salmonella* es el agente causal de diferentes infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis, que pueden dividirse en dos síndromes: “La fiebre entérica” (causada por *S. Typhi*) y la “fiebre paratifoidea” (causada por *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B o *S. paratyphi* C); y la gastroenteritis o envenenamiento por alimentos que es una infección restringida a la mucosa intestinal, causada por muchos serotipos.

La infección por *Salmonella* es una infección por fases, la puerta de entrada es la vía digestiva, donde el bacilo debe sobrepasar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica antes de adherirse e invadir las células del epitelio intestinal y penetrar por medio de ciertos genes de virulencia en su interior, donde se multiplica y produce alteraciones histopatológicas (Baumler, 1997; Millemann, 1998).

Su distribución es mundial, así *S. typhimurium* es uno de los serotipos más prevalentes en el mundo, pero últimamente *S. enteritidis* la ha desplazado del primer lugar, existen también algunos serotipos de diseminación limitada, como *S. weltevreden* confirmado en Asia.

Salmonella es el patógeno más encontrado como causante de intoxicaciones alimentarias en países desarrollados, uno de los más frecuentes junto con *E. coli* y *Shigella* en países en desarrollo. Constituye la segunda causa de morbilidad en países en vías de desarrollo, después de los procesos respiratorios, en donde la mayor parte de envenenamientos o contaminación de alimentos son de origen bacteriano (Perales & Audicana, 1989).

Las salmonelas causan un grupo variado de enfermedades infecciosas, denominadas salmonelosis o enfermedades gastrointestinales, que como enfermedad endémica continua siendo un problema en la práctica humana, por ocasionar grandes pérdidas, convirtiéndose así en un importante problema de salud pública y socioeconómico (Wray, 1985; Polo *et al.*, 1998; Darwin & Miller, 1999).

4.9.3 *Candida albicans*

La candidiasis vaginal es una causa frecuente de morbilidad en mujeres en edad fértil. Aproximadamente 75 % de todas las mujeres adultas padecen, al menos, de un episodio de candidiasis vaginal en algún momento de su vida, y 45 % tienden a desarrollar más de un cuadro de candidiasis vaginal, adquiriendo en muchos casos (5-7 %), un carácter crónico que se manifiesta por episodios recurrentes con poca respuesta a la terapéutica (Perurena *et al.*, 2006).

Los factores que predisponen a mujeres a VVC incluyen las fluctuaciones hormonales (es decir, embarazo, fase luteal del ciclo menstrual, contraceptivos

orales, y terapia del reemplazo de la hormona) o uso antibiótico. Otros 5 a los 10% de mujeres aparentemente sanas sufren de VVC recurrente (RVVC) (más de tres episodios *per annum*) sin ningunos factores sabidos de la predisposición (Barousse *et al.*, 2005)

La presencia de especies de *Candida* en la vagina como constituyentes de la microbiota normal está bien documentada y es un elemento que complica el diagnóstico de esta afección, pues no se ha precisado con exactitud, cuándo la cantidad de levaduras presentes en la vagina tiene significación patológica o debe, por el contrario, ser interpretada como simple comensalismo. La *Candida albicans* es responsable de más de 85 % de los episodios iniciales y recurrentes de candidiasis vaginal, pero también *C. glabrata*, *C. tropicales* y *C. krusei* son reportadas con frecuencia (Perurena *et al.*, 2006).

4.10 Cáncer

De acuerdo con los últimos datos reportados por el INEGI, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en la población de México (12.42%), después de las enfermedades cardiovasculares (22.43%). Asimismo, la mortalidad infantil por cáncer en México durante las últimas décadas se ha incrementado drásticamente (20.3%). Para enfrentar esta desfavorable situación en México y en todo el mundo ha sido necesario buscar alternativas contra esta enfermedad. Actualmente, la quimioprevención es una nueva estrategia que ofrece buenas perspectivas contra el

cáncer, la cual emplea agentes sintéticos o naturales (solos o en combinación) para prevenir o bloquear el desarrollo de cáncer en el humano (Colom *et al.*, 2005). El problema principal de los agentes quimiopreventivos, especialmente los sintéticos, es la toxicidad que tienen en células normales. Una alternativa para resolver este problema es el empleo de agentes naturales selectivos y con baja toxicidad, como son los extractos de plantas medicinales que en algunos casos poseen actividades antitumorales y anticarcinogénicas significativas y están desprovistos de efectos tóxicos colaterales (Abdullaev *et al.*, 2002; Jafarova *et al.*, 2002). Dietas ricas en polifenoles han mostrado ser quimiopreventivas (D'Alessandro *et al.*, 2003).

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos clínicamente efectivos en el tratamiento del cáncer tienen una mayor actividad frente a los tumores que proliferan rápidamente como son las leucemias y los linfomas, pero su acción es menos efectiva en los tumores sólidos. Esto aparejado a la resistencia de muchos tumores al tratamiento con citostáticos conocidos, hace necesario continuar la búsqueda de nuevos productos que puedan ser utilizados en el tratamiento del cáncer.

En el periodo comprendido entre los años 1985 a 1990 el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos desarrolló un estudio donde se emplearon diversas líneas tumorales humanas con el objetivo de incrementar el número de fármacos utilizables en la terapia contra el cáncer, con una mayor eficacia en los tumores sólidos. De este estudio surge el Paclitaxel aislado de la corteza del *Taxus brevifolia*, el que muestra una potente actividad frente a los tumores sólidos.

En la actualidad, las plantas continúan representando el recurso natural más explorado en la búsqueda de anticancerígenos, se encuentra en estudio una amplia variedad de familias como fuentes de estos productos, un ejemplo de esto son las familias *Umbelliferae*, *Euphobeaceae*, *Papaveraceae* y *Annonaceae* (Pérez *et al.*, 2005).

4.10 Sistema inmune

Los seres superiores están defendiendo constantemente su integridad biológica frente a agresiones, esencialmente externas. De no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones de bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno.

La respuesta inmune de tipo celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. En ella participan esencialmente los linfocitos T cooperadores (Th) y citotóxicos (Tc) (Peña, 2003; Guerra *et al.*, 2004).

Una de las funciones principales del sistema inmune es la inmunovigilancia, la cual controla el desarrollo de las células tumorales. La respuesta inmune antitumoral

se fundamenta en el hecho de que las profundas alteraciones genéticas, metabólicas y morfológicas que presenta una célula tumoral induce o se acompaña de la aparición de los nuevos antígenos (antígenos asociados a tumores). Es la presencia de estos antígenos lo que le permiten al sistema inmune reconocer como extrañas a las células tumorales para tratar de eliminarlas. La respuesta inmune puede ser modificada y regulada por varios factores físicos o químicos.

Un inmunomodulador o inmunorregulador es una sustancia capaz de producir un efecto o un cambio en los mecanismos básicos de regulación en la respuesta inmune. Las terapias biológicas pueden ser diseñadas para reparar, disminuir o incrementar la función del sistema inmune. La inmunoestimulación es un recurso profiláctico y terapéutico basado en el uso de plantas, microorganismos y productos sintéticos, capaces de activar los mecanismos de defensa corporal específicos y no específicos.

El timo es el principal productor de linfocitos T y es, por tanto, crucial para el sistema inmune. Durante la gestación los linfocitos T se desarrollan, acarreado en su superficie celular marcadores que son utilizados para identificar cada tipo de células propias del organismo. Las hormonas tímicas y las interleukinas controlan todas las fases de maduración, diferenciación, reconocimiento de antígenos, proliferación y actividad citotóxica de los linfocitos T. Las hormonas tímicas también participan en la activación de las células fagocíticas y de las células citotóxicas naturales a responder contra antígenos extraños (Licón *et al.*, 2005).

Entre las moléculas efectoras del sistema inmune los anticuerpos son, sin lugar a dudas, cruciales para el control de infecciones. Los anticuerpos son secretados por

células plasmáticas, las cuales corresponden al estadio de diferenciación terminal de los linfocitos B. Existen diferentes poblaciones de linfocitos B maduros con capacidad para producir anticuerpos: 1) linfocitos B convencionales también conocidos como linfocitos B foliculares o linfocitos B2 o linfocitos B0, 2) linfocitos B de zona marginal esplénica, y 3) linfocitos B1.

Durante el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa se producen anticuerpos efectores de alta afinidad específicos para el patógeno o inmunógeno, resultado de la interacción entre las células B y las células T cooperadoras. Esta respuesta precisa pero lenta, denominada T dependiente o T-dependiente, involucra generalmente las células B2. Sin embargo, anticuerpos ya presentes en el suero, denominados anticuerpos naturales, que contribuyen a la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos extracelulares, son producidos de manera T independiente por los linfocitos B1 y los linfocitos B de zona marginal. Estos anticuerpos naturales, que representan la única protección frente a bacterias encapsuladas, son aportados mayoritariamente por los linfocitos B1 ya que estas células son numéricamente superiores a los linfocitos B de zona marginal (Merino y Gruppi, 2006).

Las células macrofágicas están envueltas en un amplio espectro de reacciones de defensa. Luego de establecerse un contacto con un agente agresor, estos fagocitos actúan liberando citoquinas proinflamatorias que inician y amplifican el proceso inflamatorio. Los macrófagos son células que participan directamente ante cualquier estímulo físico, químico o bacteriano, siendo elementos críticos para la respuesta a diversas agresiones, por su capacidad para la fagocitosis y su potencial en los procesos antígeno-anticuerpo.

La capacidad de adherencia a algunos sustratos como el plástico y el vidrio, además de estar relacionado con el desarrollo de las reacciones inflamatorias y la fagocitosis, permite diferenciar poblaciones macrofágicas con distinto comportamiento migratorio, de diferenciación y muerte celular. Esta característica puede ser alterada significativamente por algunos estímulos que activan a los macrófagos, induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como son IL-1beta, IL-6, TNF-alfa. La liberación de citoquinas proinflamatorias a partir de los macrófagos tienen un importante efecto en el reclutamiento, proliferación y diferenciación de osteoblastos, favoreciendo la reabsorción ósea. Se ha demostrado que la pulpa y los tejidos periapicales inflamados contienen una gran variedad de células inmunocompetentes, con predominancia de macrófagos, a través de los cuales se inducen todos los estadios de lesiones periapicales (Cardoso *et al.*, 2005).

La actividad inflamatoria o citotóxica de los leucocitos está sujeta a una regulación compleja. Un ejemplo bien estudiado es el macrófago peritoneal del ratón para el cual se han hecho distinciones entre poblaciones residentes, inflamatorio, e inmunológicamente activados. La generación de un macrófago capaz de matar un tumor requiere una señal primaria que actúe en un macrófago inflamatorio, pero no en un macrófago residente, esto crea un estado transitorio durante el cual el contacto con la célula blanco inicia la respuesta citotóxica (Skeel *et al.*, 1991).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de Estudio

Las muestras fueron colectadas en el Municipio de General Terán, Nuevo León; dicho municipio se encuentra ubicado en la región sureste citrícola entre las coordenadas 25°17' de latitud norte y 99°10' de longitud este; tiene una altitud de 230 msnm.

Su orografía está conformada principalmente de pequeñas elevaciones o lomeríos bifurcaciones de la Sierra Madre Oriental.

Tanto la orografía como la hidrografía hacen que el municipio de General Terán presente una flora y fauna rica y pródiga. El clima es variado notándose claramente cada una de las estaciones del año, sin embargo cabe aclarar que tanto el verano como el invierno son extremos, las lluvias se presentan al finalizar el verano en los meses de julio y agosto, aunque estas son impredecibles y se pueden presentar en cualquier mes del año.

Los principales ecosistemas como son la flora y la fauna son muy abundantes. La flora es abundante y variada donde se pueden observar extensos campos de naranjales.

En la parte nororiental de tierra fértil se pueden observar sabinos, sauces, encinos, ébanos, álamos, alamillos jarilla, moreras, anacuas, etc. En la parte árida: nopales, palmas, samandoca, huizaches, mezquites, granjenos, tasajillos, etc. (INEGI, 2000).

5.2 Diseño del Muestreo

Las muestras fueron colectadas directamente de diversas plantas al azar en cantidad suficiente para llevar a cabo las pruebas. Se trabajó con semillas tiernas y maduras. Los parámetros de selección del fruto en los dos estadios de desarrollo fueron color y tamaño de las vainas. Para las muestras maduras se consideró una diferencia no mayor de 2.0 y 0.5 cm de longitud y de ancho, respectivamente y de coloración y grosor similar. Las vainas verdes con un grado de desarrollo próximo a la maduración completa. Se obtuvo una muestra representativa de cada estado de madurez con colectas al azar de semillas de plantas de *Ebenopsis ebano* en cantidad suficiente para llevar a cabo las pruebas químicas, así como la medición de la actividad biológica de los compuestos a investigar.

Las semillas colectadas fueron transportadas al Laboratorio "Ciencia de los Alimentos" de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En el caso de las vainas tiernas el transporte se hizo en refrigeración.

Una vez obtenidas las muestras se realizó una inspección visual para que las semillas seleccionadas presentaran una calidad uniforme (no presenten picaduras de

insectos o algún tipo de deterioro). Una vez separadas las porciones y aplicados los tratamientos, éstas se trataron para su conservación hasta los análisis.

5.3 Tratamientos (Apéndice A)

Las semillas tiernas se sometieron a dos tipos de tratamiento. El primer lote se trabajó crudo, al cual se le removió la vaina y la testa manualmente (T1). Un segundo lote de semilla tierna se trató en su vaina térmicamente a temperatura de ebullición del agua y presión atmosférica por 30 minutos, después de aplicado el tratamiento térmico se removió la vaina y la testa manualmente (T2). Una vez obtenidos los cotiledones de las semillas crudas y cocidas se liofilizaron enteros y se almacenaron hasta su posterior utilización.

Por otro lado a las semillas maduras y secas se les aplicaron tres tratamientos. En el primero a las semillas maduras se les retiró la vaina y la testa manualmente en crudo (T3). En el segundo las semillas maduras se tostaron con la testa a 80-90°C por espacio de 10 minutos en un baño de arena, después del proceso de tostado se les retiró la testa manualmente (T4). El tercer tratamiento consistió en obtener las semillas maduras y tostadas comercialmente, las cuales son tratadas mediante un proceso artesanal sin control de factores (temperatura y tiempo) a las cuales se les retiró la testa manualmente (T5). Una vez aplicados los diferentes tratamientos a las semillas maduras, estas se almacenaron en congelación hasta su utilización.

5.4 Procedimiento químico analítico

5.4.1 Composición proximal

El análisis proximal comprende las siguientes determinaciones:

- a) Humedad
- b) Material mineral (cenizas)
- c) Proteínas
- d) Extracto etéreo (grasas)
- e) Fibra dietética
- f) Extracto libre de nitrógeno (carbohidratos)

Los procedimientos analíticos se realizaron por triplicado de acuerdo a los métodos oficiales establecidos en el AOAC 2000.

- g) Fibra dietética total de acuerdo al método del AOAC 2000

5.4.2 Polifenoles totales

La determinación se realizó en los extractos crudos acuosos y metanólicos de los cinco tratamientos aplicados a las semillas tiernas y maduras de acuerdo al método propuesto por Folin-Cicalteau (Asamy *et al.*, 2003).

5.4.3 Grado de polimerización

La determinación se realizó en los extractos crudos acuosos y metanólicos de los cinco tratamientos aplicados a las semillas tiernas y maduras de acuerdo al método de Glorie's (Mazza *et al.*, 1999).

5.4.4 Actividad antioxidante

La determinación se realizó en los extractos crudos acuosos y metanólicos de los cinco tratamientos aplicados a las semillas tiernas y maduras tomando un volumen de 3.0 ml de solución de DPPH en metanol 6.1×10^{-5} se le agregan 10 μ l del extracto de la muestra. El blanqueado del DPPH se realiza a una $\lambda = 515$ nm a 0 min, 1 min, y cada minuto hasta que la reacción alcance un estado de estabilidad utilizando como solución estándar el BHT y n-propil galato (Da Porto *et al.*, 2000; Ferruzzi *et al.*, 2002).

Una vez que se llevaron a cabo las determinaciones los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando estadística descriptiva, se empleó un diseño totalmente al azar para comparar tratamientos y extractos, éste fue analizando utilizando ANOVA de una vía, posteriormente la Prueba de Comparación Múltiple de Medias de Duncan para las muestras que resultaron diferentes.

5.5 Preparación de extractos.

5.5.1 Extractos acuosos.

Se realizaron infusiones de las semillas para cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente colocando 1g del material en 50mL de agua a 100 °C, se dejó reposar por espacio de 10 min en la oscuridad. Una vez completado el tiempo se centrifugó a 2800 rpm durante 15min para obtener el sobrenadante, el cual posteriormente fue liofilizado. El material liofilizado se resuspendió en los disolventes adecuados para llevar a cabo las pruebas.

5.5.2 Extractos metanólicos.

Se colocaron 5g de la semilla (cada tratamiento por separado) en una tela tipo gasa, y se colocaron en un vaso de precipitado conteniendo 50 mL de metanol absoluto. Se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente protegido de la luz. El extracto obtenido se centrifugó a 2800 rpm durante 15min para obtener el sobrenadante, el cual fue colocado en tubos Ependorff previamente pesados para secarlos al vacío y obtener el peso seco. El material seco obtenido se resuspendió en una mezcla de 300 μ L de metanol y 700 μ L del disolvente adecuado para llevar a cabo las pruebas.

5.6 Actividad biológica

5.6.1 Reactivos

La solución de penicilina-estreptomicina, L-glutamina, Fungizona y medios RPMI 1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El suero fetal bovino (SFB), metanol, buffer de lisis para eritrocitos, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), Concanavalina A (CON A), filtros milipore de 0.22µm se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los medios de cultivo Infusión Cerebro Corazón (ICC), Yeast Médium Broth (YM) y el agar bacteriológico se obtuvieron en CTR Scientific (Monterrey, NL). La línea celular 5178y-R se obtuvo de la American Type Culture Collection (Rockville, MD).

5.6.2 Animales de experimentación

Ratones macho Sprague_Dawley de 6 a 8 semanas para la determinación de macrófagos peritoneales, proliferación de linfocitos tímicos y linfocitos de bazo se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24°C, bajo un ciclo de luz-oscuridad (fase lumínica 7:00-19:00 horas), y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley Inc (Indianápolis, IN).

5.6.3 Línea Celular

La línea celular L5178Y-R se obtuvo de la ATCC y se utilizó RPMI completo (10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina, 0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de fungizona) como medio de propagación.

La línea celular L5178Y-R es un linfoblastoma murino, se obtuvo a partir de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 con metilcolantreno. Se adaptó el tumor a una suspensión de líneas celulares llamada L5178Y-R (ATCC, 1994).

5.6.4 Viabilidad Celular

El empleo del MTT ha mostrado que es posible medir tanto la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad sobre células normales. La reducción de sales de tetrazolio por microorganismos se ha descrito anteriormente (Gómez-Flores, et al, 1995). Mosmann describió un método basado sobre la descomposición de la sal de tetrazolio (MTT) por la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas; el anillo de tetrazolio de MTT es abierto y es reducido a azul formazán. Dando como resultado un cambio de color, la intensidad de este refleja la actividad enzimática de las células vivas la cual puede ser medida espectrofotométricamente (Huissain *et al.*, 1993).

5.7 Actividad antibiótico *in vitro* contra *E. Coli* y *Salmonella* y *Cándida albicans*.

5.7.1 Preparación del stock de microorganismos (*E. Coli*, *Salmonella* y *Candida albicans*).

Se cultivaron los microorganismos en Agar Infusión Cerebro Corazón (ICC) para *E. Coli* y *Salmonella* y YM para *Candida albicans*, se incubaron 24 horas a 37°C, se tomó una colonia y se resuspendió en caldo ICC o YM con 5% de glicerol, respectivamente, se ajustó la cantidad de células a 1×10^3 células/mL en una cámara de Neubauer, posteriormente se distribuyeron en tubos estériles para cada ensayo y se congelaron a -20°C. A la par se siembran en el agar correspondiente para asegurar el contenido de células, una vez que se tiene la cantidad deseada se utiliza como “stock”, el cual se descongela previamente a ser utilizadas en el estudio.

5.7.2 Efecto antibiótico vs. *E. coli* y *Salmonella*.

Los extractos de los tratamientos utilizados fueron disueltos en medio ICC para su utilización en la prueba.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 50µL del tratamiento con 50µl del medio ICC y 50µl de la suspensión de células, se incuba 5h a 37°C. Posteriormente se adicionan 15µL a cada pozo de MTT a una concentración de 0.5mg/ml, y se incuba el cultivo por 4h, se agregan 100µL del amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incuba de 16-21h. Se leen las densidades ópticas

resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.7.3 Efecto antibiótico *vs.* *Candida albicans*

Los diferentes extractos utilizados fueron disueltos en medio YM para su utilización en la prueba.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 50µl del tratamiento con 50µL del medio YM y 50µL de la suspensión de células, se incuba 21-24h a 37°C. Posteriormente se adicionan 15µL a cada pozo de MTT a una concentración de 0.5mg/ml, y se incuba el cultivo por 4h, se agregan 100µL del amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incuba de 16-21h. Se leen las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.7.4 Efecto citotóxico *in vitro* *vs.* línea celular L5178Y-R

Se prepararon extractos metanólicos y acuosos en medio RPMI-1640 de los tratamientos de las semillas de ébano los cuales se probaron en la línea celular tumoral L5178Y-R (linfoblastoma murino) (ATCC, 1994).

Las células se obtienen directamente del tumor generado en el ratón y se prepara una suspensión de células a una concentración de 5×10^4 cel/mL, la cual se utilizó en el experimento.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 100µL del tratamiento (a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 125 y 250µg/mL) con 100µL del medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino y 100µL de la suspensión de células, se incuba 44h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se adicionan 20µL a cada pozo de MTT a una concentración de 5mg/mL, y se incuba el cultivo por 4h, se agregan 80µL del amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incuba de 16-21h. Se leen las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.7.5 Efecto *in vitro* sobre la proliferación de linfocitos de timo

El timo se obtuvo de ratones sanos. Una vez extraído el timo del ratón se colocó en un recipiente estéril el cual contenía medio RPMI-1640, se maceró en condiciones de esterilidad, se centrifugó para separar el tejido, se recuperó el sobrenadante y se procedió a centrifugar para separar las células del resto de la solución, una vez separadas las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 el cual contenía suero fetal bovino y se procedió a contar las células de la suspensión en una cámara de Neubauer para ajustar el contenido a una concentración de 1.25×10^7 cel/mL. Esta suspensión de células se utilizó para el experimento.

Por otro lado, se prepararon extractos metanólicos y acuosos en medio RPMI-1640 de los tratamientos de las semillas de ébano los cuales se utilizaron en el experimento.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 100µL del tratamiento (a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 125 y 250µg/mL) con 100µL del medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino y 80µL de la suspensión de células de concentración conocida y 20µL de medio de cultivo. En la misma placa se coloca todo lo mencionado anteriormente, solo que en lugar de agregar 20µL de medio de cultivo se agregan 20µL del mitógeno Concanavalina A (activador de células), se incuba 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se adicionan 20µL/pozo de MTT (5mg/mL), y se incuba el cultivo por 4h, se agregan 80µL del amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incuba de 16-21h. Se leen las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas. Se hicieron tres experimentos con tres réplicas cada uno (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.7.6 Efecto *in vitro* sobre la proliferación de linfocitos de bazo

El bazo se obtuvo de ratones sanos. Una vez extraído el bazo del ratón se colocó en un recipiente estéril el cual contenía medio RPMI-1640, se maceró en condiciones de esterilidad, se centrifugó para separar el tejido, se recuperó el sobrenadante y se procedió a centrifugar para separar las células del resto de la solución, una vez separadas las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 el cual contenía suero fetal bovino y se procedió a contar las células de la suspensión en una cámara de Neubauer para ajustar el contenido a una concentración de 1×10^7 cel/mL. Esta suspensión de células se utilizó para el experimento.

Por otro lado, se prepararon extractos metanólicos y acuosos en medio RPMI-1640 de los tratamientos de las semillas de ébano los cuales se utilizaron en el experimento.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 100µL del tratamiento (a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 125 y 250µg/mL) con 100µL del medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal bovino y 80µL de la suspensión de células de concentración conocida y 20µL de medio de cultivo. En la misma placa se coloca todo lo mencionado anteriormente, solo que en lugar de agregar 20µL de medio de cultivo se agregan 20µL del mitógeno Concanavalina A (activador de células), se incuba 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se adicionan 20µL/pozo de MTT (5mg/mL), y se incuba el cultivo por 4h, se agregan 80µL del amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incuba de 16-21h. Se leen las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas. Se hicieron tres experimentos con tres réplicas cada uno (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.7.7 Efecto *in vitro* sobre la activación de macrófagos peritoneales

Los macrófagos se obtuvieron de ratones sanos. Una vez obtenidos los macrófagos del ratón se colocaron en frío en un tubo el cual contenía medio RPMI-1640, se centrifugó para separar las células del resto de la solución, una vez separadas las células se resuspendieron en medio AIM-V y se procedió a contar las células de la suspensión en una cámara de Neubauer para ajustar el contenido a una concentración de 1.7×10^6 cel/mL. Esta suspensión de células se utilizó para el experimento.

Por otro lado, se prepararon extractos metanólicos y acuosos en medio AIM-V de los tratamientos de las semillas de ébano los cuales se utilizaron en el experimento.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 100µL de la suspensión de macrófagos y se incuban por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, después de la incubación se elimina el sobrenadante, la placa se lava con 100µL de medio AIM-V y se agrega a cada pozo que contiene los macrófagos 100µL del tratamiento (a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 125 y 250µg/mL), se incuba 72 h a 37°C y 5% de CO₂ después de la incubación se separan 50µL de la suspensión en otra placa de 96 pozos para la determinación de la producción de óxido nítrico. A cada pozo se le agregan 50µL de Reactivo B de Griess (sulfanilamida), se incuba 10 min en la oscuridad y posteriormente se le agregan 50µL del Reactivo A de Griess (α -naftil amina), se incuba 10 min en la oscuridad y se leen las densidades ópticas a 570nm en un lector de microplacas. En la placa original que contiene 50µL se adicionan 15µL/pozo de MTT (5mg/mL), y se incuba la placa por 2h, se agregan 100µL de DMSO a todos los pozos y se leen las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540nm en el lector de microplacas. Se hicieron tres experimentos con tres réplicas cada uno (Gómez-Flores *et al.*, 1995).

5.8 Diseño del experimento

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, tanto para las mediciones químicas como para las evaluaciones biológicas. Las variables que se investigaron fueron: humedad, proteínas, cenizas, grasas, fibra

cruda, extracto libre de nitrógeno (por diferencia), fibra dietética, grado de polimerización de polifenoles, actividad antioxidante, actividad antibiótico, actividad antitumoral y actividad inmunorreguladora.

5.8.1 Análisis Estadístico

Las pruebas químicas se realizaron por triplicado, una vez obtenidos los resultados del diseño completamente al azar, estos se analizaron utilizando estadística descriptiva, así como ANOVA para determinar diferencia entre los tratamientos seguido de una prueba de comparación múltiple de medias de Duncan en las pruebas que resulten significativamente diferentes utilizando el programa estadístico SPSS v.10.

Las pruebas *in vitro* se analizaron estadísticamente utilizando estadística descriptiva y la prueba t, con el programa estadístico Microcal Origin.

6. RESULTADOS

6.1 Composición química

6.1.1 Análisis proximal

En la tabla 1 se observa que las semillas de *Ebenopsis ebano* contienen los principales macronutrientes. Con respecto al contenido de humedad, proteína, ceniza y grasa los resultados muestran que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos aplicados a los distintos estados de madurez de las semillas (tiernas y maduras). En el caso de los hidratos de carbono, este fue determinado por diferencia a 100.

Por otro lado se observa en todos los tratamientos y estados de madurez la presencia de fibra dietética, esta en cantidades comparables a otras leguminosas como el frijol o garbanzo, donde en función del tratamiento los valores del contenido de este macronutriente van desde 4 a 28% (Wenzel y Lajolo, 2000).

Tabla 1. Composición química proximal de semillas de *Ebenopsis ebano* en diferentes estados de madurez

Estado de Madurez	Humedad % $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Proteína (%Nx6.25) $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Ceniza % $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Grasa % $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Fibra Dietética* %	Hidratos de Carbono** (%)
Tierna cruda	4.97±0.003 ^b	68.19±0.216 ^d	5.47±0.145 ^c	3.89±0.166 ^a	10.50	6.97
Tierna cocida	4.41±0.141 ^a	48.47±0.583 ^c	6.46±0.120 ^d	6.01±0.147 ^b	15.89	18.76
Madura cruda	10.05±0.128 ^c	35.91±0.177 ^a	3.14±0.063 ^b	22.08±0.134 ^d	8.62	20.20
Madura tostada	7.29±1.576 ^c	37.28±0.164 ^b	2.68±0.098 ^a	21.18±0.171 ^c	9.48	19.65

* Solo se realizó una vez

** Se determinó por diferencia a 100

a,b,c,d indican diferencia significativa entre muestras

n=3

6.1.2 Polifenoles totales

En la Tabla 2 se presentan los resultados del contenido de polifenoles totales (expresados como ácido ferúlico) para los extractos acuosos en los diferentes estados de madurez y los diferentes tratamientos aplicados a las semillas. En dichos resultados se observa que el mayor contenido de compuestos polifenólicos es en la semilla tierna cocida (T2), siendo diferente estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$) con las semillas tierna cruda y las maduras en sus diferentes tratamientos. Estadísticamente entre las semillas tierna y madura cruda (T1 y T3) y la madura tostada (condiciones controladas) (T4) no se observa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), así como entre las semillas maduras tostadas (en condiciones controladas y la obtenida comercialmente) (T4 y T5), observándose entre estas últimas un mayor contenido en el T5.

Tabla 2. Contenido de Polifenoles totales en extractos crudos acuosos de semillas de *Ebenopsis ebano* con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Ácido Ferúlico (g/L) $\bar{x} \pm SEM$
Tierna cruda	0.131 \pm 0.002 ^a
Tierna cocida	0.204 \pm 0.016 ^c
Madura cruda	0.127 \pm 0.003 ^a
Madura tostada	0.139 \pm 0.000 ^{a,b}
Madura comercial	0.163 \pm 0.011 ^b

a,b,c indican diferencia significativa entre muestras
n=3

En la Tabla 3 se presentan los resultados del contenido de polifenoles totales (expresados como ácido ferúlico) para los extractos metanólicos en los diferentes estados de madurez y los diferentes tratamientos aplicados a las semillas. En dichos resultados se observa que el mayor contenido de compuestos polifenólicos es en la semilla tierna cocida (T2), siendo diferente estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$) con las semillas tierna cruda y las maduras en sus diferentes tratamientos. Por otro lado, entre la semilla tierna y madura cruda (T1 y T3) y la semilla madura tostada (T4) no se observa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), mientras que la semilla madura tostada comercial es diferente estadísticamente ($p < 0.05$), ocupando el segundo lugar en el contenido de polifenoles.

Tabla 3. Contenido de Polifenoles totales en extractos crudos metanólicos de semillas de *Ebenopsis ebano* con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Ácido Ferúlico (g/L) $\bar{x} \pm SEM$
Tierna cruda	0.147 \pm 0.002 ^a
Tierna cocida	0.215 \pm 0.003 ^c
Madura cruda	0.136 \pm 0.005 ^a
Madura tostada	0.146 \pm 0.003 ^a
Madura comercial	0.175 \pm 0.06 ^b

a,b,c indican diferencia significativa entre muestras
n=3

6.1.3 Grado de polimerización

Con relación al contenido de compuestos polifenólicos clasificados por el grado de polimerización de los compuestos en los diferentes tratamientos se observa que en la semilla tierna cruda (T1) existe diferencia significativa entre los compuestos polifenólicos presentes en las semillas de ébano distribuidos de la siguiente manera de acuerdo con la prueba de Duncan ($p < 0.05$): ac. gálico en el extracto acuoso y metanólico y quercetina en el extracto acuoso son significativamente iguales; ácido gálico en el extracto acuoso y metanólico y quercetina del extracto metanólico son significativamente iguales; ácido cafeico en el extracto acuoso es significativamente diferente a los demás, así como ácido cafeico en el extracto metanólico también es significativamente diferente a los demás.

Para la semilla tierna cocida (T2) y madura cruda (T3) se observan tres grupos estadísticamente diferentes en el contenido de compuestos polifenólicos clasificados

de acuerdo al grado de polimerización utilizando la prueba de Duncan ($p < 0.05$): ácido gálico en el extracto acuoso y metanólico y quercetina en el extracto acuoso y metanólico; ácido cafeico en el extracto acuoso y ácido cafeico en el extracto metanólico.

En la semilla madura tostada (T4) se observan cuatro grupos estadísticamente diferentes en el contenido de compuestos polifenólicos clasificados de acuerdo al grado de polimerización utilizando la prueba de Duncan ($p < 0.05$): derivados de la quercetina en el extracto acuoso; derivados de la quercetina en el extracto metanólico y derivados del ácido gálico en los extractos acuoso y metanólico; derivados del ácido cafeico en el extracto acuoso y derivados del ácido cafeico en el extracto metanólico.

En la semilla madura tostada comercial (T5) solo se observan dos grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$): derivados del ácido gálico de los extractos acuoso y metanólico y derivados de la quercetina en los extractos acuoso y metanólico; derivados del ácido cafeico en los extractos acuoso y metanólico.

En la tabla 4 se presentan los resultados del contenido de polifenoles clasificados de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en el extracto acuoso de las semillas de ébano en los diferentes tratamientos aplicados. Los compuestos que predominan en el extracto acuoso son los derivados del ácido cafeico, observándose un mayor contenido en la semilla madura tostada comercial (T5), siendo esta diferente al resto de los tratamientos de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$), en

el caso de la semilla tierna cruda y cocida (T1 y T2) no existe diferencia estadísticamente significativa en el contenido de ácido cafeico ($p < 0.05$), en la semilla tierna cocida y la madura cruda (T2 y T3) no existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y por último la que presenta un menor contenido de compuestos polifenólicos expresados como ácido cafeico es la semilla madura tostada (T4), siendo esta estadísticamente diferente a los otros tratamientos.

Con relación al ácido gálico que es el segundo grupo de compuestos polifenólicos presentes en la semilla de ébano se observa que el tratamiento que presenta mayor contenido de estos compuestos es la semilla madura tostada comercial (T5), siendo esta estadísticamente diferente a los otros tratamientos ($p < 0.05$). En el caso de la semilla tierna cocida, madura cruda y madura tostada (T2, T3 y T4) no existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), finalmente para estos compuestos los que presentan menor contenido es la semilla tierna cruda y cocida (T1 y T2), siendo estas estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

El otro tipo de compuestos polifenólicos presentes en la semilla de ébano son los derivados de la quercetina, los cuales se presentan en mayor concentración en la semilla madura tostada comercial (T5) con diferencia estadísticamente significativa al resto de los tratamientos ($p < 0.05$), la semilla tierna cruda, tierna cocida y madura cruda (T2, T3 y T4) no presentan diferencia estadísticamente significativa con relación al contenido de compuestos ($p < 0.05$) y la semilla madura tostada (T4) presenta el menor contenido de derivados de la quercetina, siendo este tratamiento estadísticamente diferente a los demás ($p < 0.05$).

No se detecta en ninguno de los extractos acuosos ni de los tratamientos la presencia de derivados de malvidin-3-glucósido.

Tabla 4. Contenido de Polifenoles de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en extractos crudos acuosos de semillas de *Ebenopsis ebano* para diferentes tratamientos

Tratamiento	Ácido Gálico mg/100g $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Ácido Cafeico $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Quercetina $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Malvidin- 3-glucósido $\bar{x} \pm \text{SEM}$
Tierna cruda	0.085±0.005 ^a	0.967±0.083 ^c	0.054±0.003 ^b	ND
Tierna cocida	0.096±0.004 ^{a,b}	0.807±0.130 ^{b,c}	0.045±0.003 ^b	ND
Madura cruda	0.108±0.009 ^b	0.607±0.072 ^b	0.044±0.003 ^b	ND
Madura tostada	0.102±0.007 ^b	0.277±0.032 ^a	0.008±0.001 ^a	ND
Madura comercial	0.312±0.012 ^c	2.027±0.188 ^d	0.194±0.008 ^c	ND

a,b,c indican diferencia significativa entre muestras
n=3

En la tabla 5 se presentan los resultados del contenido de polifenoles clasificados de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en el extracto metanólico de las semillas de ébano en los diferentes tratamientos aplicados. Los compuestos que predominan en el extracto acuoso son los derivados del ácido cafeico, observándose un mayor contenido en la semilla madura tostada comercial (T5), siendo esta diferente al resto de los tratamientos de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$), estadísticamente diferente el contenido de ácido cafeico en la semilla tierna cruda (T1) ($p < 0.05$), seguido de la semilla tierna cocida (T2) y madura cruda (T3) ($p < 0.05$), y con menor contenido y estadísticamente diferente la semilla Madura tostada (T4) ($p < 0.05$). Con relación al contenido de ácido gálico y quercetina como se mencionó anteriormente en algunos tratamientos no se observa diferencia estadísticamente significativa en el contenido de estos compuestos, sin embargo en el caso de la semilla madura tostada (T4) si se da el caso.

Tabla 5. Contenido de Polifenoles de acuerdo al grado de polimerización de los compuestos en extractos crudos metanólicos de semillas de *Ebenopsis ebano* para diferentes tratamientos

Tratamiento	Ác. Gálico mg/100g $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Ác. Cafeico $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Quercetina $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Malvidin- 3-glucósido $\bar{x} \pm \text{SEM}$
Tierna cruda	0.163 \pm 0.015 ^c	1.627 \pm 0.118 ^c	0.180 \pm 0.010 ^c	ND
Tierna cocida	0.133 \pm 0.030 ^{b,c}	1.023 \pm 0.085 ^b	0.103 \pm 0.006 ^b	ND
Madura cruda	0.100 \pm 0.017 ^{a,b}	0.923 \pm 0.058 ^b	0.107 \pm 0.006 ^b	ND
Madura tostada	0.079 \pm 0.030 ^a	0.557 \pm 0.051 ^a	0.072 \pm 0.005 ^a	ND
Madura comercial	0.223 \pm 0.025 ^d	1.976 \pm 0.130 ^d	0.230 \pm 0.012 ^d	ND

a,b,c indican diferencia significativa entre muestras
n=3

6.2 Actividad antioxidante

6.2.1 Extractos acuosos

En tabla 6 se presentan los resultados de la absorbancia de la actividad antioxidante de los extractos acuosos crudos de las semillas de *Ebenopsis ebano* a las cuales se les aplicaron los tratamientos T1 a T5. La semilla tierna cocida (T2) a los 30 min es la que presenta mayor reducción de la absorbancia, lo que significa que los compuestos presentes en el extracto tienen mayor actividad antioxidante frente al DPPH, seguida de la semilla tierna cruda (T1). De acuerdo a los resultados la semilla madura en sus diferentes tratamientos cruda, tostada y tostada comercial (T3, T4 y T5) presentan menor actividad antioxidante que la semilla tierna, sin embargo, estadísticamente todos los tratamientos son diferentes de acuerdo con la prueba de Duncan ($p < 0.05$). Comparando los resultados de los tratamientos de los extractos acuosos con respecto a los estándares, estos presentan mayor actividad antioxidante

que el BHT ya que para realizar la prueba fue necesario utilizar casi la mitad de muestra de la misma concentración en el estándar, aunque, la actividad antioxidante de los tratamientos (T1 a T5) es menor comparada con el n-propil galato, ya que para este se utilizaron solo 3µL de la misma concentración que para los tratamientos.

Otra forma de evaluar la actividad antioxidante es midiendo el tiempo que se requiere para reducir la absorbancia de la solución en un 50%. Los tiempos a los que se obtuvieron dichos resultados variaron, siendo para el tratamiento T2 el menor tiempo y este tres veces menos que los demás tratamientos (T1, T3, T4 Y T5), los cuales son muy parecidos entre sí y equivalente al estándar de BHA, pero es al doble de tiempo que el n-propil galato.

Tabla 6. Actividad Antioxidante de la semilla de <i>Ebenopsis ebano</i> frente a DPPH					
Extractos Crudos Acuosaos					
Tratamiento	Muestra (µL)	Absorbancia inicial	Absorbancia a 30 min	50% de Absorbancia/t	% Inhibición a 30 min
Tierna Cruda	600	0.861	0.484	0.439/42	43.79 ^c
Tierna Cocida	600	0.874	0.386	0.438/16	55.83 ^a
Madura cruda	600	0.928	0.512	0.466/43	44.83 ^e
Madura tostada	600	0.887	0.544	0.482/46	38.67 ^f
Madura tostada comercial	600	0.901	0.553	0.475/46	38.63 ^g
BHA	1000	1.009	0.310	0.498/15	69.28 ^d
n-propil galato	3	0.854	0.133	0.429/7	84.42 ^b

En las Fig. 6 a10 se presentan los resultados de la medición del decremento de la absorbancia a través del tiempo para los diferentes tratamientos aplicados a las

semillas tiernas y maduras de *Ebenopsis ebano*, en ellas se muestra la absorbancia a los 30 min y el tiempo donde se observa el 50% de la reducción de la misma.

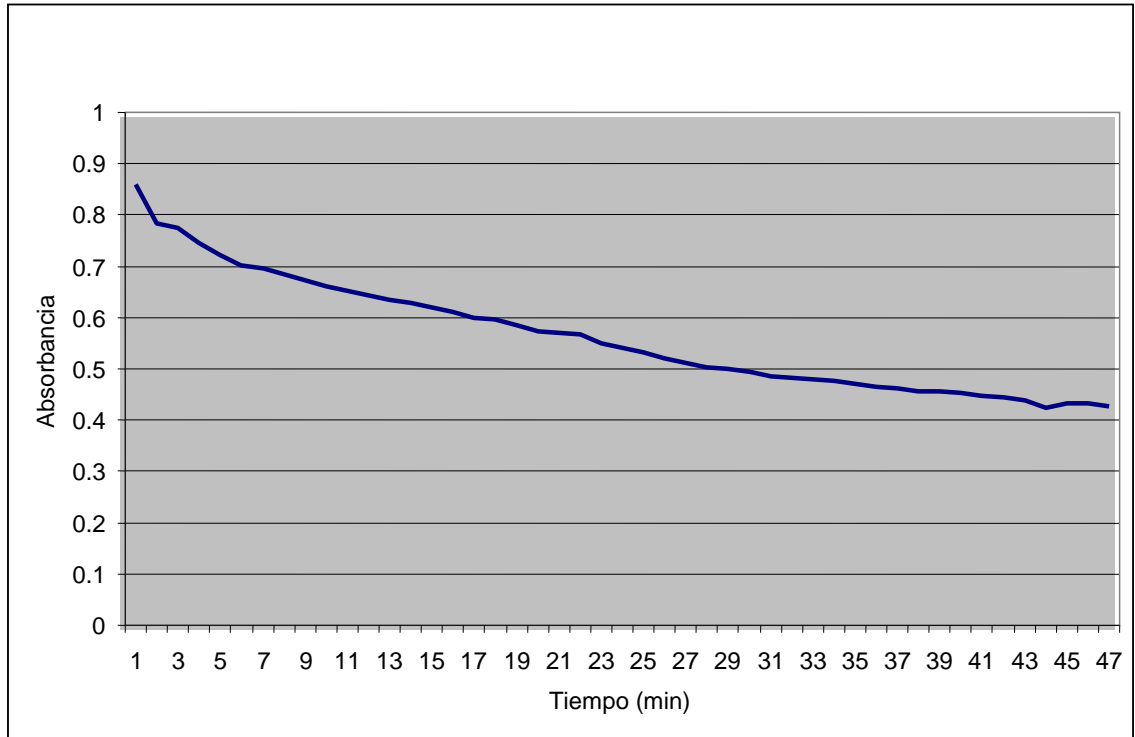


Fig. 6. Efecto del extracto acuoso crudo T1 sobre la actividad antioxidante

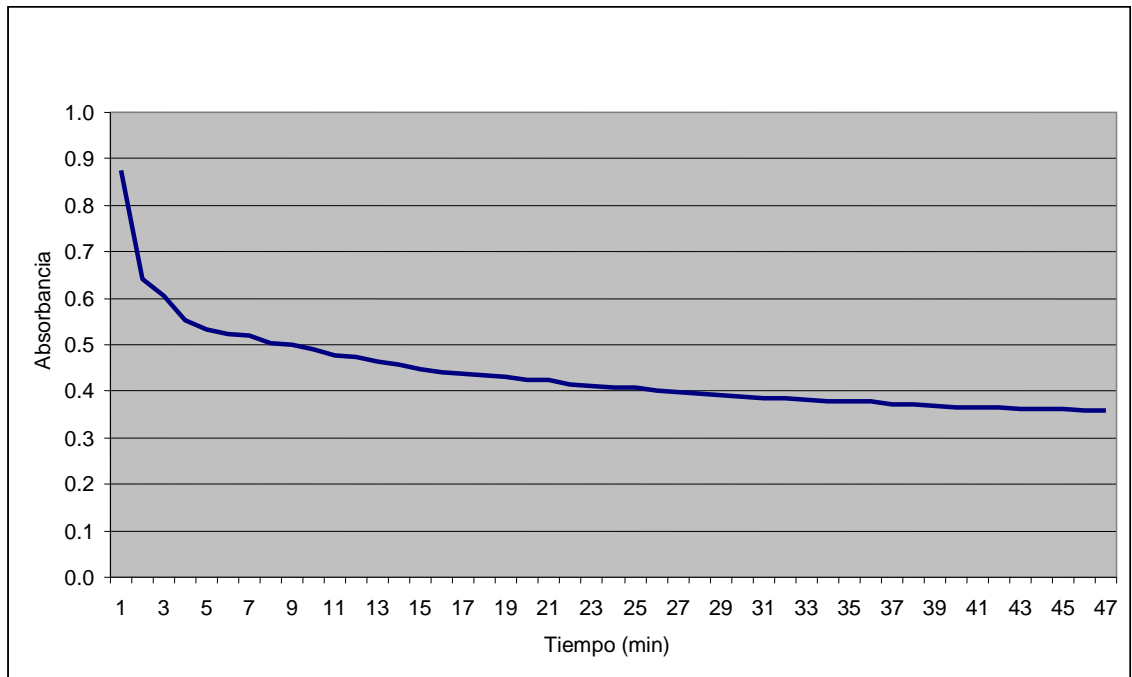


Fig. 7. Efecto del extracto acuoso crudo T2 sobre la actividad antioxidante

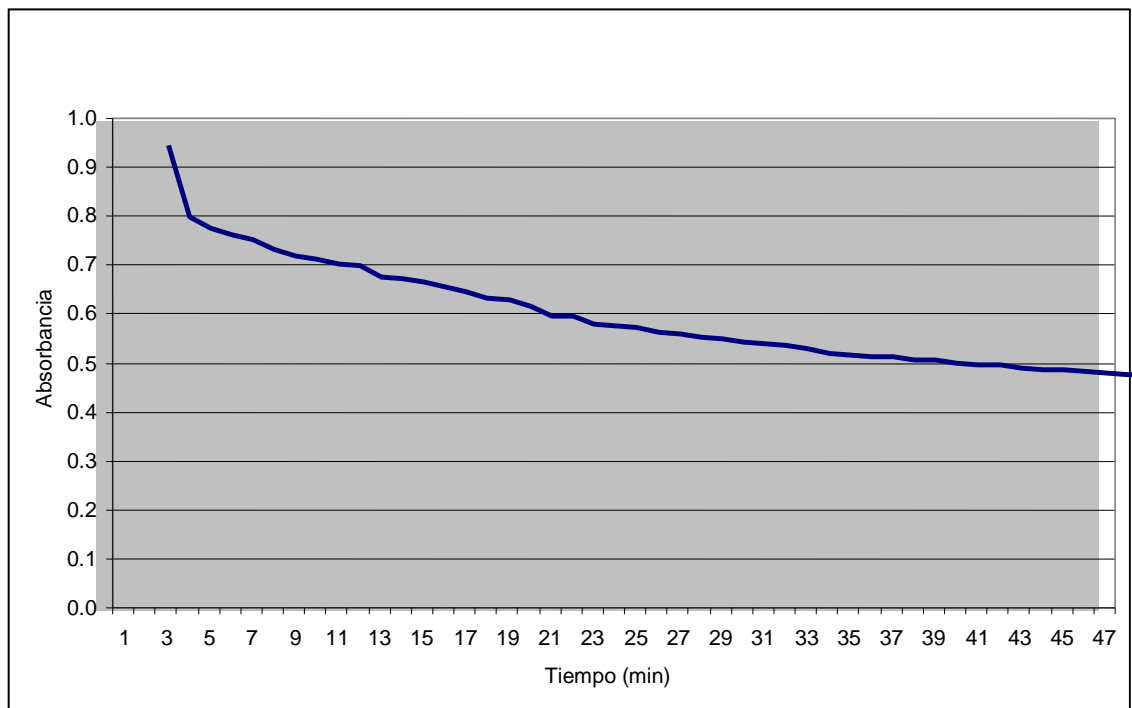


Fig. 8. Efecto del extracto acuoso crudo T3 sobre la actividad antioxidante

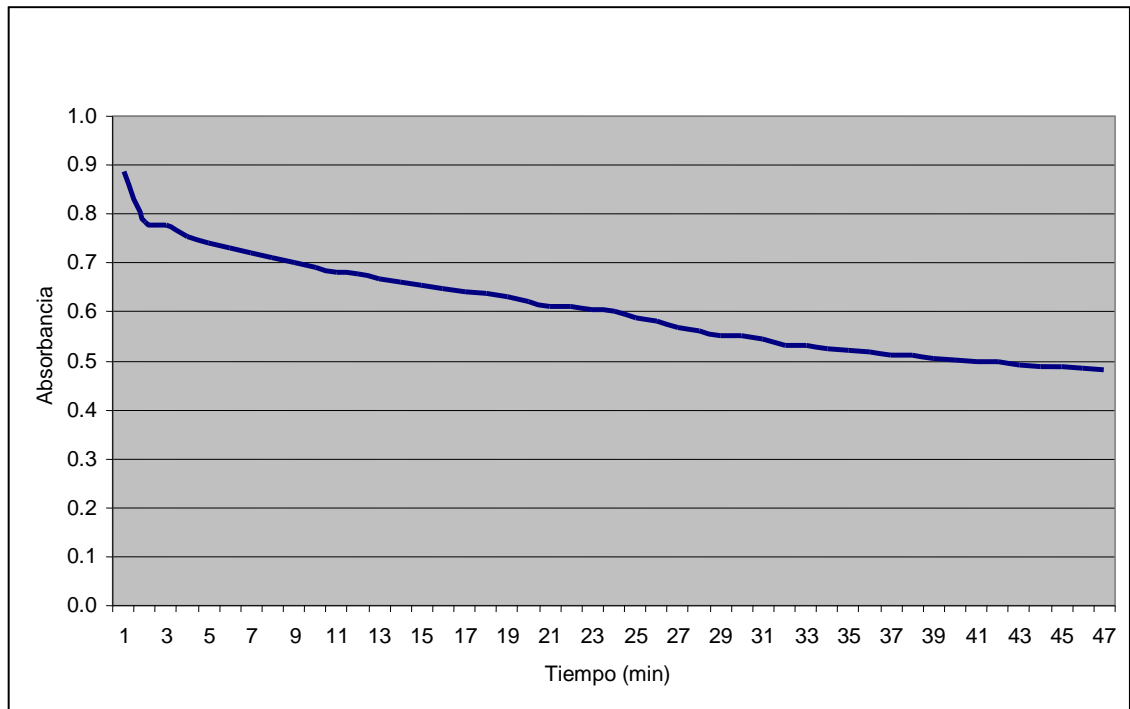


Fig. 9. Efecto del extracto acuoso crudo T4 sobre la actividad antioxidante

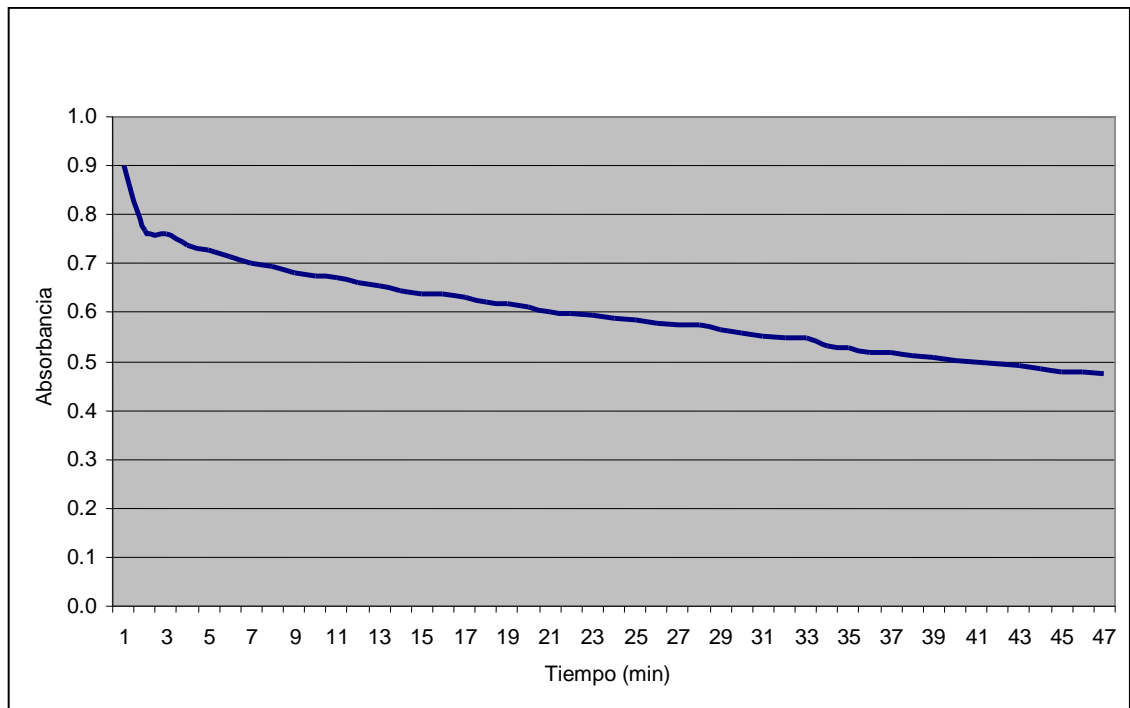


Fig. 10. Efecto del extracto acuoso crudo T1 sobre la actividad antioxidante

En la Fig. 11 se presentan los resultados de la actividad antioxidante de los extractos acuosos de los tratamientos de las semillas tiernas y maduras de ébano. Se observa que la semilla tierna cocida es la que presenta mayor disminución de la absorbancia en el menor tiempo, así como a lo largo del tiempo, comparada con los estándares BHA y n-propil galato.

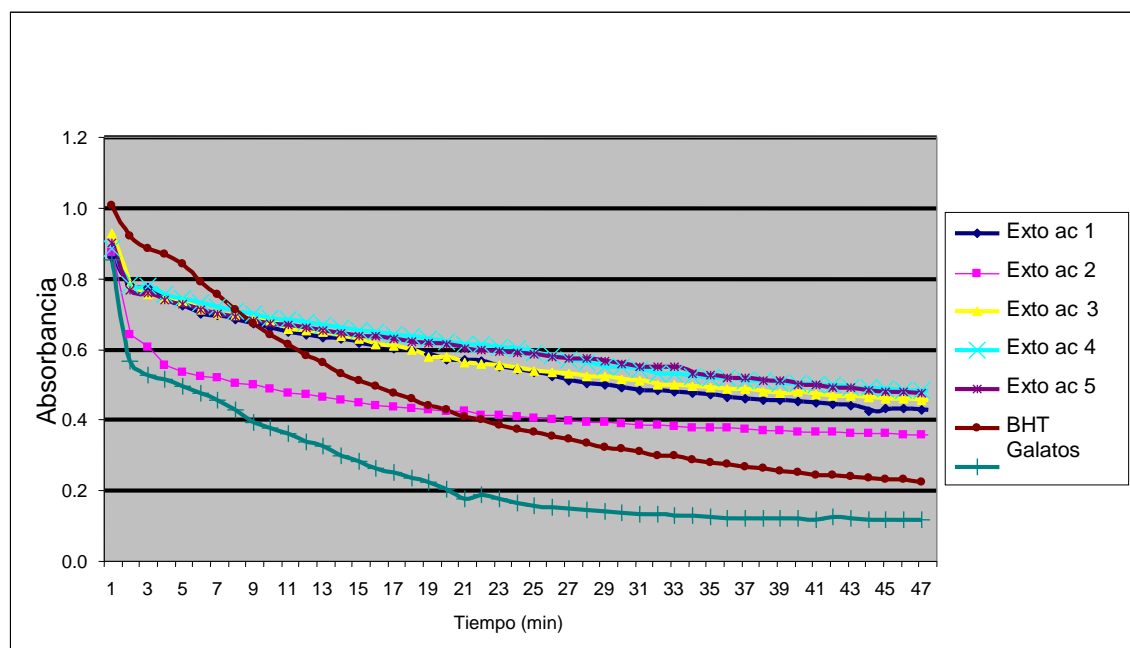


Fig. 11. Efecto del extracto acuoso crudo de T1 a T5 sobre la actividad antioxidante

6.2.2 Extractos metanólicos

En tabla 7 se presentan los resultados de la absorbancia de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos crudos de las semillas de *Ebenopsis ebano* a las cuales se les aplicaron los tratamientos antes mencionados. La semilla tierna cocida (T2) a los 30 min es la que presenta mayor reducción de la absorbancia, lo que significa que los compuestos presentes en el extracto tienen mayor actividad antioxidante frente al DPPH, seguida de la semilla tierna cruda (T1). De acuerdo a los resultados la semilla madura en sus diferentes tratamientos (T3, T4 y T5) presentan menor actividad antioxidante que la semilla tierna, sin embargo

estadísticamente todos los tratamientos son diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p < 0.05$), excepto la semilla madura cruda (T3) y la madura tostada comercial (T5) son iguales estadísticamente ($p < 0.05$), así como la semilla tierna cruda (T1) y la madura tostada comercial (T5) ($p < 0.05$). Al comparar los tratamientos de los extractos metanólicos con los estándares utilizados se observa que los extractos metanólicos presentan mayor actividad que el BHT ya que se utilizó alrededor de la mitad de muestra de los distintos tratamientos, aunque en el caso del n-propil galato su actividad es mayor comparada tanto con el BHT como con los extractos ya que se requirió solo de 3 μL para presentar una reducción de la absorbancia de aproximadamente del 85% a los 30 minutos.

Considerando los tiempo de reducción hasta el 50%, el T2 es el que requiere de menor tiempo, siendo este equivalente al estándar de BHA y tres veces menos que los otros tratamientos (T1, T3, T4 Y T5); sin embargo, el tiempo es mayor que para el estandar n-propil galato para el que se requiere la mitad del tiempo con relación al T2.

Tabla 7. Actividad Antioxidante de la semilla de <i>Ebenopsis ebano</i> frente a DPPH					
Extractos Crudos Metanólicos					
Tratamiento	Muestra (μL)	Absorban- cia inicial	Absorban- cia a 30 min	50% de Absorban- cia/t	% Inhibición a 30 min
Tierna cruda	200	0.943	0.593	0.512/46	37.11 ^f
Tierna cocida	200	1.059	0.278	0.527/12	72.89 ^a
Madura cruda	200	0.924	0.588	0.492/46	36.36 ^e
Madura tostada	200	0.951	0.542	0.480/40	43.42 ^d
Madura tostada comercial	200	0.942	0.590	0.522/46	37.37 ^f
BHA	1000	1.009	0.310	0.498/15	69.28 ^c
n-propil galato	3	0.854	0.133	0.429/7	84.42 ^b

En las Fig. 12 a 16 se presenta la disminución de la absorbancia con el paso del tiempo medida hasta los 46 minutos de las semillas tiernas y maduras en sus diferentes tratamientos de los extractos metanólicos. En dichas figuras se puede observar el comportamiento a los 30 y 46 minutos.

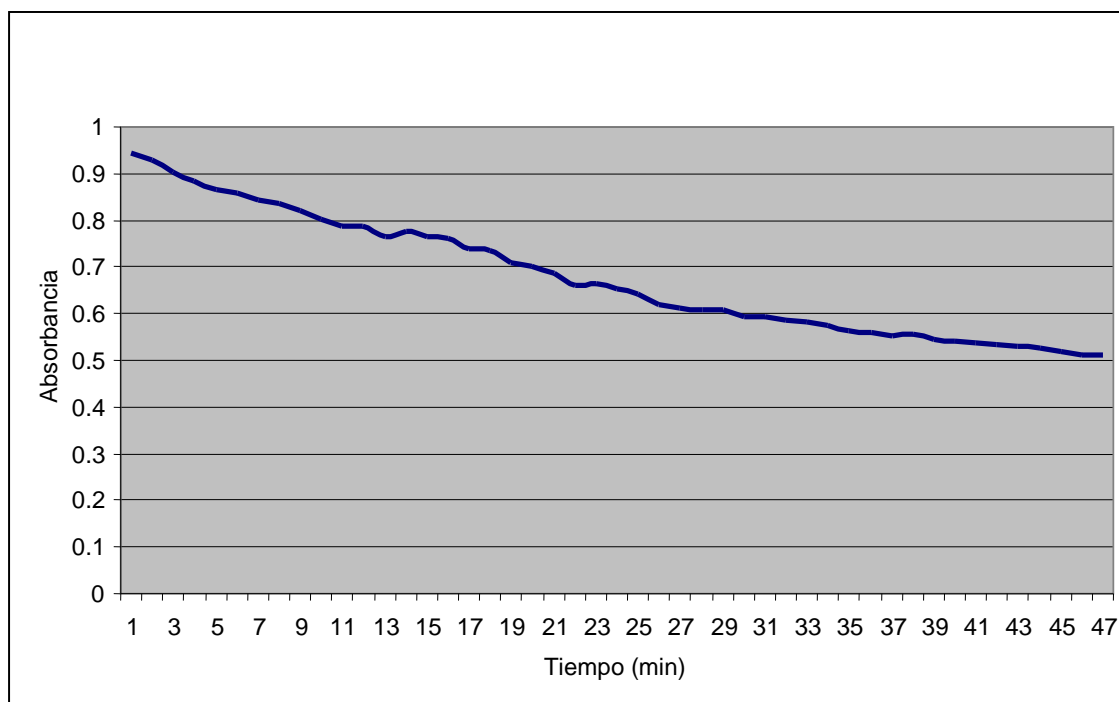


Fig. 12. Efecto del extracto metanólico crudo T1 sobre la actividad antioxidante

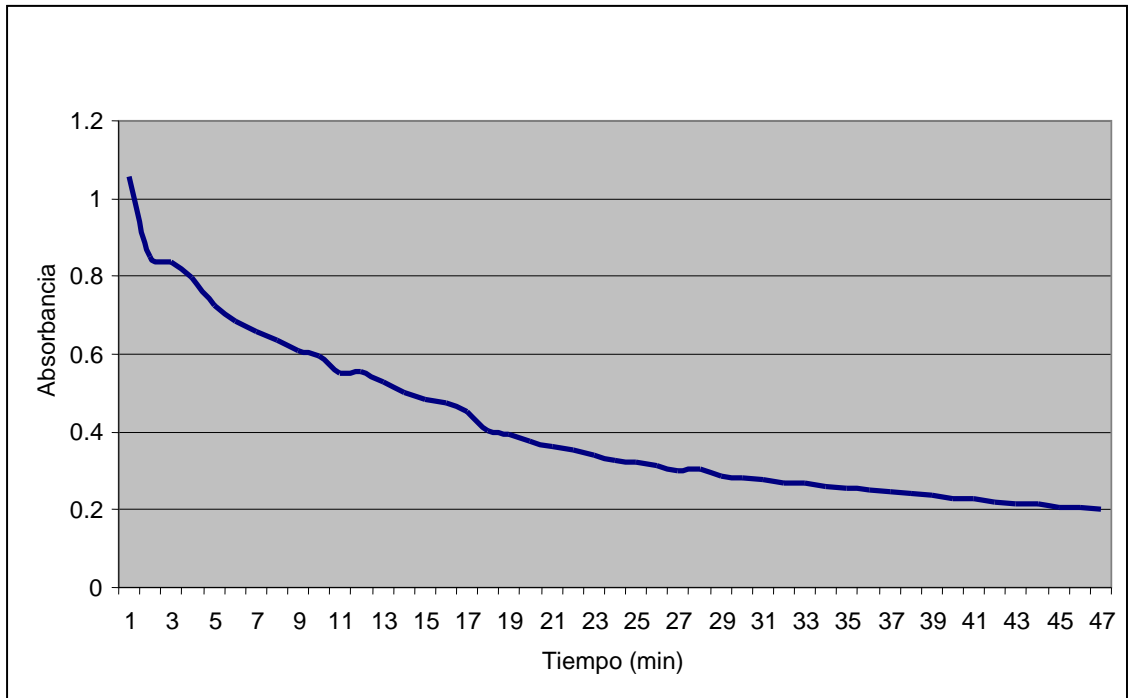


Fig. 13. Efecto del extracto metanólico crudo T2 sobre la actividad antioxidante

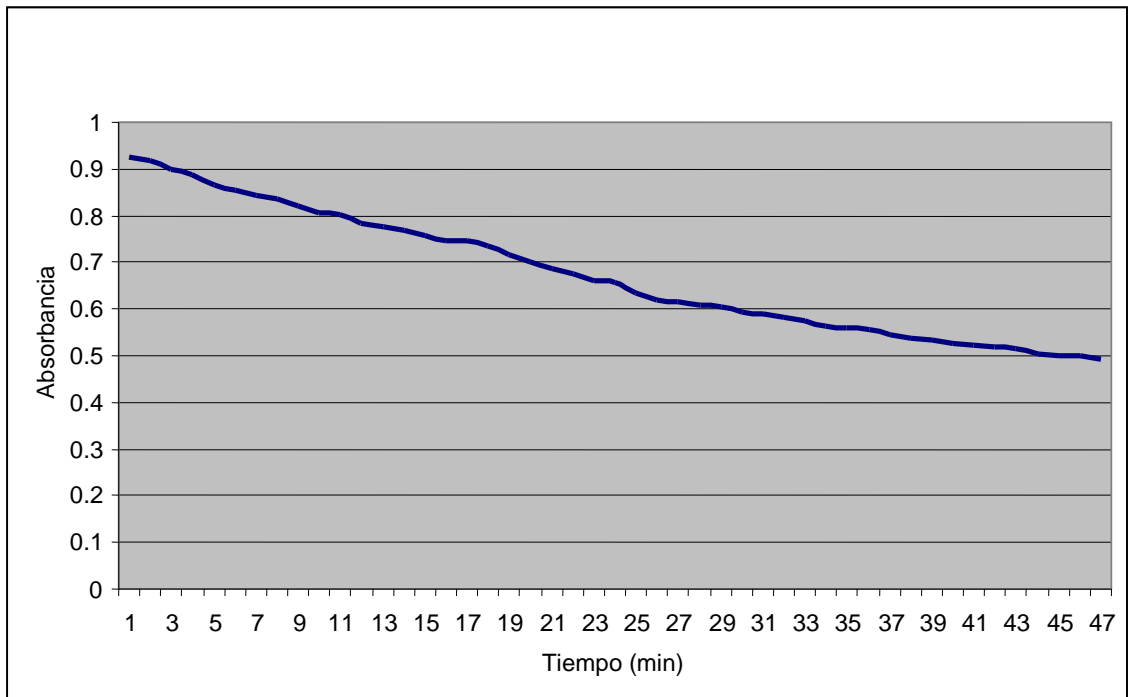


Fig. 14. Efecto del extracto metanólico crudo T3 sobre la actividad antioxidante

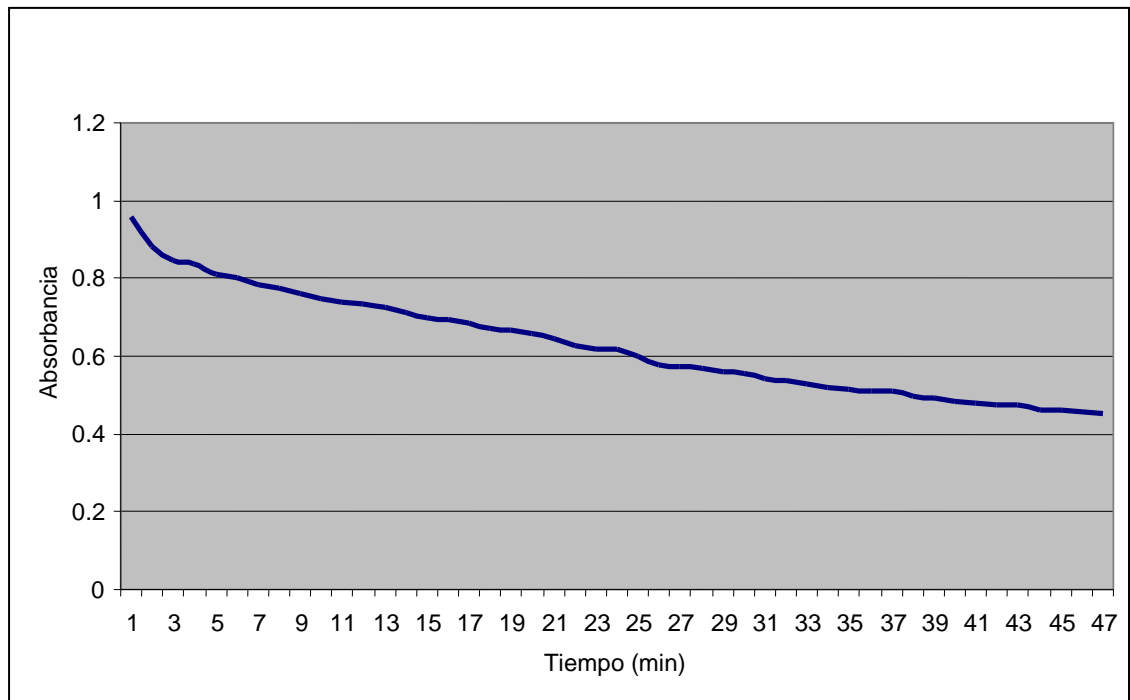


Fig. 15. Efecto del extracto metanólico crudo T4 sobre la actividad antioxidante

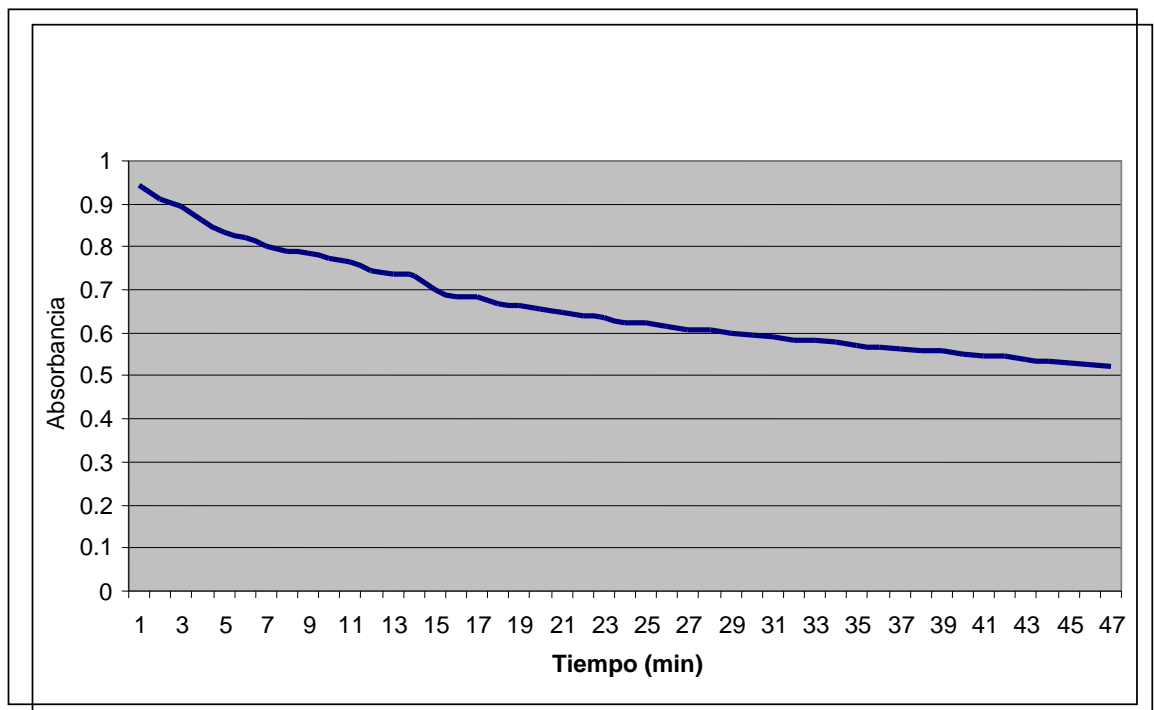


Fig. 16. Efecto del extracto metanólico crudo T5 sobre la actividad antioxidante

En la Fig. 17 se observa la comparación de las absorbancias de los extractos metanólicos de las semillas tiernas y maduras comparadas con los estándares utilizados: BHA y n-propil galato.

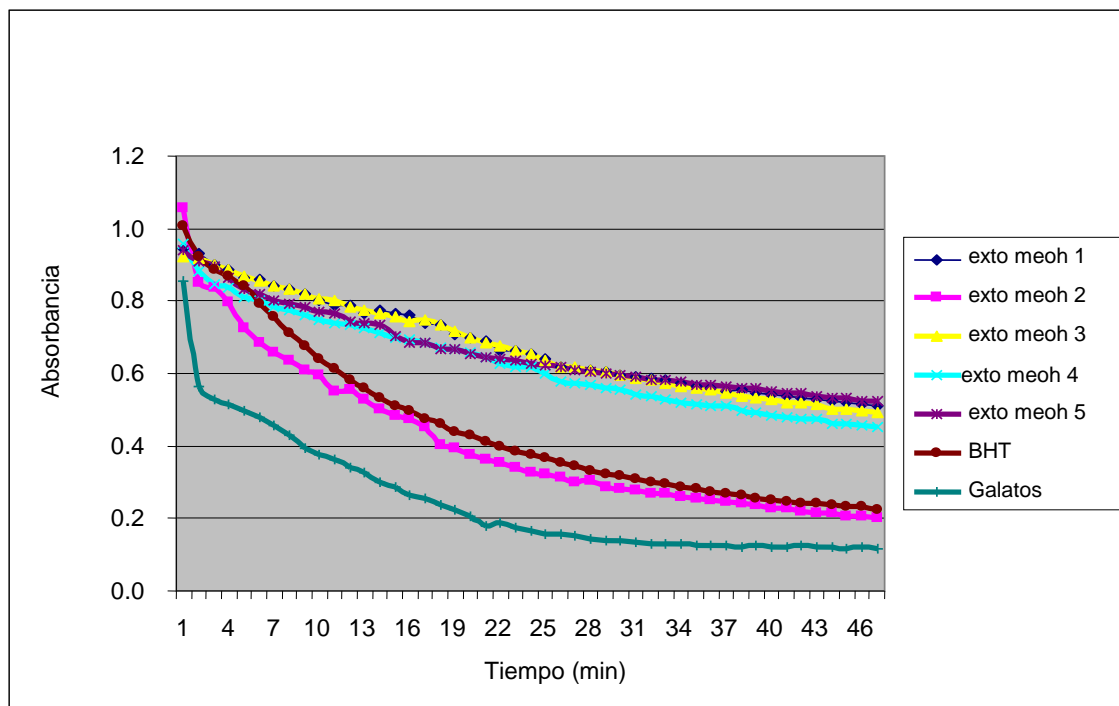


Fig. 17. Efecto del extracto metanólico crudo de T1 a T5 sobre la actividad antioxidante

6.3 Actividad antimicrobiana

6.3.1 Efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Se determinó el efecto directo de los extractos acuosos y metanólicos sobre el crecimiento en cultivo de *Escherichia coli*, con la metodología descrita anteriormente (capítulo 5.7.2)

El extracto acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a concentraciones de 250 y 500µg/mL con un índice de citotoxicidad de 7.6 y 19.1%, respectivamente ($p<0.05$) (Fig. 18).

Por otro lado, el extracto metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 250 y 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índices de inhibición de 12.2 y 22.9% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 18).

El extracto acuoso de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a concentraciones de 250 y 500µg/mL con un índice de crecimiento de 8.0 y 18.2%, respectivamente ($p<0.05$) (Fig. 19).

Así mismo, el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* a la concentración de 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 17.9% ($p<0.05$). (Fig. 19).

El extracto acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a concentraciones de 250 y 500µg/mL con un índice de crecimiento de 13.2 y 27.1%, respectivamente ($p<0.05$) (Fig. 20).

Por otro lado, el extracto metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 250 y 500µg/mL mostraron inhibición del crecimiento de la bacteria con índices de inhibición de 13.4 y 28.8% ($p<0.01$), respectivamente. (Fig. 20)

El extracto acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria, sin embargo, no se observa significancia estadística. (Fig. 21)

Se observó también que el extracto metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 250 y 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 13.9 y 27.7% ($p<0.01$), respectivamente. (Fig. 21)

El extracto acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a

concentraciones de 125, 250 y 500 μ g/ml con un índice de inhibición de 9.5, 16.8% ($p<0.05$) y 32.1% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 22).

Los resultados presentados en la Tabla 9 y figura 22 indican que el extracto metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 125, 250 y 500 μ g/mL mostraron inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 10.5, 16.6 y 29.9% ($p<0.01$), respectivamente.

Como control positivo se utilizó el antibiótico tetraciclina a una concentración de 3 μ g/mL, para el cual no se observó crecimiento de *E. coli* en la prueba.

Para el vehículo metanólico (solvente utilizado para preparar el extracto crudo de este solvente), no se observa significancia estadística con respecto a la inhibición del crecimiento de *E. coli* por el efecto del mismo (Fig. 23).

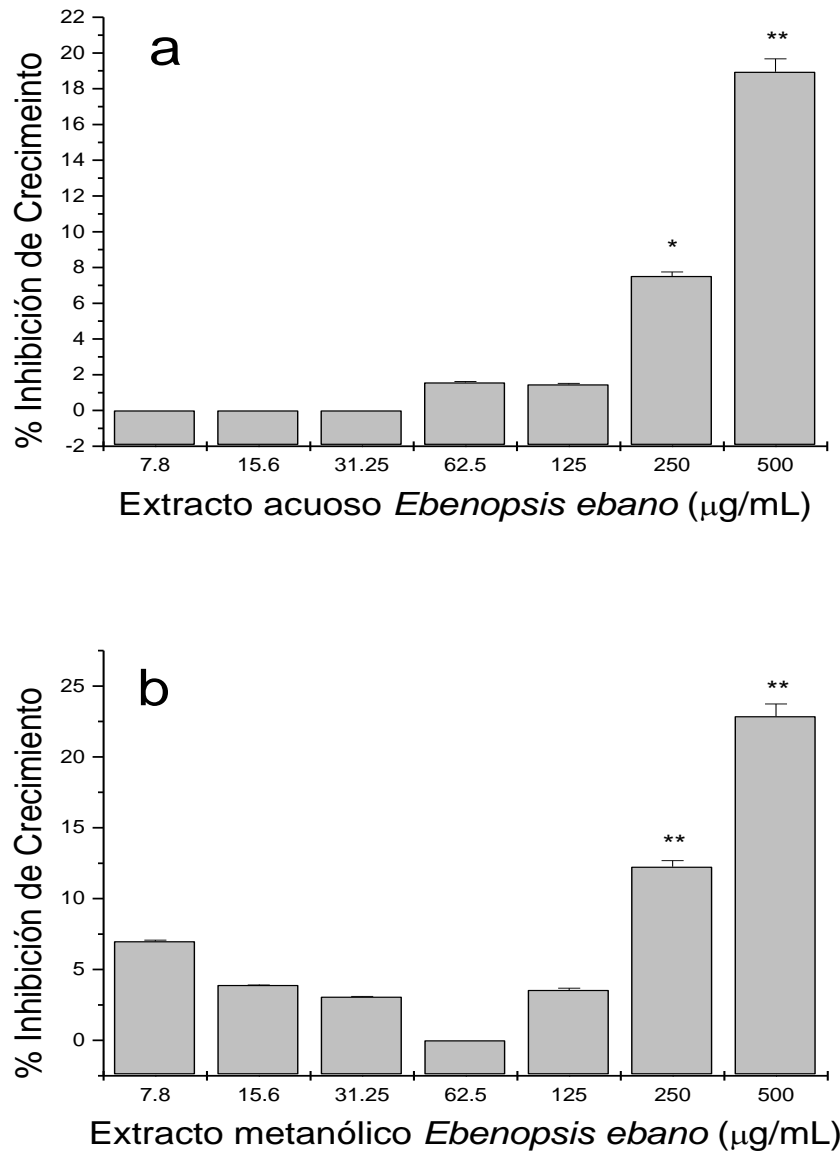


Fig. 18. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5 mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

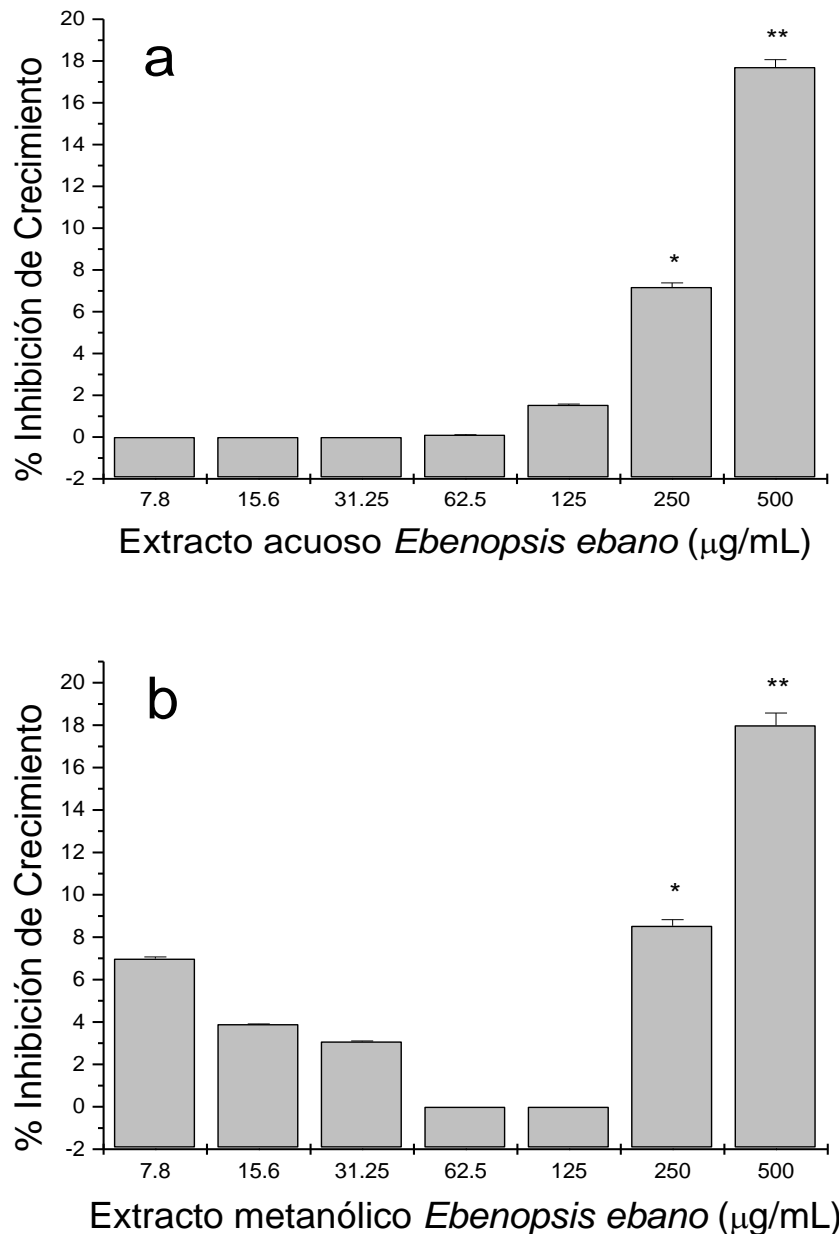


Fig. 19. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

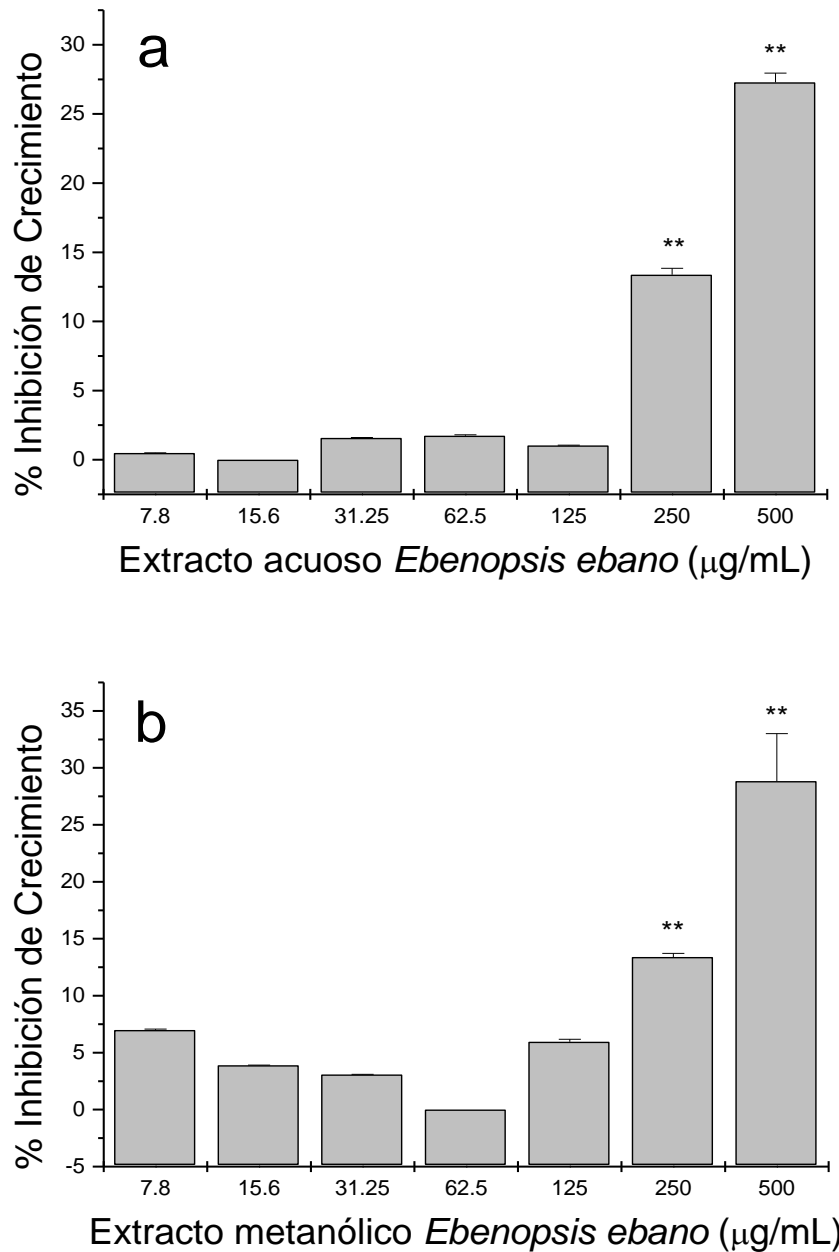


Fig. 20. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

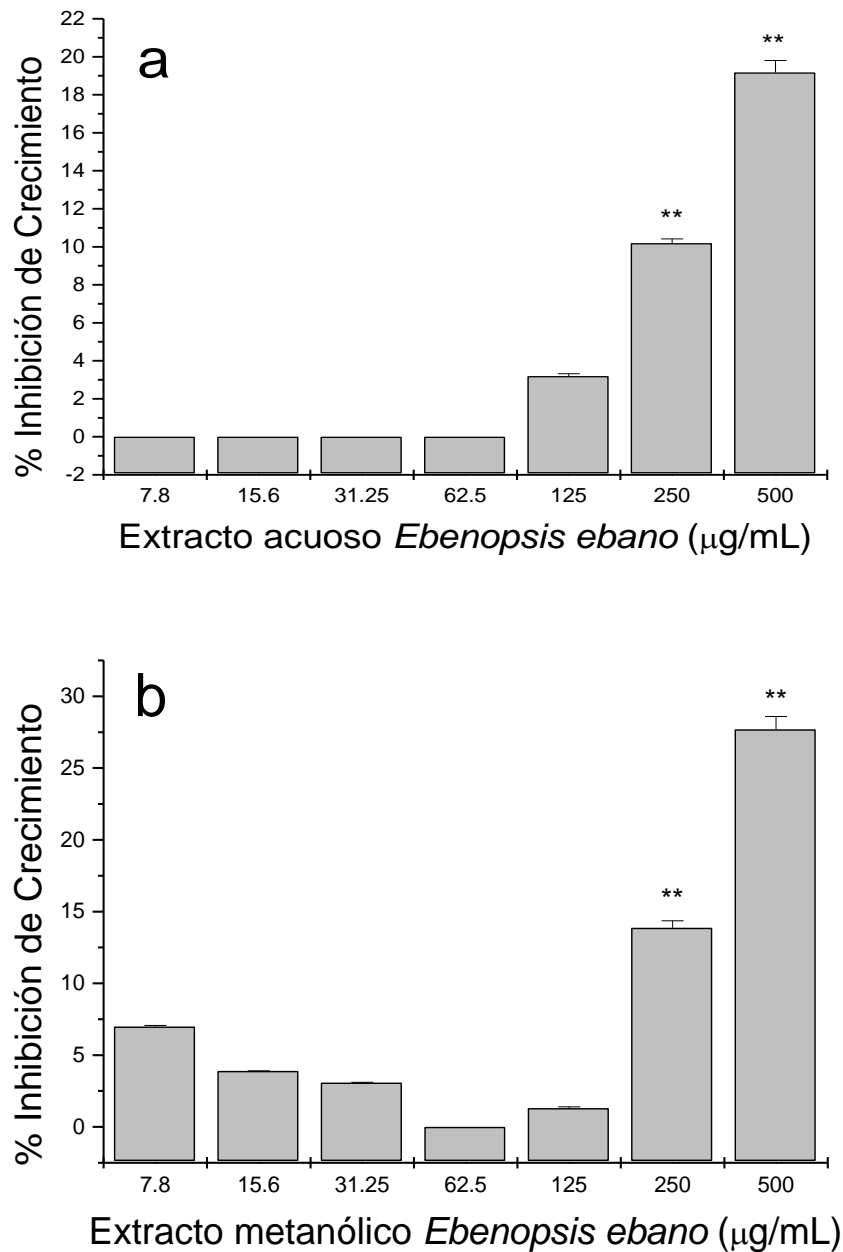


Fig. 21. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

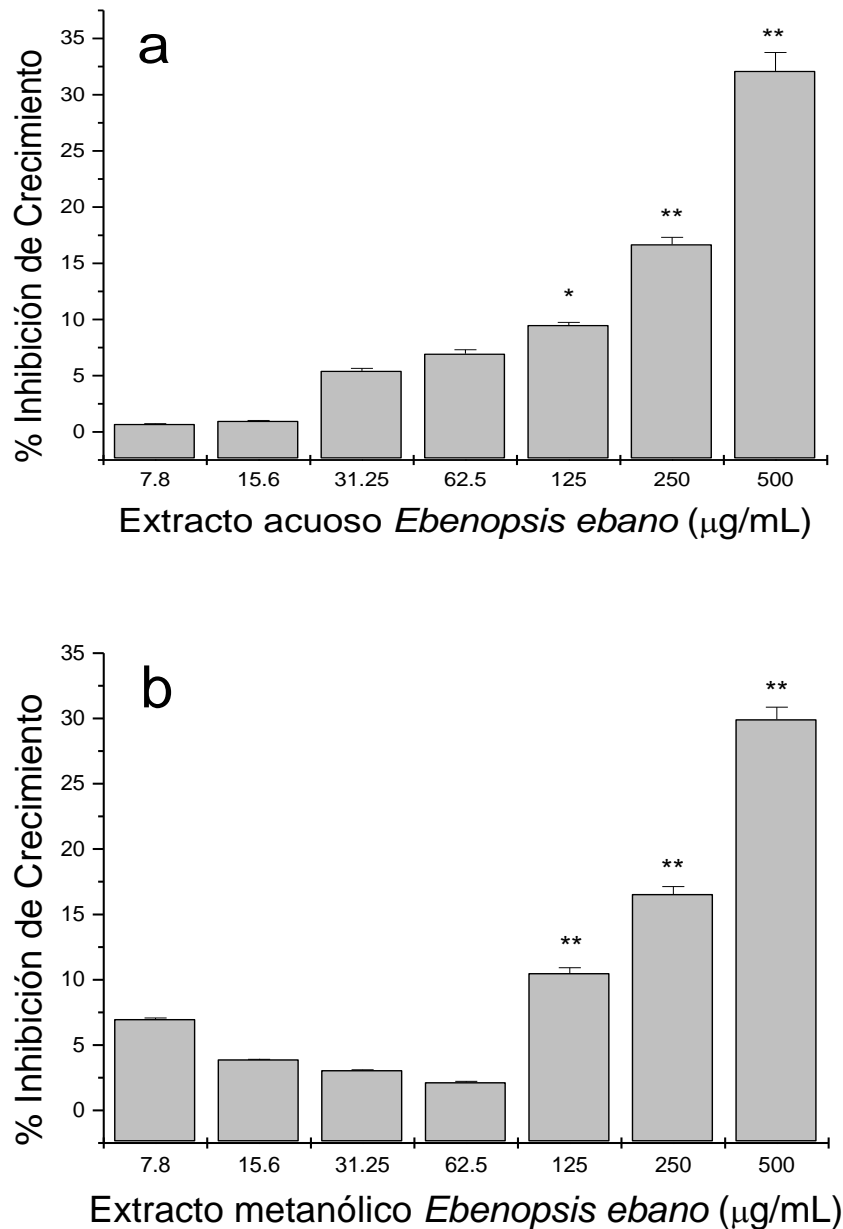


Fig. 22. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

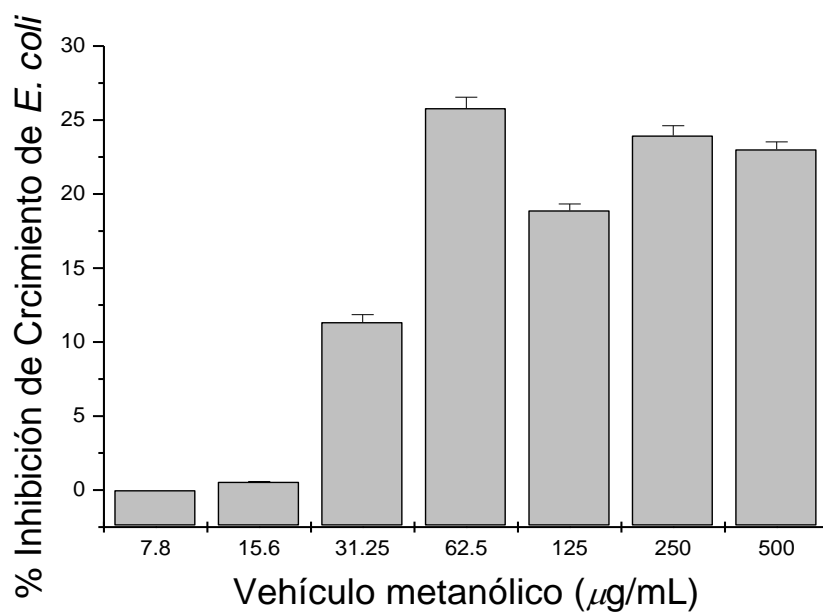


Fig. 23. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de *E. coli*

6.3.2 Efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Salmonella*.

Se determinó el efecto directo de los extractos acuosos y metanólicos sobre la inhibición en cultivo de *Salmonella*, con la metodología descrita anteriormente. (Capítulo 5.7.2)

El extracto acuoso de la semilla tierna cruda (T1) contra *Salmonella* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a concentraciones de 250 y 500µg/mL con un índice de inhibición de 4.2 y 12.9%, respectivamente ($p<0.05$). (Fig. 24)

Por otro lado el extracto metanólico de la semilla tierna cruda (T1) contra *Salmonella* a la concentración de 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 17.5% ($p<0.01$). (Fig. 24).

El extracto acuoso de la semilla tierna cocida (T2) contra *Salmonella* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria a concentraciones de 250 y 500µg/mL con un índice de crecimiento de 9.7% ($p<0.01$) y 18.6% ($p<0.05$), respectivamente (Fig. 25).

Así mismo, el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T2) contra *Salmonella* a la concentración de 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 11.6% ($p<0.01$) (Fig. 25).

El extracto acuoso de la semilla madura cruda (T3) contra *Salmonella* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria, sin embargo, no se observa significancia estadística a ninguna concentración (Fig. 26).

Se observó también que el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T3) contra *Salmonella* a la concentración de 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 18.8% ($p<0.01$) (Fig. 26).

El extracto acuoso de la semilla madura tostada (T4) contra *Salmonella* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria, sin embargo, no se observa significancia estadística a ninguna concentración (Fig. 27).

Por otro lado el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T4) contra *Salmonella* a las concentraciones de 250 y 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índices de inhibición de 3.6% ($p<0.05$) y 19.8% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 27).

El extracto acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) contra *Salmonella* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria sin embargo, no se observa significancia estadística a ninguna concentración (Fig. 28).

Así mismo, el extracto metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) contra *Salmonella* a la concentración de 500µg/mL mostró inhibición del crecimiento de la bacteria con un índice de inhibición de 17.5% ($p<0.01$) (Fig. 28).

Como se mencionó anteriormente, la tetraciclina fue utilizada como control positivo a una concentración de 3µg/ml, para el cual no se observa crecimiento de *Salmonella*.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de la bacteria (Fig. 29).

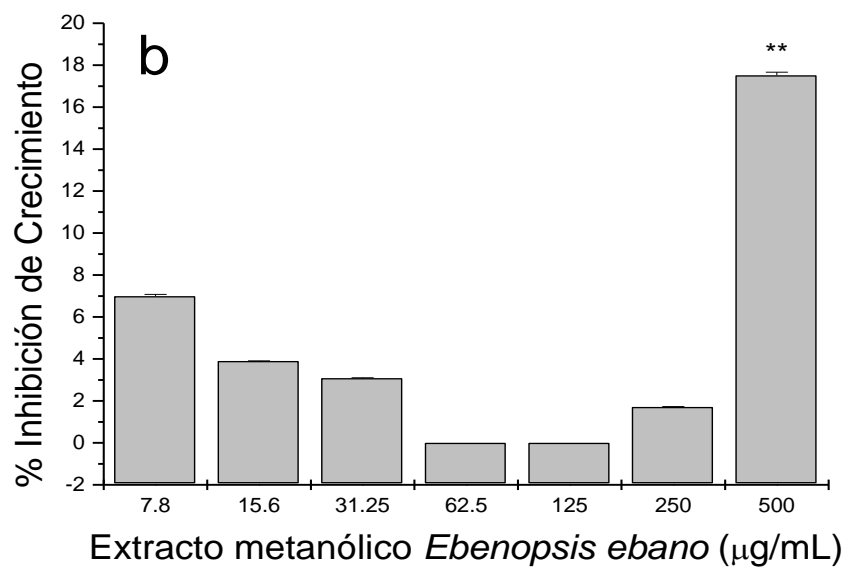
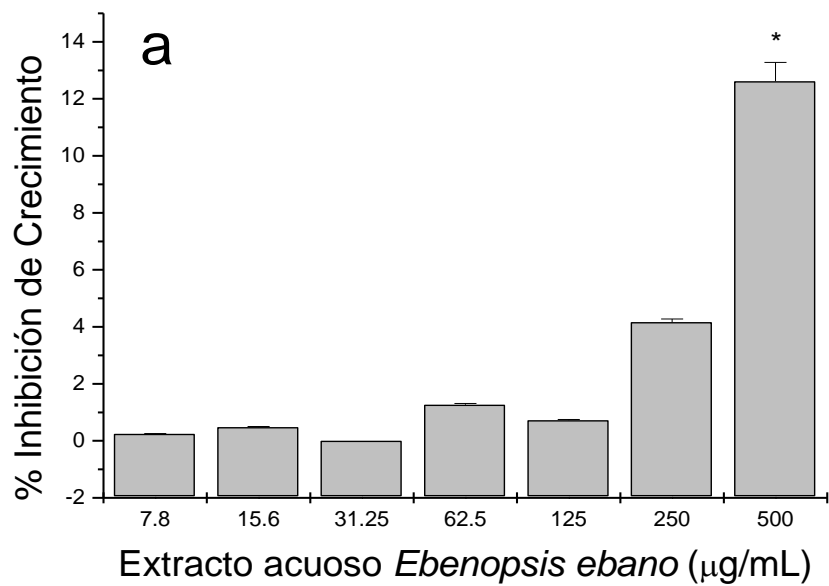


Fig. 24. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de *Salmonella*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

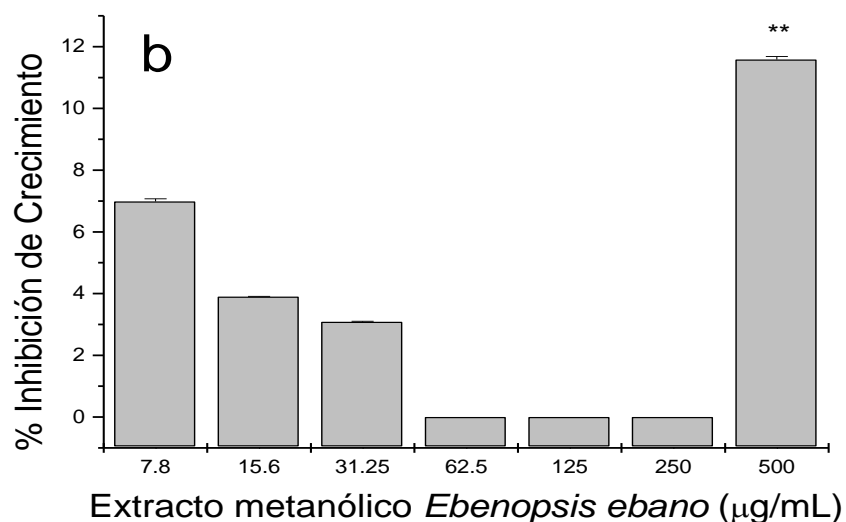
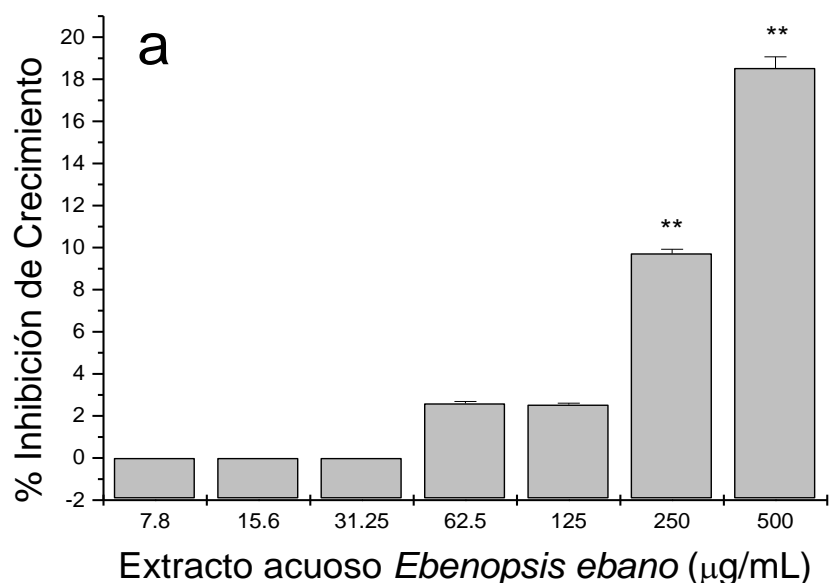


Fig. 25. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de *Salmonella*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

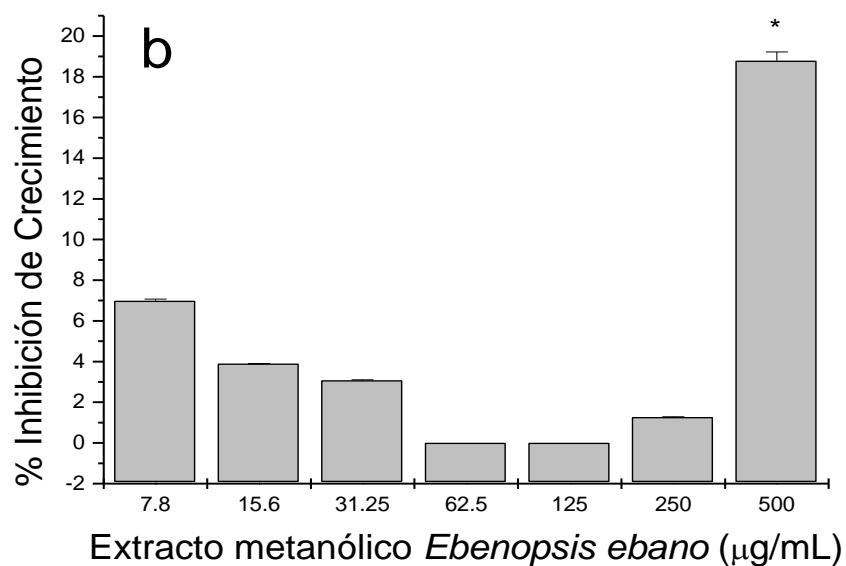
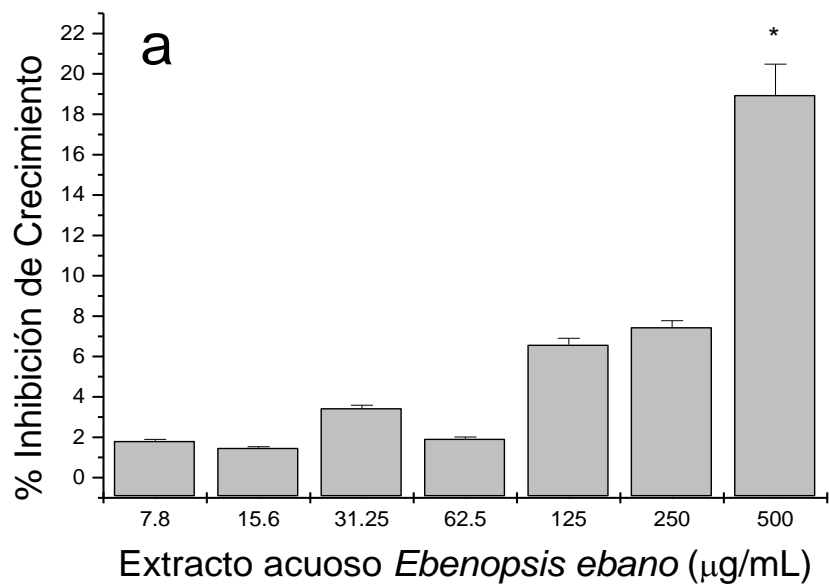


Fig. 26. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de *Salmonella*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

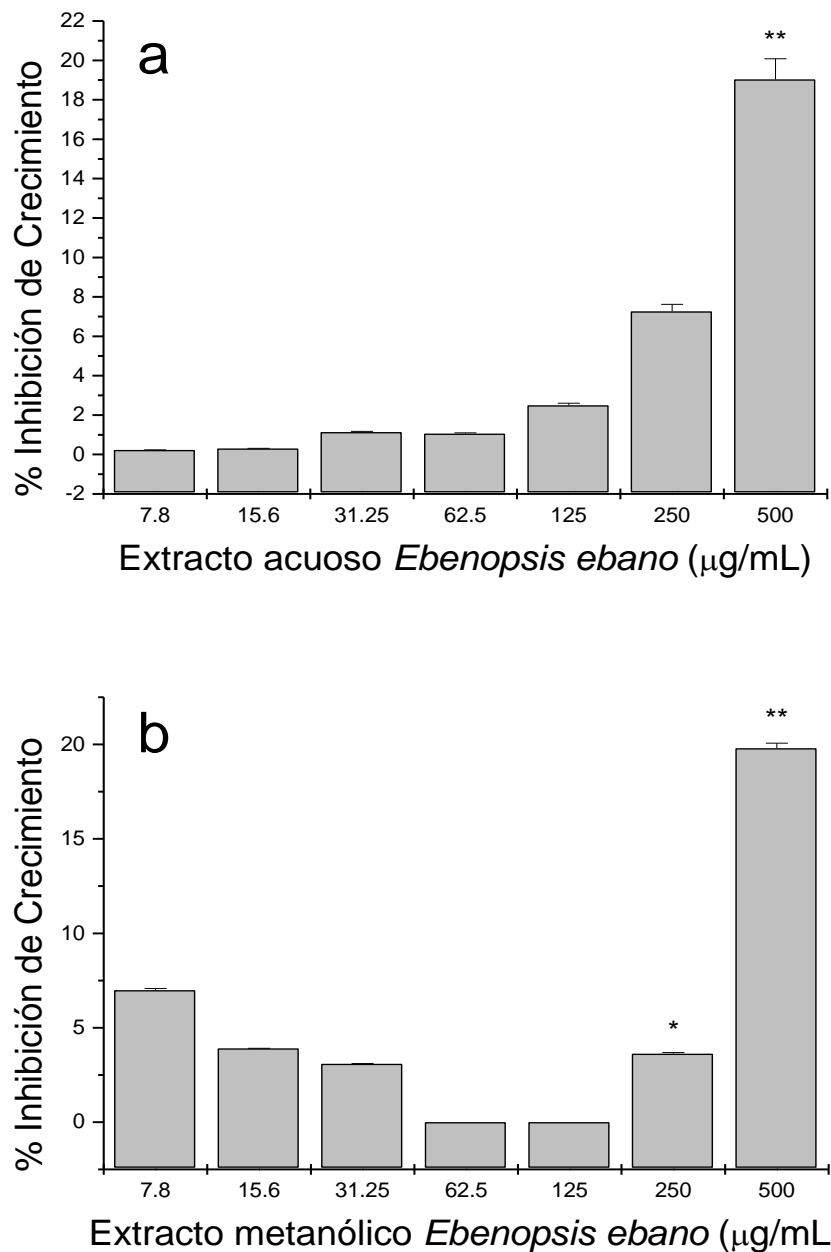


Fig. 27. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de *Salmonella*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

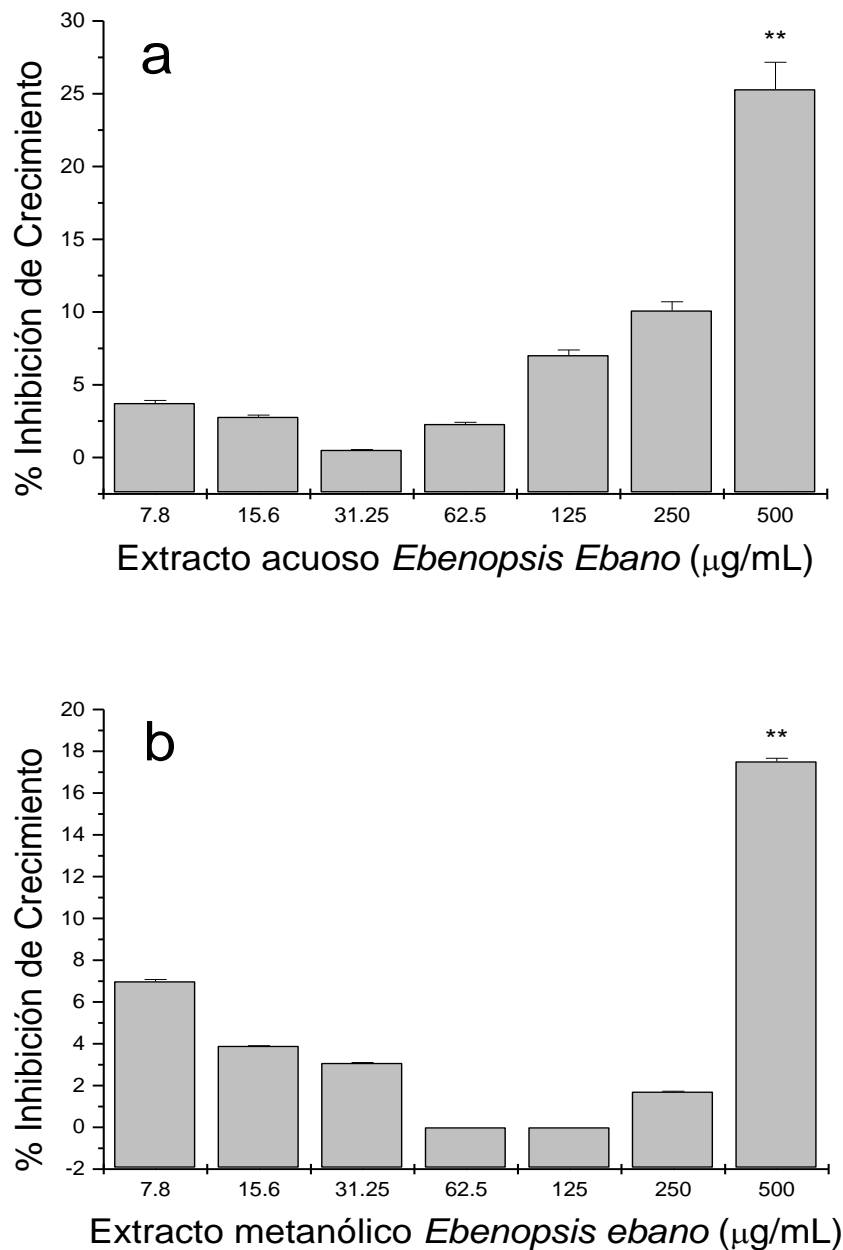


Fig. 28. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de *Salmonella*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo ICC. Posteriormente se añadieron 50µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

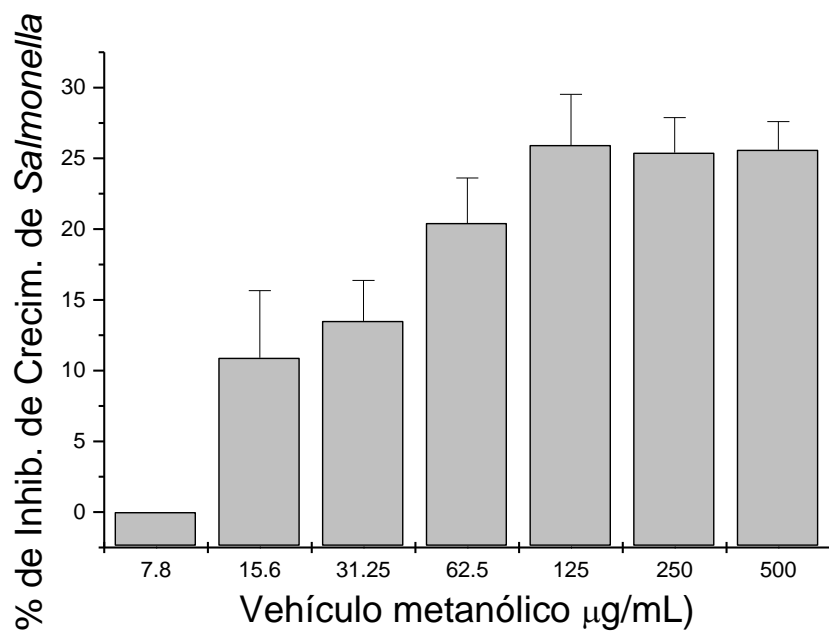


Fig. 29. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de *Salmonella*.

6.3.3 Efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

Se determinó el efecto directo de los extractos acuosos y metanólicos sobre el crecimiento en cultivo de *Candida albicans*, con la metodología descrita anteriormente. (Capítulo 5.7.3)

El extracto acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* no presentó efecto de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Fig. 30).

Por otro lado el extracto metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con un índice de inhibición de 48.7, 84.4 y 84.4%, respectivamente ($p < 0.01$) (Fig. 30).

El extracto acuoso de la semilla tierna cruda (T2) de *Ebenopsis ebano* no presentó efecto de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Fig. 31).

Los ensayos realizados indican que el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con un índice de inhibición de 65.1, 83.7 y 81.9%, respectivamente ($p < 0.01$) (Fig. 31).

El extracto acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* no presentó efecto de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* estadísticamente significativo ($p < 0.05$). (Fig. 32).

Por otro lado el extracto metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con un índice de inhibición de 23.9% ($p < 0.05$), 69.2, 85.0 y 83.9% ($p < 0.01$), respectivamente (Fig. 32).

El extracto acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* no presentó efecto de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Fig. 33).

Por otro lado el extracto metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con un índice de inhibición de 53.3, 82.2 y 83.1% ($p < 0.01$), respectivamente (Fig. 33).

El extracto acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* no presentó efecto de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Fig. 34).

El extracto metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* a las concentraciones de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró inhibición del

crecimiento de *Candida albicans* con un índice de inhibición de 52.3, 81.2 y 84.1% ($p < 0.01$), respectivamente (Fig. 34).

En los anexos 1 a 5 se muestran gráficas donde se presenta un comparativo entre el comportamiento de los tres microorganismos probados frente a los diferentes extractos acuosos y metanólicos de *Ebenopsis ebano* (Fig. 60 a 64).

La Anfotericina B fue utilizada como control positivo a una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$, para el cual no se observa crecimiento de *Candida albicans*.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de la levadura (Fig. 35).

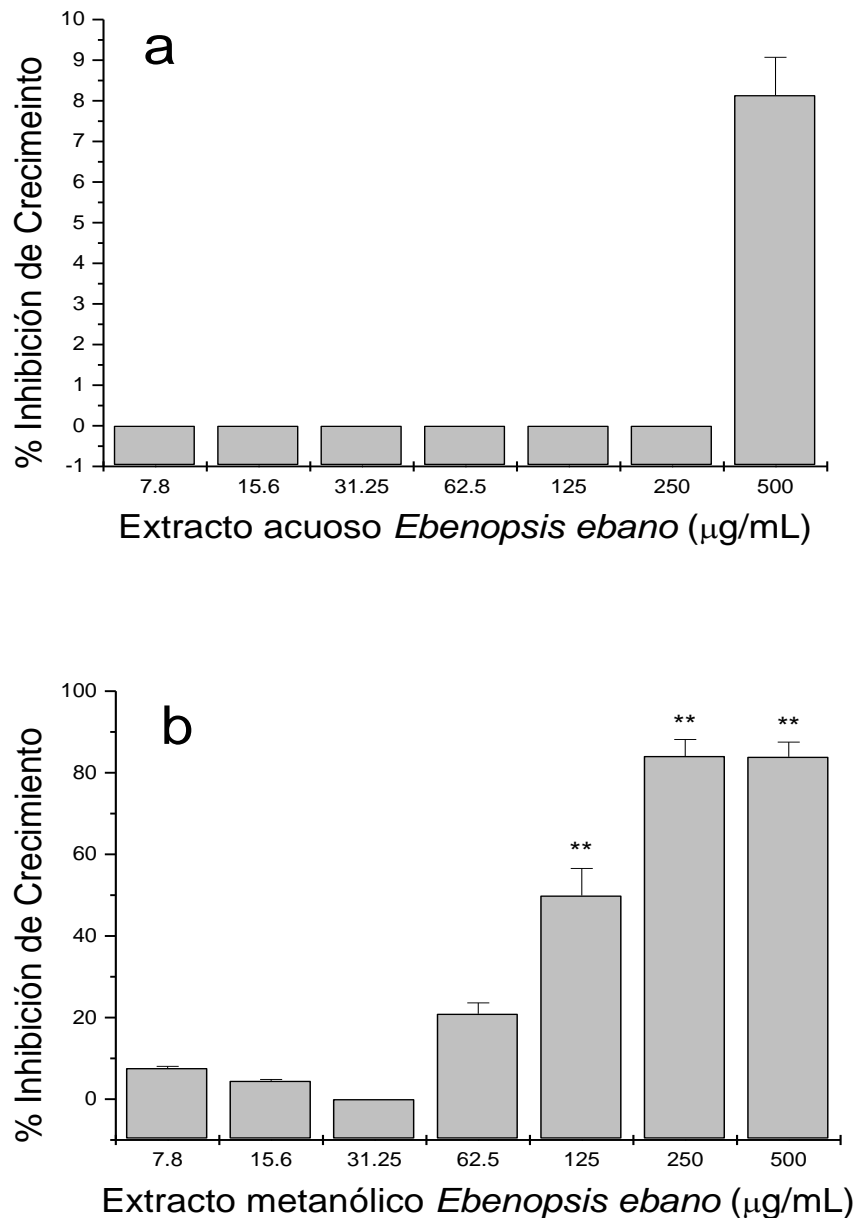


Fig. 30. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo YM. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación del la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

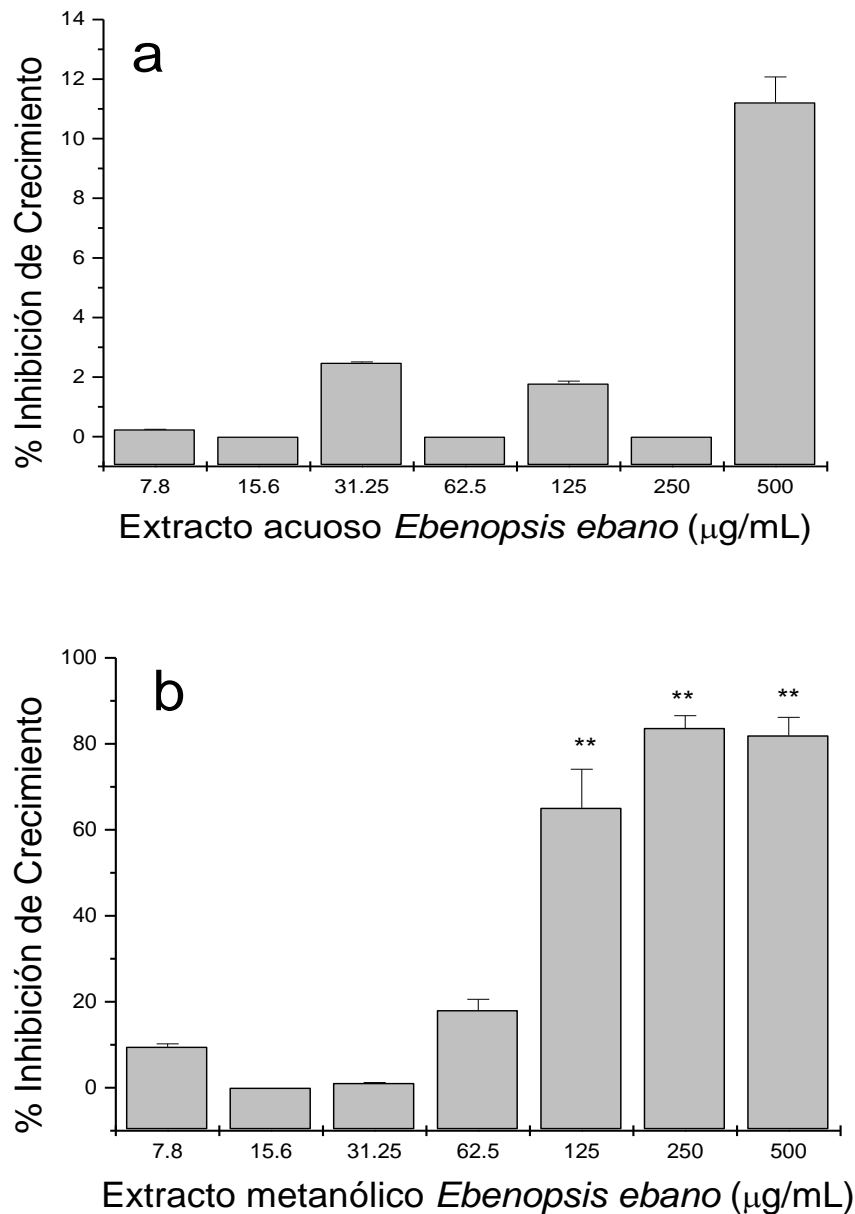


Fig. 31. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo YM. Posteriormente se añadieron 50 μl /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación del la citotoxicidad, se añadieron 10 μl /pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 μl /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

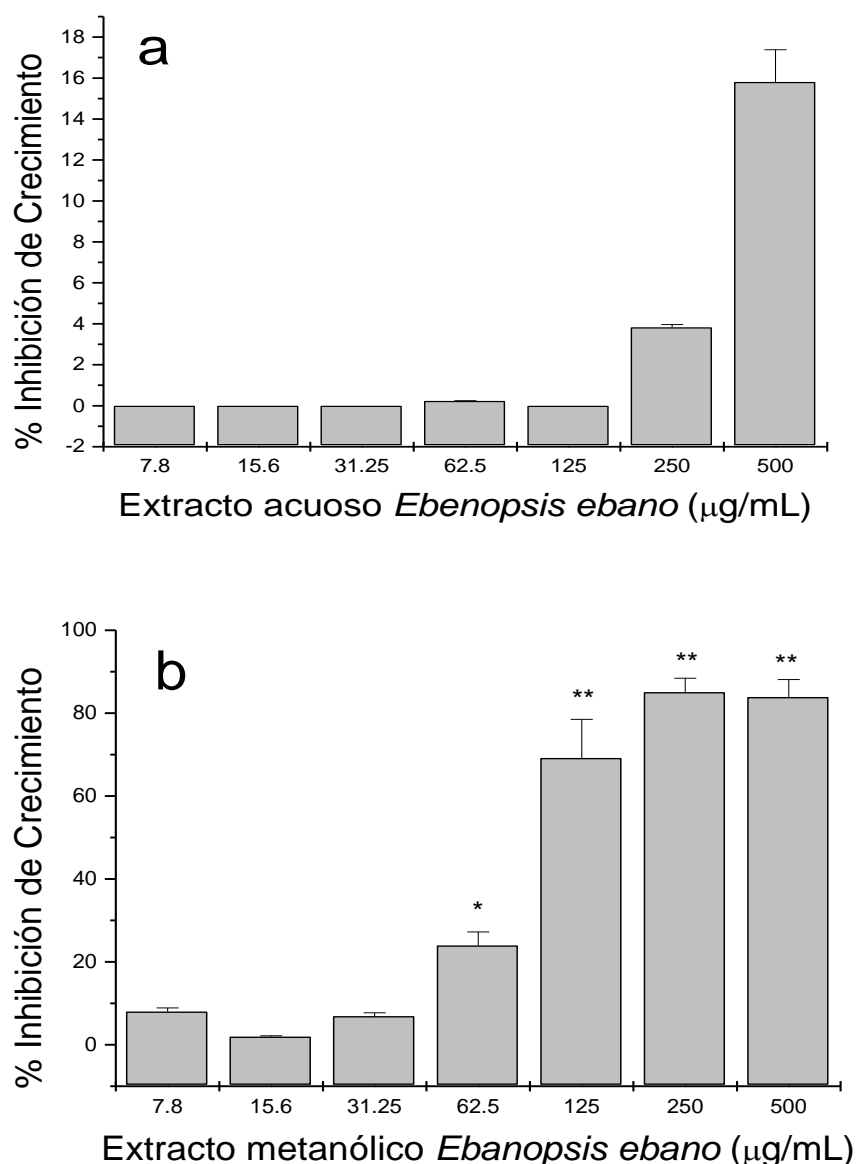


Fig. 32. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans*. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo YM. Posteriormente se añadieron 50µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

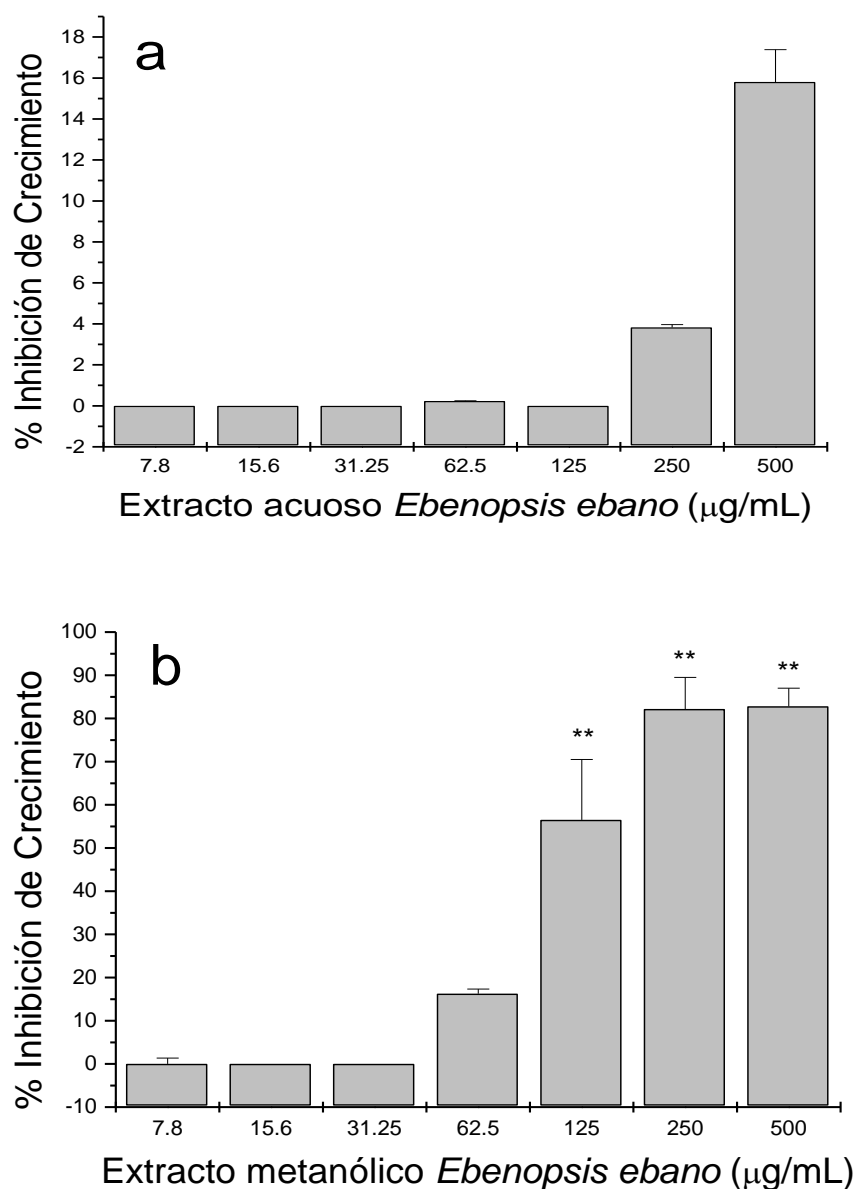


Fig. 33. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo YM. Posteriormente se añadieron 50 µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación del la citotoxicidad, se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

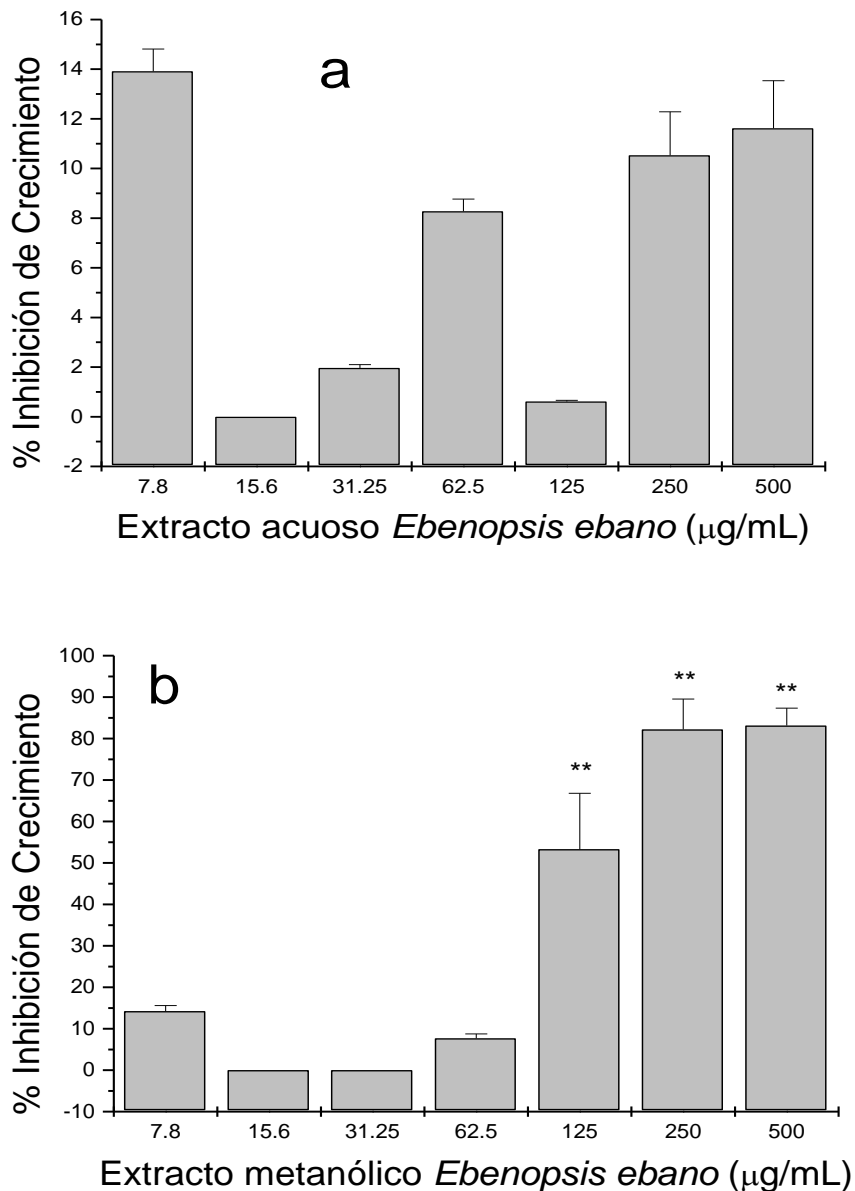


Fig. 34. **Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.** Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^3 células/ml en caldo YM. Posteriormente se añadieron 50µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 y 500µg/ml y se incubaron las placas por 5 h a 37°C. Para la determinación de la citotoxicidad, se añadieron 10µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después, se agregaron 50µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16 h a 37°C. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

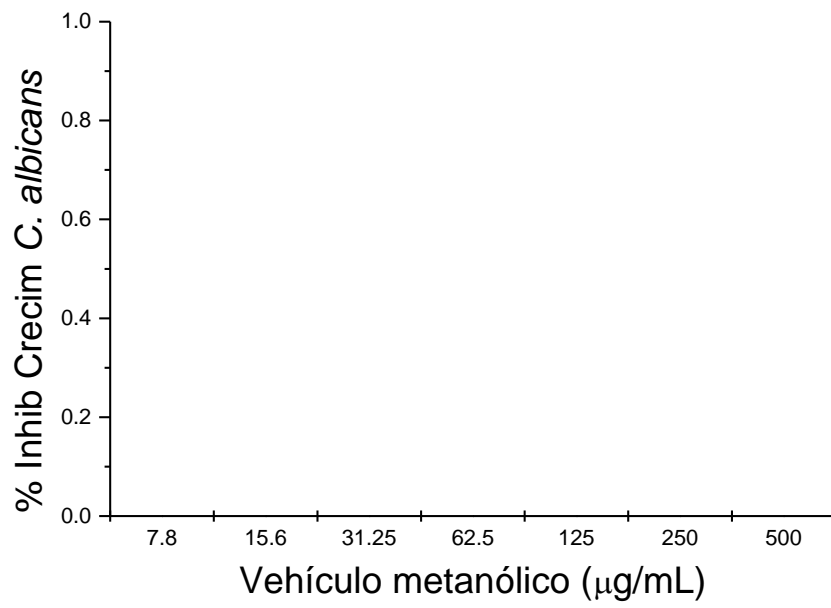


Fig. 35. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de *C. albicans*

6.4 Actividad antitumoral

6.4.1 Efecto de los extractos crudos de *Ebenopsis ebano* sobre la citotoxicidad de la línea celular tumoral L5178Y-R *in vitro*.

Para la evaluación del efecto de los extractos crudos acuosos y metanólicos de la citotoxicidad sobre la Línea Celular Tumoral L5178Y-R se utilizó el diseño experimental descrito anteriormente (Capítulo materiales y métodos), con el cual se obtuvo la respuesta utilizando diferentes concentraciones del extracto.

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestran que las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales fueron de: 125 y 250 μ g/mL con índices de citotoxicidad 14.0 y 14.0% ($p < 0.01$), respectivamente (Fig. 36).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestran que las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre las células tumorales fueron de: 62.5, 125 y 250 μ g/mL, con índices de citotoxicidad de 17.0, 20.0% ($p < 0.05$) y 27.0% ($p < 0.01$), respectivamente (Fig. 36).

La concentración del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales fue de: 250 μ g/mL con índice de citotoxicidad 19.0% ($p < 0.05$) (Fig. 37).

En los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* no se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre las células tumorales (Fig 37).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestran las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales: 31.25, 62.5, 125 y 250µg/ml con índices de citotoxicidad 25.0, 22.0, 21.0 y 29.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 38).

Para el extracto crudo metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* también se observó efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales a las siguientes concentraciones: 7.8, 16.6, 31.25, 62.5, 125 y 250µg/mL, con índices de citotoxicidad de: 11.0% ($p<0.01$), 10.0, 8.0, 9.0, 13.0% ($p<0.05$) y 16.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 38).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestran las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales: 7.8, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 12.0, 22.0% ($p<0.05$), 15.0 y 22.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 39).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestra la concentración a la que se observa efecto significativo de

citotoxicidad de sobre las células tumorales: 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 23.0% ($p<0.05$) (Fig. 39).

Las concentraciones del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre las células tumorales fueron: 7.8, 31.25, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de: 9.0, 14.0% ($p<0.05$), 14.0, 23.0 y 31.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 40).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra la concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre las células tumorales: 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 23.0% ($p<0.05$) (Fig. 40).

Como se mencionó anteriormente, el LPS fue utilizado como control positivo para el cual no se observa crecimiento de las células tumorales.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de las células (Fig. 41).

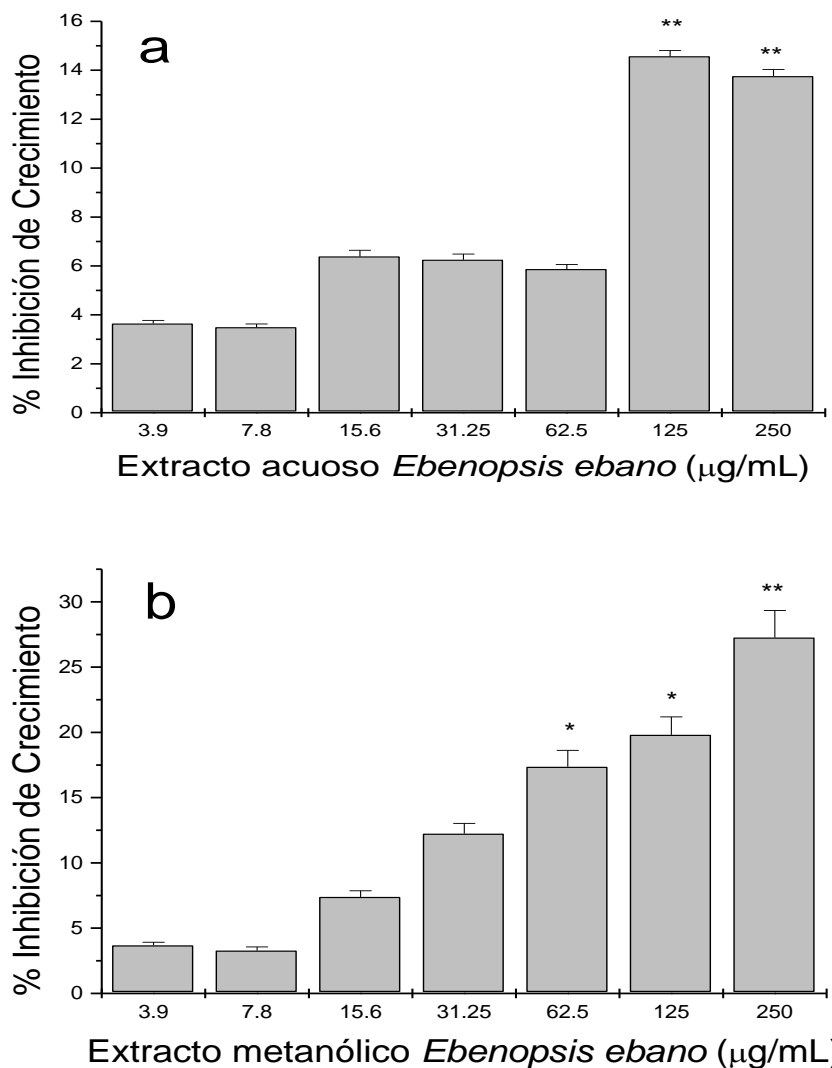


Fig. 36. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de la Línea Celular L5178Y-R.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 44h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 horas adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

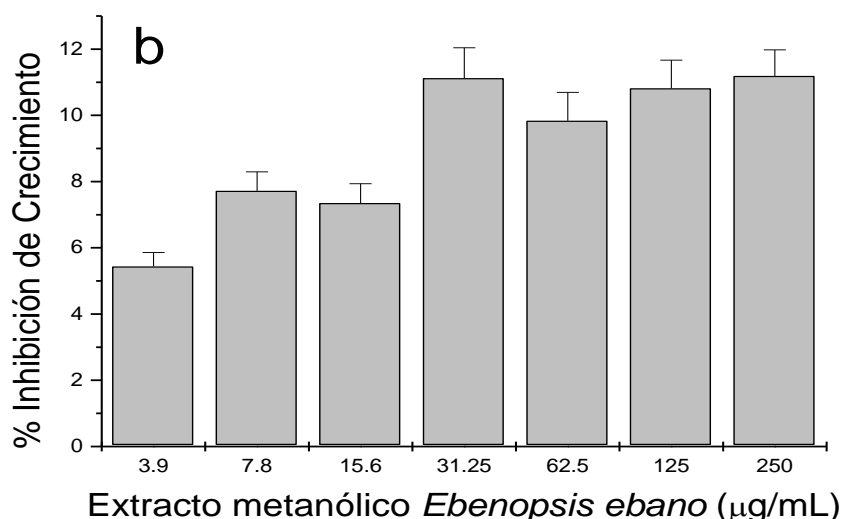
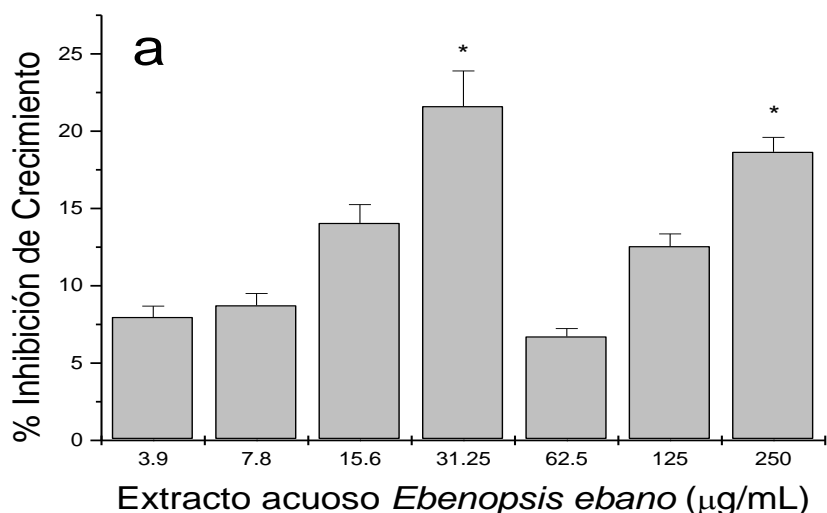


Fig. 37. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de la Línea Celular L5178Y-R.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 44h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 horas adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

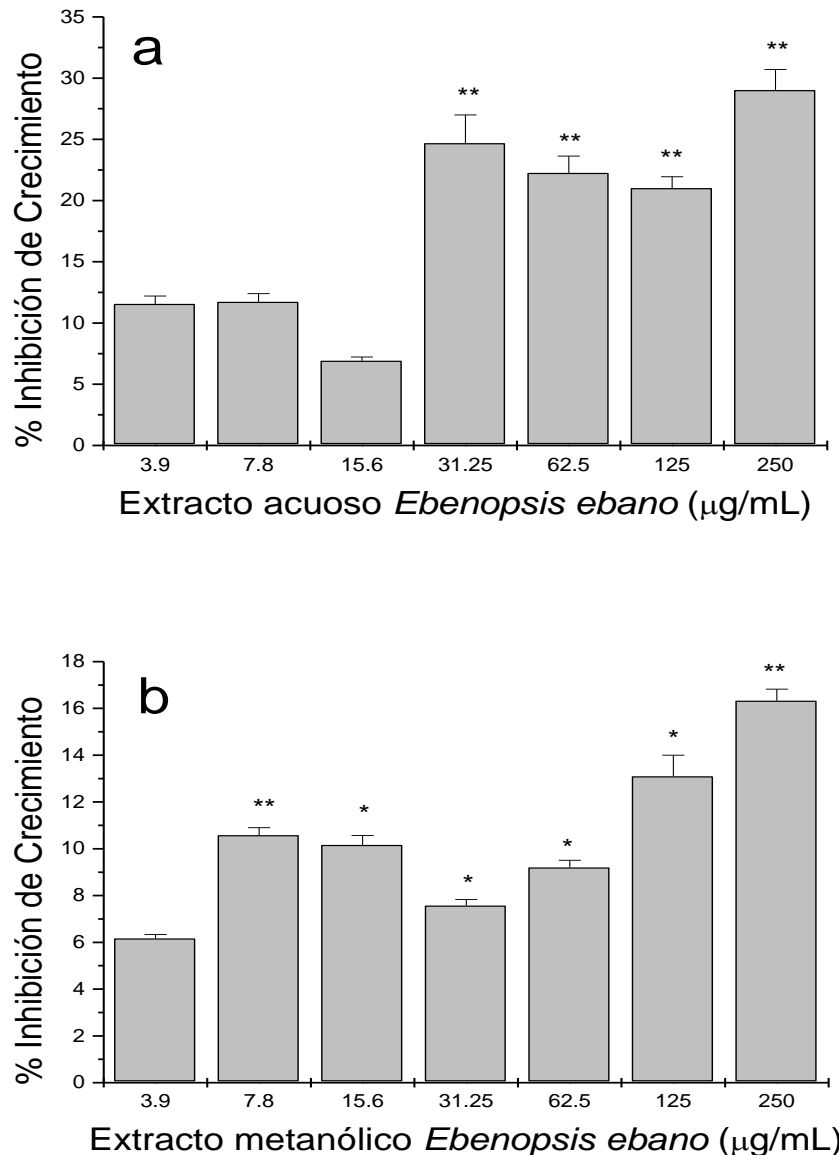


Fig. 38. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de la Línea Celular L5178Y-R.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 44h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 horas adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

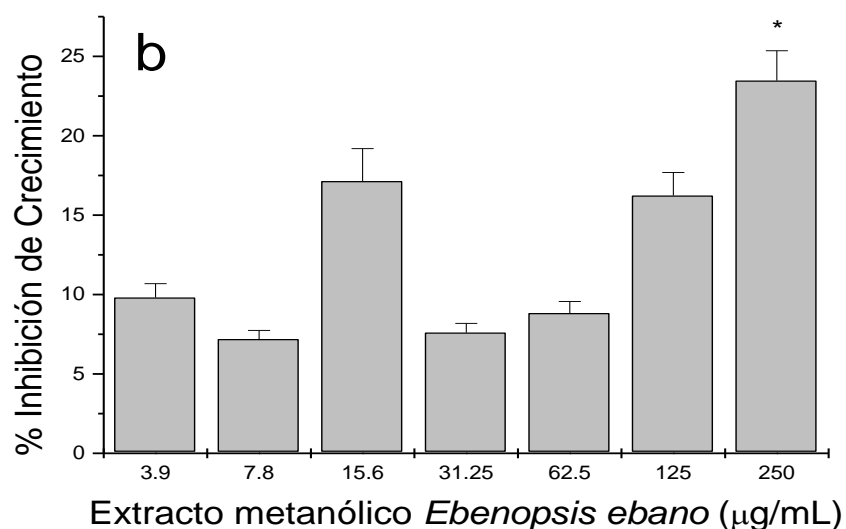
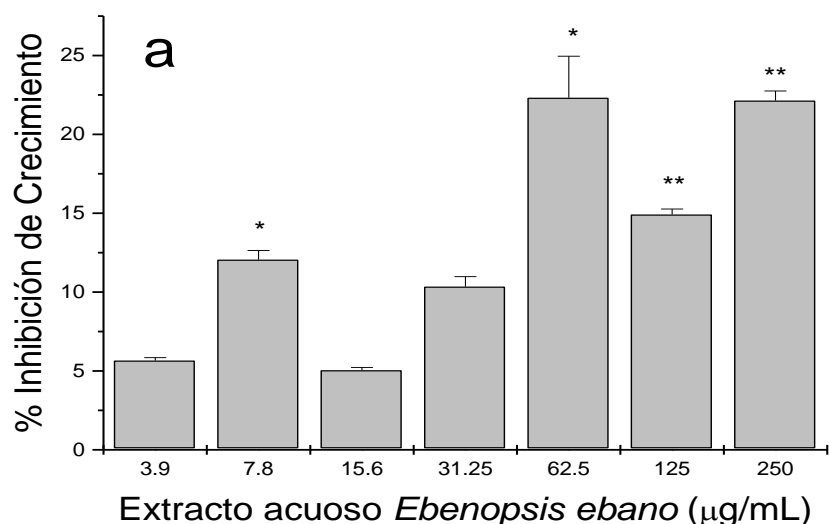


Fig. 39. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de la Línea Celular L5178Y-R.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 44h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 horas adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

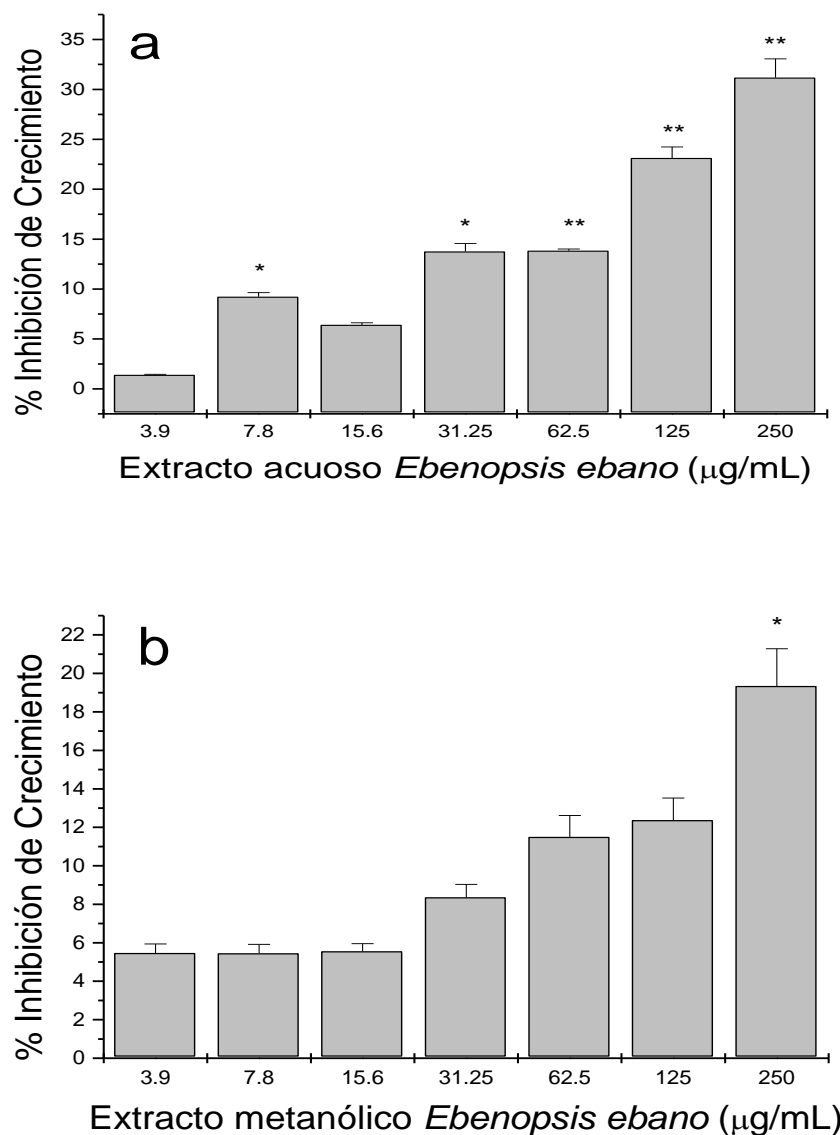


Fig. 40. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de la Línea Celular L5178Y-R.

Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 44h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 horas adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

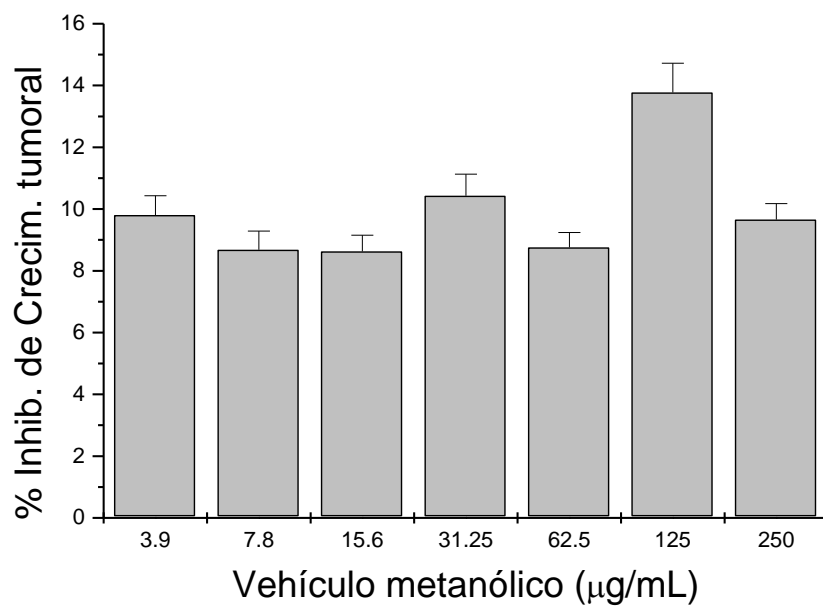


Fig. 41. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de linfoma L5178Y

6.5 Actividad inmunorreguladora

6.5.1 Efecto de los extractos crudos de *Ebenopsis ebano* sobre la citotoxicidad de linfocitos de timo de ratón *in vitro*.

Para la evaluación del efecto de los extractos crudos acuosos y metanólicos sobre la proliferación de linfocitos tímicos se utilizó el diseño experimental descrito anteriormente (Capítulo 5.7.5), con el cual se obtuvo la respuesta de linfocitos residentes y linfocitos activados con Concanavalina A (Con A) utilizando diferentes concentraciones del extracto.

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 8.0% ($p<0.05$) y 18.0% ($p<0.01$) respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 19.0, 19.0, 21.0, 29.0, y 36.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 42).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La

concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes es: 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 24.0 ($p<0.05$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 19.0% ($p<0.01$) (Fig. 42).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 31.25, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 11.0% ($p<0.05$), 13.0, 11.0 y 13.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 12.0 y 27.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 43).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 22.0% ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 18.0% ($p<0.05$) (Fig 43).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 11.0 y 22.0% ($p<0.01$). Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 8.0, 9.0% ($p<0.05$), 12.0, 19.0, 27.0 y 38.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 44).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 36.0 ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL con índice de citotoxicidad 39.0% ($p<0.01$) (Fig 44).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 8.0% ($p<0.05$), 13.0 y 21.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las

concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 14.0, 20.0, 24.0, 29.0 y 42.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 45).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 36.0 ($p<0.01$), respectivamente. La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 25.0% ($p<0.01$) (Fig. 45).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 6.0 y 13.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 11.0% ($p<0.05$) y 21.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 46).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 30.0% ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 32.0% ($p<0.01$) (Fig. 46).

Como se mencionó anteriormente, el LPS fue utilizado como control positivo para el cual no se observa crecimiento de los linfocitos del timo.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de las células (Fig. 47).

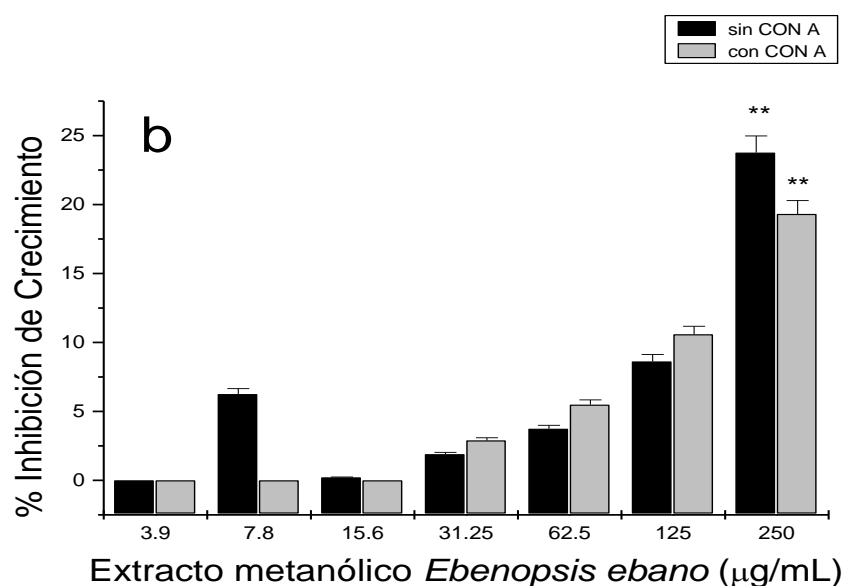
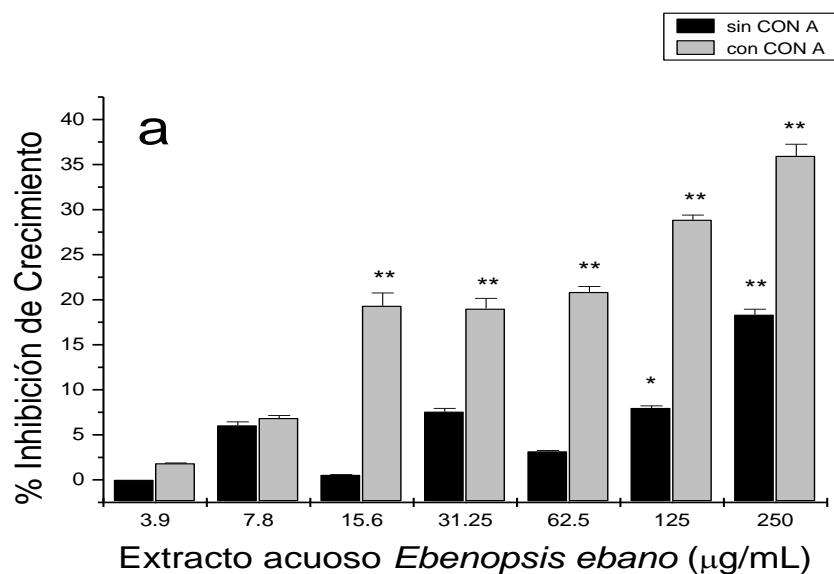


Fig. 42 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos tímicos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1.25×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

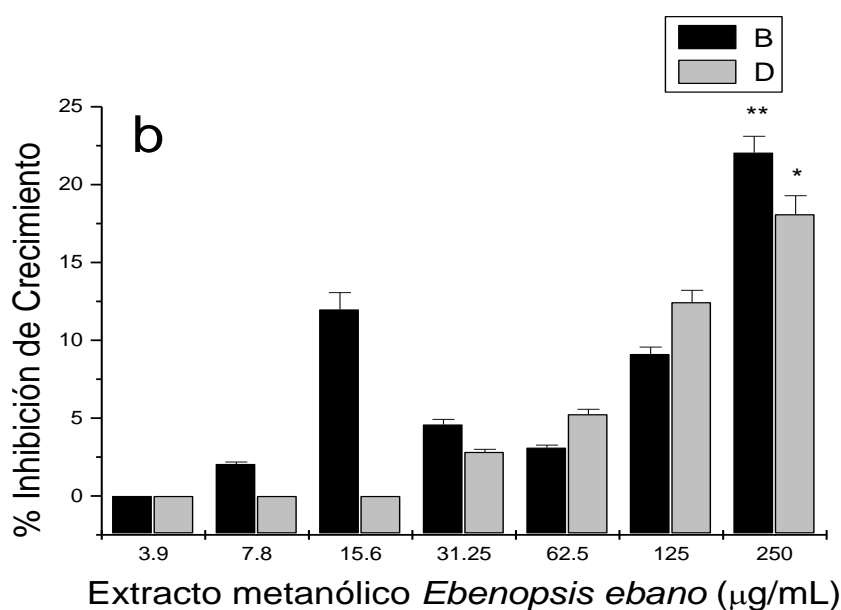
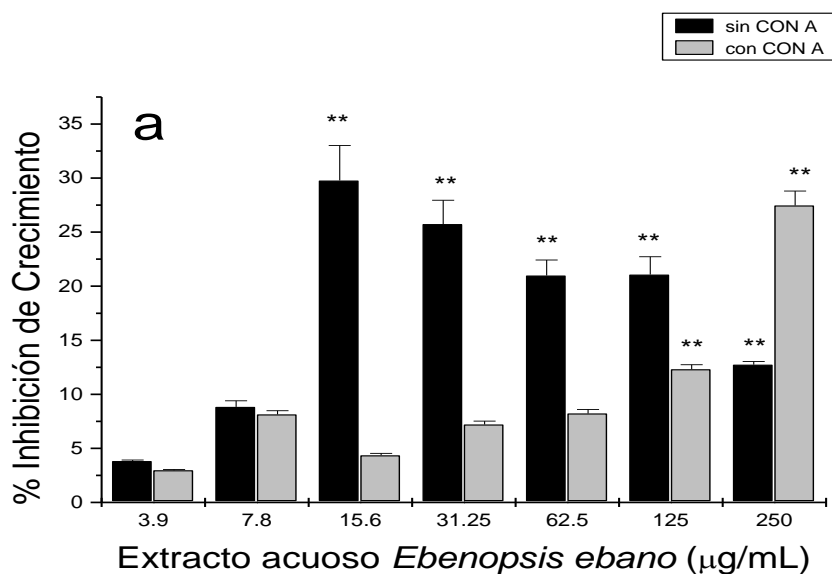


Fig. 43 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos tímicos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1.25×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

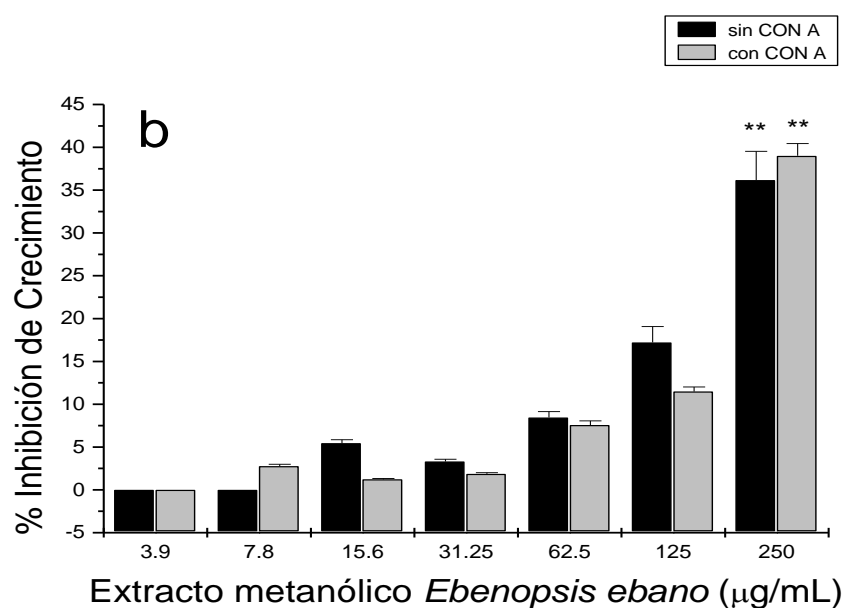
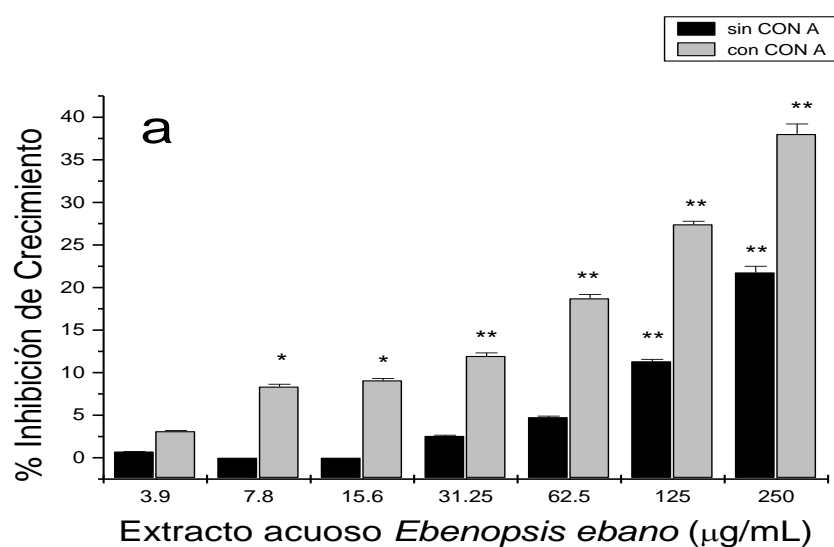


Fig. 44 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos tímicos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1.25×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

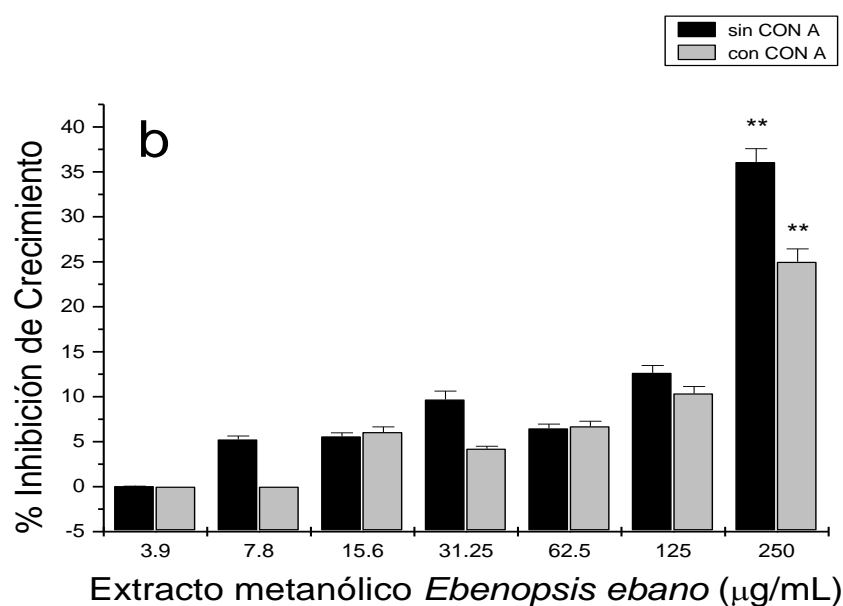
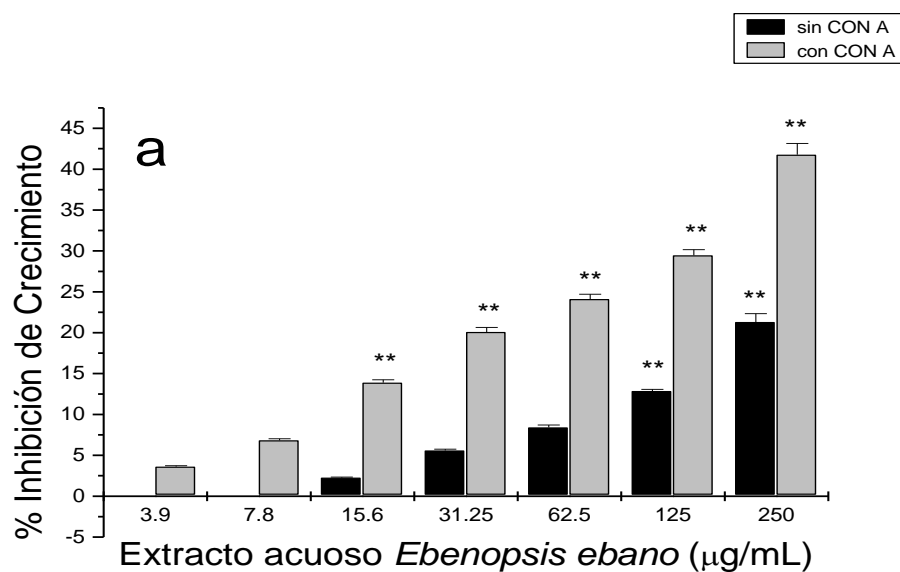


Fig. 45 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos tímicos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1.25×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

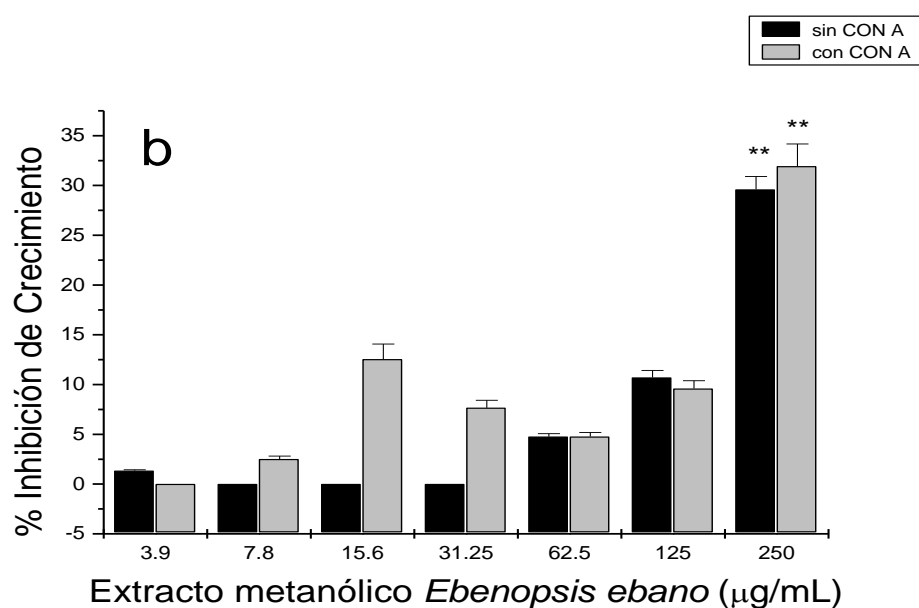
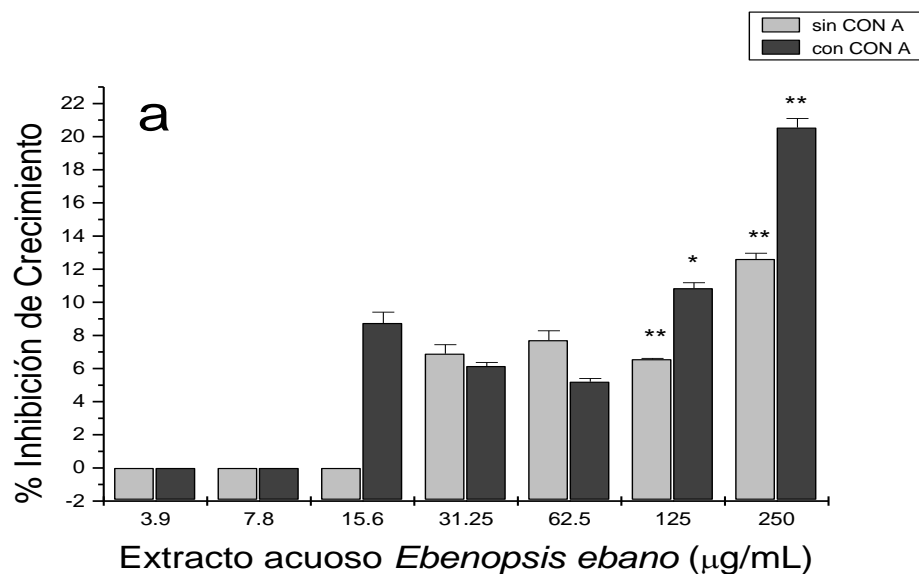


Fig. 46 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tosada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos tímicos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1.25×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

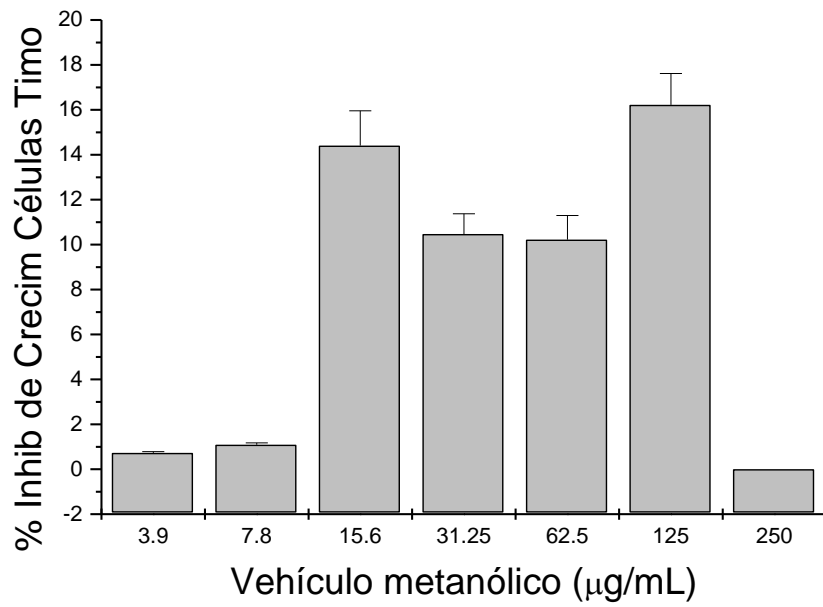


Fig. 47 Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de linfocitos tímicos

6.5.2 Efecto de los extractos crudos de *Ebenopsis ebano* sobre la citotoxicidad de linfocitos de bazo *in vitro*.

Para la evaluación del efecto de los extractos crudos acuosos y metanólicos sobre la proliferación de linfocitos de bazo se utilizó el diseño experimental descrito anteriormente (Capítulo 5.7.6), con el cual se obtuvo la respuesta de linfocitos residentes y linfocitos activados con Concanavalina A (Con A) utilizando diferentes concentraciones del extracto.

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 19.0 y 22.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron de: 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 8.0% ($p<0.05$), 20.0 y 28.0% ($p<0.0$), respectivamente (Fig. 48).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a las que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 34.0% ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad

de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 32.0% ($p<0.01$) (Fig. 48).

Para el extracto crudo acuoso de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 12.0 y 19.0% ($p<0.05$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron de 125 y 250µg/mL con índice de citotoxicidad 12.0 y 13.0% ($p<0.01$) (Fig. 49).

En el caso del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad de 30.0% ($p<0.01$). En el caso de los linfocitos activados con Con A no se observa efecto estadísticamente significativo del extracto de la semilla tierna cocida (Fig. 49).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL con índices de

citotoxicidad de 14.0 y 22.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 31.2, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con índices de citotoxidad 8.0, 10.0, 24.0 y 32.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 50).

El extracto crudo metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración a la que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con índice de citotoxicidad de 44.0% ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con índice de citotoxicidad 36.0% ($p<0.01$) (Fig. 50).

Así mismo, los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestran la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con índices de citotoxicidad de 9.0 y 22.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 31.2, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con índices de citotoxicidad 6.0, 11.0, 21.0 y 32.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 51).

Los efectos del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestran la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fueron: 125 y 250µg/mL, con índices de citotoxicidad de 18.0% ($p<0.05$) y 42.0% ($p<0.01$). La concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 44.0% ($p<0.01$) (Fig. 51).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Concanavalina A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos residentes fueron de 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad de 9.0% ($p<0.05$) y 20.0% ($p<0.01$), respectivamente. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fueron: 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 8.0, 12.0, 17.0 y 21.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 52).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos de bazo residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4µg/mL. Las concentraciones a las que se observa efecto significativo de la citotoxicidad de linfocitos residentes fueron de 125 y 250µg/mL, con índices de citotoxicidad de 18.0% ($p<0.05$) y 39.0 ($p<0.01$), respectivamente. La concentración

a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad de linfocitos activados con Con A fue de 250µg/mL, con índice de citotoxicidad 39.0% ($p<0.01$). (Fig. 52).

En los anexos 6 a 9 se muestran gráficas donde se presenta un comparativo entre el comportamiento de la línea celular tumoral y los linfocitos de timo y bazo probados frente a los diferentes extractos acuosos y metanólicos de *Ebenopsis ebano* (Fig. 65 a 69).

Como se mencionó anteriormente, el LPS fue utilizado como control positivo para el cual no se observa crecimiento de los linfocitos del bazo.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de las células (Fig. 53).

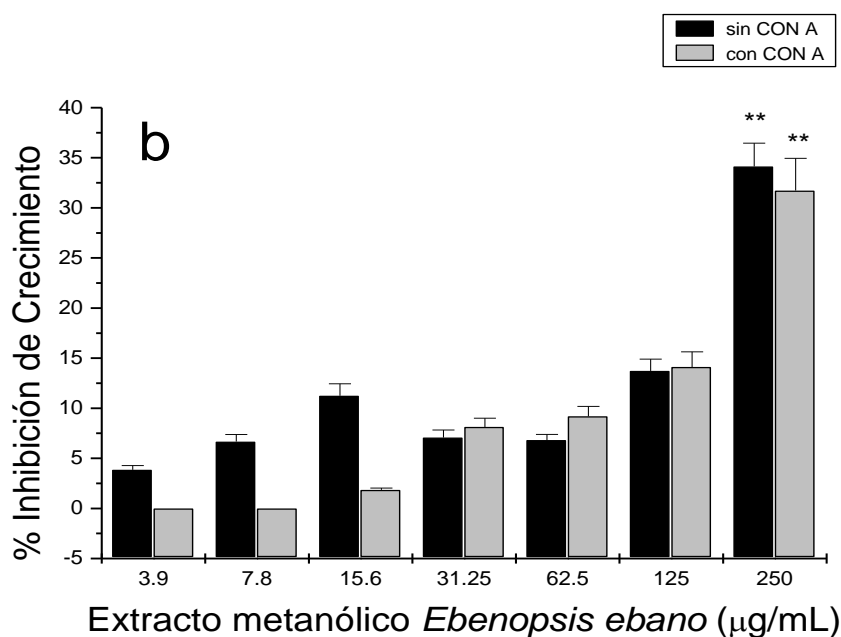
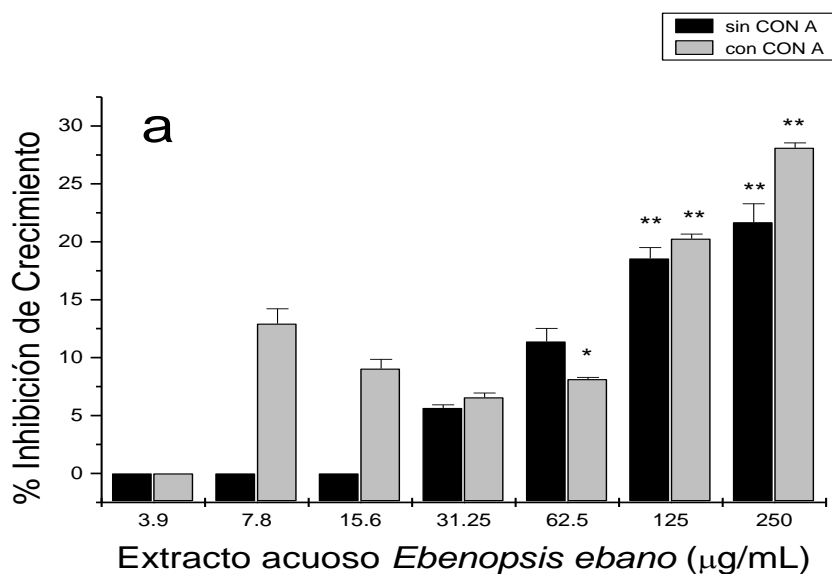


Fig. 48 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos de bazo.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100 μl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250 μg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20 μl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80 μl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

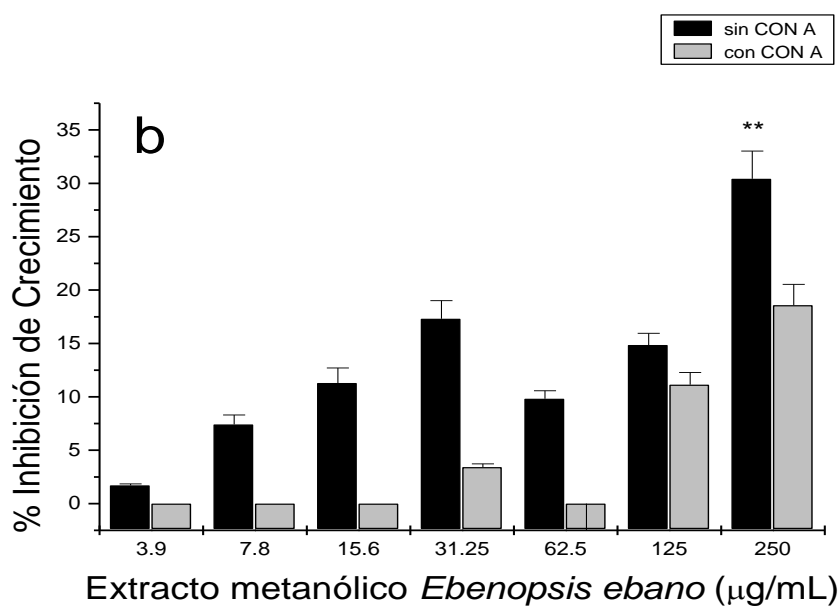
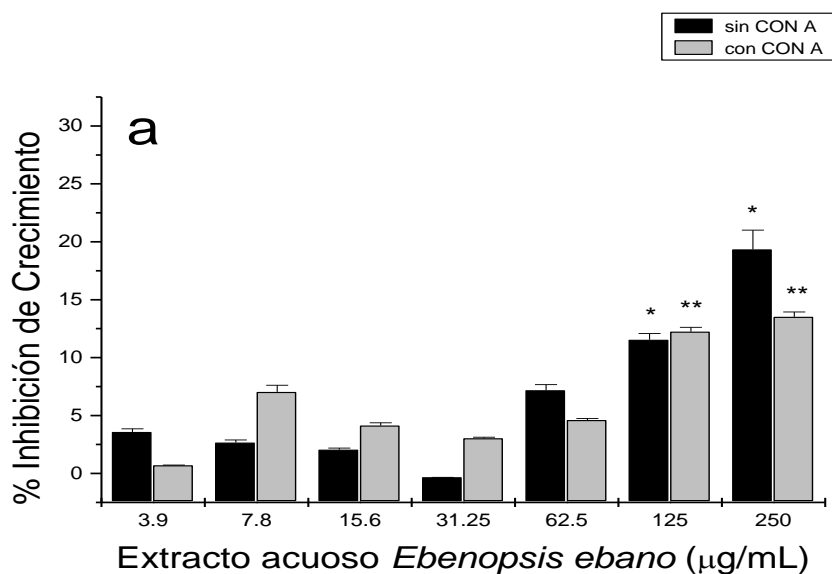


Fig. 49 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos de bazo.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

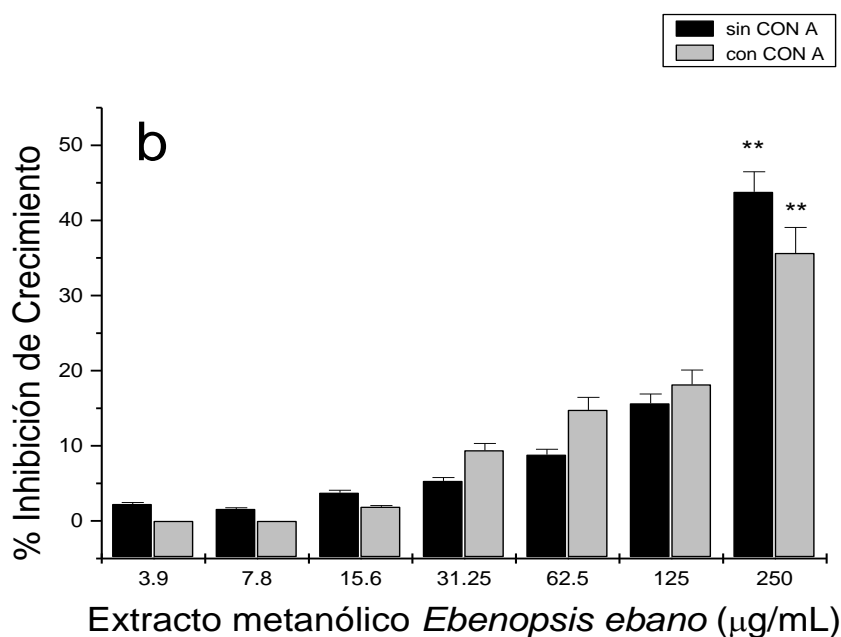
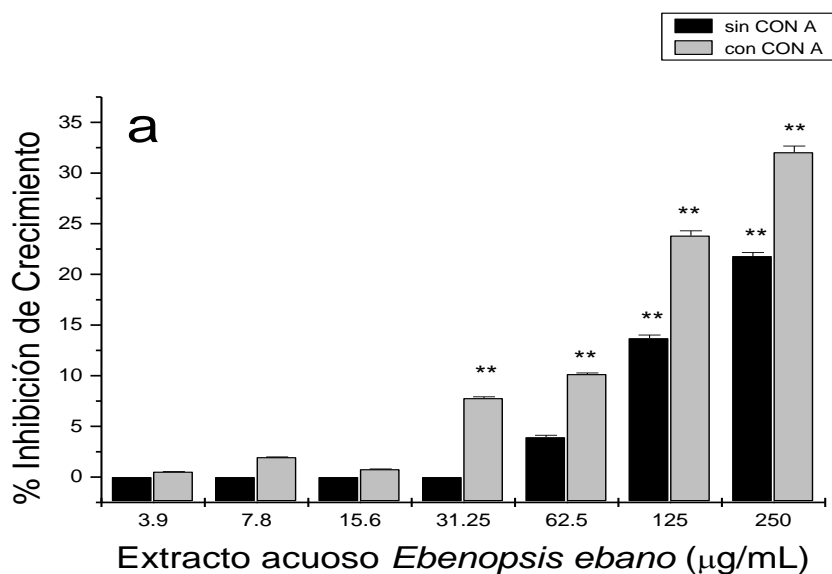


Fig. 50 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos de bazo.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

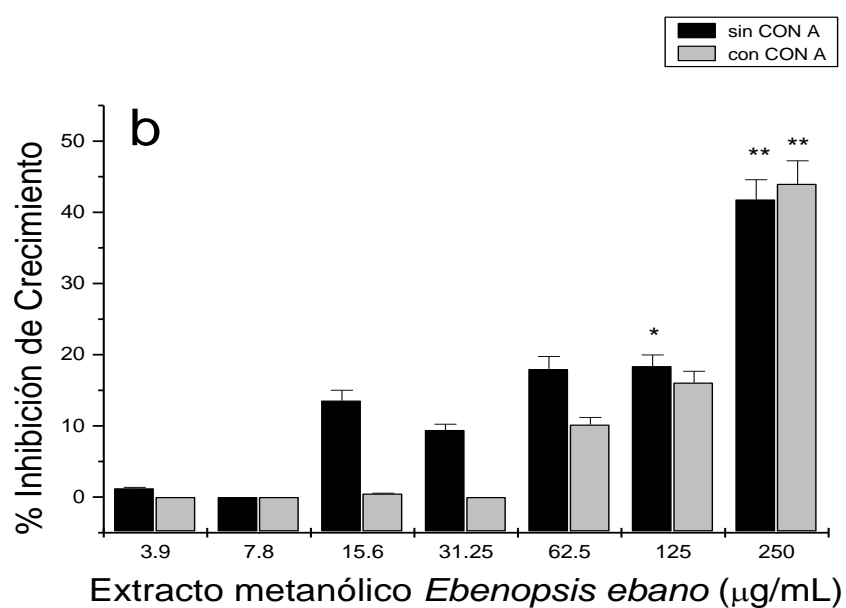
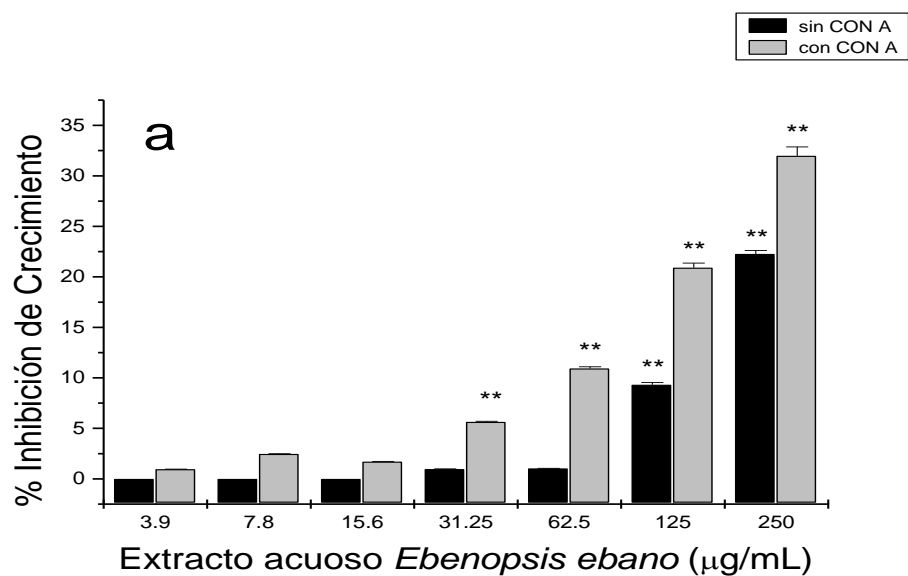


Fig. 51 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos de bazo.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron 100µl/pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación de la inhibición se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

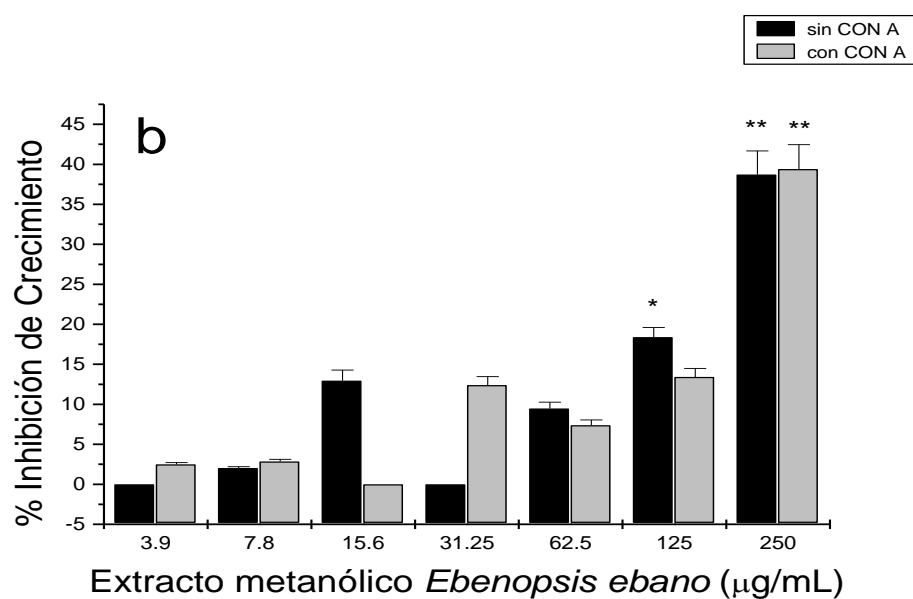
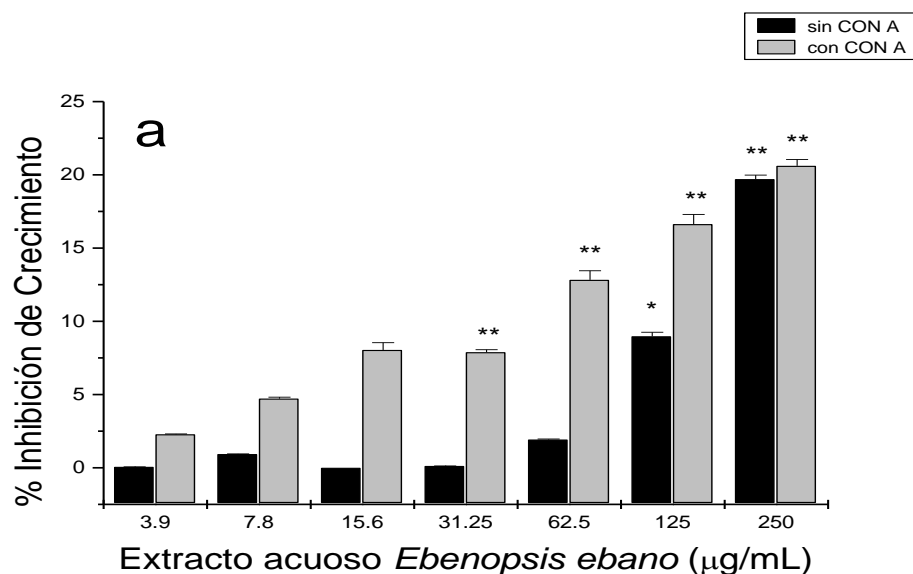


Fig. 52 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento de linfocitos de bazo.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^7 cel/ml en medio RPMI completo. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron las placas por 46-48h a 37°C y 5% de CO_2 . Para la determinación de la inhibición se añadieron $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leyeron a 540nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

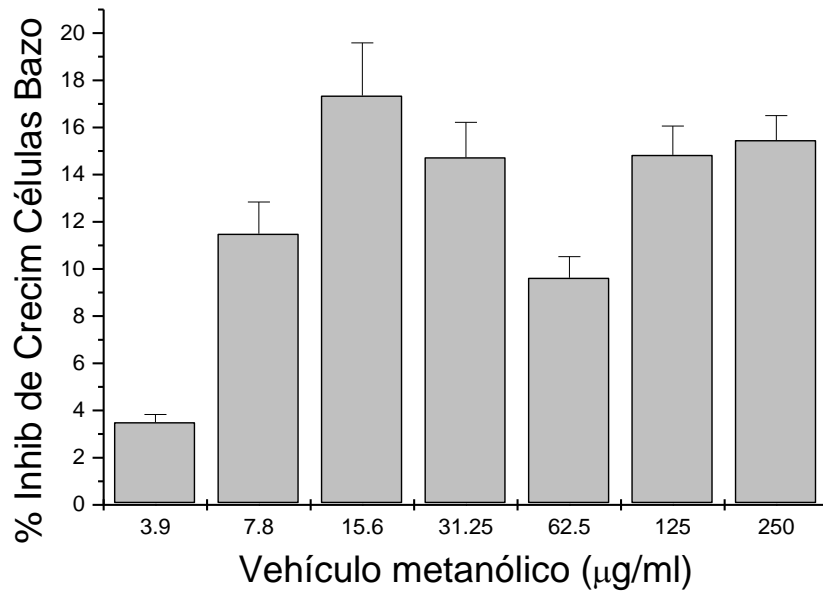


Fig. 53 Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de linfocitos de bazo

6.5.3 Efecto de los extractos crudos de *Ebenopsis ebano* sobre la citotoxicidad de macrófagos peritoneales de ratón *in vitro*.

Para la evaluación del efecto de los extractos crudos acuosos y metanólicos de la citotoxicidad sobre la proliferación de macrófagos peritoneales se utilizó el diseño experimental descrito anteriormente (Capítulo 5.7.7), con el cual se obtuvo la respuesta utilizando diferentes concentraciones.

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestran las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 29.0, 33.0, 25.0, 30.0 y 28.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 54).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cruda (T1) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre los macrófagos peritoneales: 62.5, 125 y 250µg/mL, con índices de citotoxicidad de 10.0% ($p<0.05$), 24.0 y 16.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 54).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 y 250µg/mL con índices de citotoxicidad 33.0, 33.0, 30.0, 25.0, 30.0, 24.0 y 29.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 55).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla tierna cocida (T2) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 125 y 250µg/ml con índices de citotoxicidad de 20.0 y 23.0 ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 55).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestran la concentración a la que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 7.8, 15.6 y 250µg/ml con índices de citotoxicidad 15.0% ($p<0.05$), 14.0, y 21.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 56).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura cruda (T3) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre los macrófagos peritoneales: 125 y 250µg/ml, con índices de citotoxicidad de: 28.0 y 34.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 56).

Los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestran las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/ml con índices de citotoxicidad 21.0% ($p<9.01$), 14.0% ($p<0.05$), 26.0, 25.0 y 32.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 57).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada (T4) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad de sobre los macrófagos peritoneales: 62.5, 125 y

250µg/ml, con índices de citotoxicidad de 11.0 ($p<0.05$), 30.0 y 33.0% ($p<0.01$), respectivamente (Fig. 57).

En los resultados del extracto crudo acuoso de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* no se observa efecto estadísticamente significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales (Fig. 58).

Los resultados del extracto crudo metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) de *Ebenopsis ebano* muestra las concentraciones a las que se observa efecto significativo de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales: 125 y 250µg/ml, con índices de citotoxicidad de 15.0 y 29.0% ($p<0.01$) (Fig. 58).

Como se mencionó anteriormente, el LPS fue utilizado como control positivo para el cual no se observa crecimiento de los macrófagos peritoneales.

En el caso del vehículo metanólico no se observa significancia estadística en la inhibición del crecimiento de las células (Fig. 59).

6.5.4 Producción de nitritos por macrófagos intraperitoneales estimulados con extractos crudos de *Ebenopsis ebano*.

La detección de la liberación de nitritos, es una medida indirecta de probar la producción de óxido nítrico por macrófagos activados. Tanto para los extractos crudos acuosos como los metabólicos se observa la producción de óxido nítrico, principalmente a las concentraciones más altas probadas.

En el extracto acuoso crudo de la semilla tierna cruda (T1) se observa que la producción de óxido nítrico se eleva hasta 8 nmoL/pozo (Fig 54).

En el extracto metanólico de la semilla tierna cruda (T1), la producción de óxido nítrico decrece de las concentraciones más bajas a las más altas, siendo de 0 desde la concentración de 31.2 hasta 250 μ g/mL, sin embargo, la concentración observada no supera los 3 μ g/ml (Fig 54).

En el extracto acuoso crudo de la semilla tierna cocida (T2) la producción de óxido nítrico se observa hasta 7 nmoL/pozo (Fig 55).

En el extracto metanólico de la semilla tierna cocida (T2) la producción de óxido nítrico decrece de las concentraciones más bajas a las más altas, siendo de 0 desde la concentración de 31.2 hasta 250 μ g/mL, sin embargo, la concentración observada no supera los 3 μ g/mL (Fig. 55).

En el extracto acuoso crudo de la semilla madura cruda (T3) se observa que la producción de óxido nítrico se eleva hasta 10 nmoL/pozo (Fig. 56).

En el extracto metanólico de la semilla madura cruda (T3) la producción de óxido nítrico decrece de las concentraciones más bajas a las más altas, siendo de 0 desde la concentración de 31.2 hasta 250 μ g/mL, sin embargo, la concentración observada no supera los 3 μ g/ml (Fig. 56).

En el extracto acuoso crudo de la semilla madura tostada (T4) se observa que la producción de óxido nítrico se eleva hasta 10.6 nmoL/pozo (Fig. 57).

En el extracto metanólico de la semilla madura cruda (T4) la producción de óxido nítrico decrece de las concentraciones más bajas a las más altas, siendo de 0 desde la concentración de 62.5 hasta 250µg/mL, sin embargo, la concentración observada no supera los 4µg/ml (Fig. 57).

En el extracto acuoso crudo de la semilla madura tostada comercial (T5) no se observa producción de óxido nítrico (Fig. 58).

En el extracto metanólico de la semilla madura tostada comercial la producción de óxido nítrico decrece de las concentraciones más bajas a las más altas, siendo de 0 desde la concentración de 62.5 hasta 250µg/mL, sin embargo, la concentración observada no supera los 3µg/ml (Fig. 58).

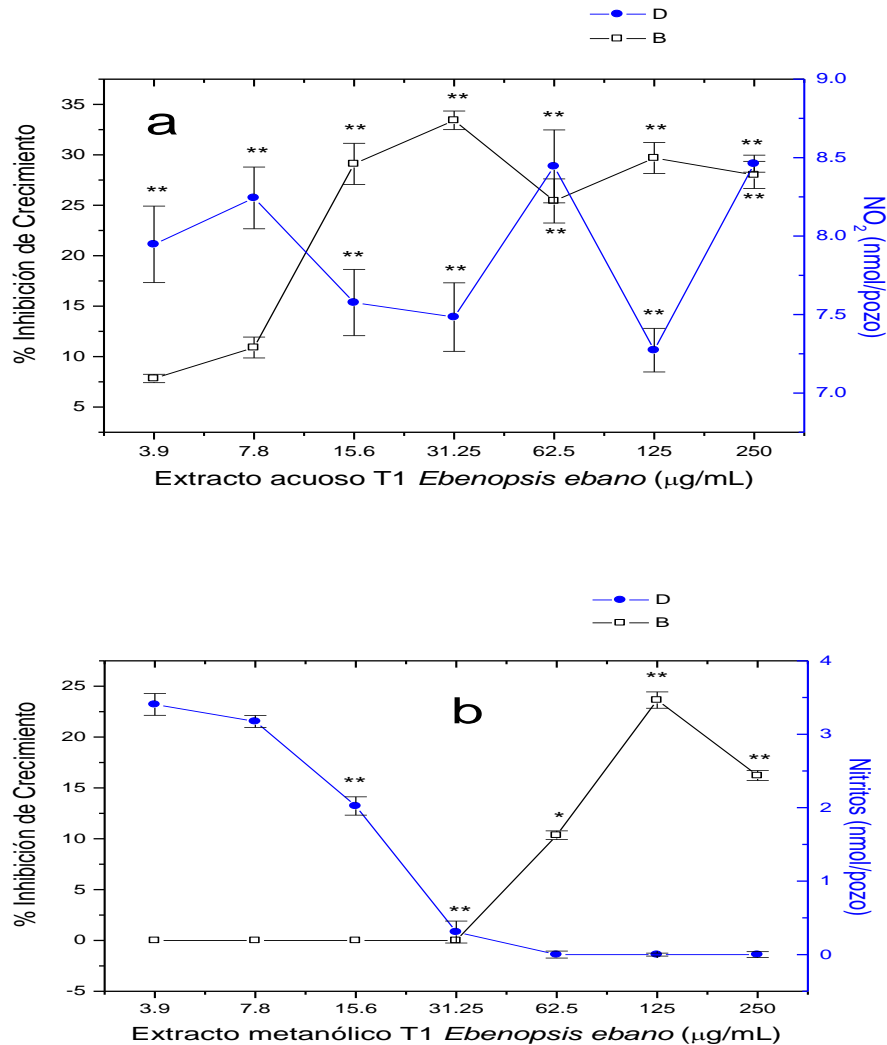


Fig. 54. Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cruda (T1) sobre la inhibición del crecimiento en la proliferación de macrófagos peritoneales y producción de nitritos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio AIM-V. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de esta suspensión y se llevaron a incubación por 2h a 37°C y 5% CO_2 . Las células que no se adhieren se remueven, la placa se lava con $100 \mu\text{l}$ del medio. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron las placas por 72h a 37°C y 5% de CO_2 . De la suspensión se toman $50 \mu\text{l}$ para la determinación de la inhibición y se añaden $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incuban por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leen a 540nm en un lector de microplacas. Por otro lado para la determinación de nitritos, se toman $50 \mu\text{l}$ que se depositaron en otra placa se agregan Reactivo de Griess B, se incuban a $T = \text{amb}$ y en oscuridad por 10 min; se agregan $50 \mu\text{l}$ de Reactivo de Griess A, se incuban por 10 min en la oscuridad y se lee la densidad óptica a 570nm. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

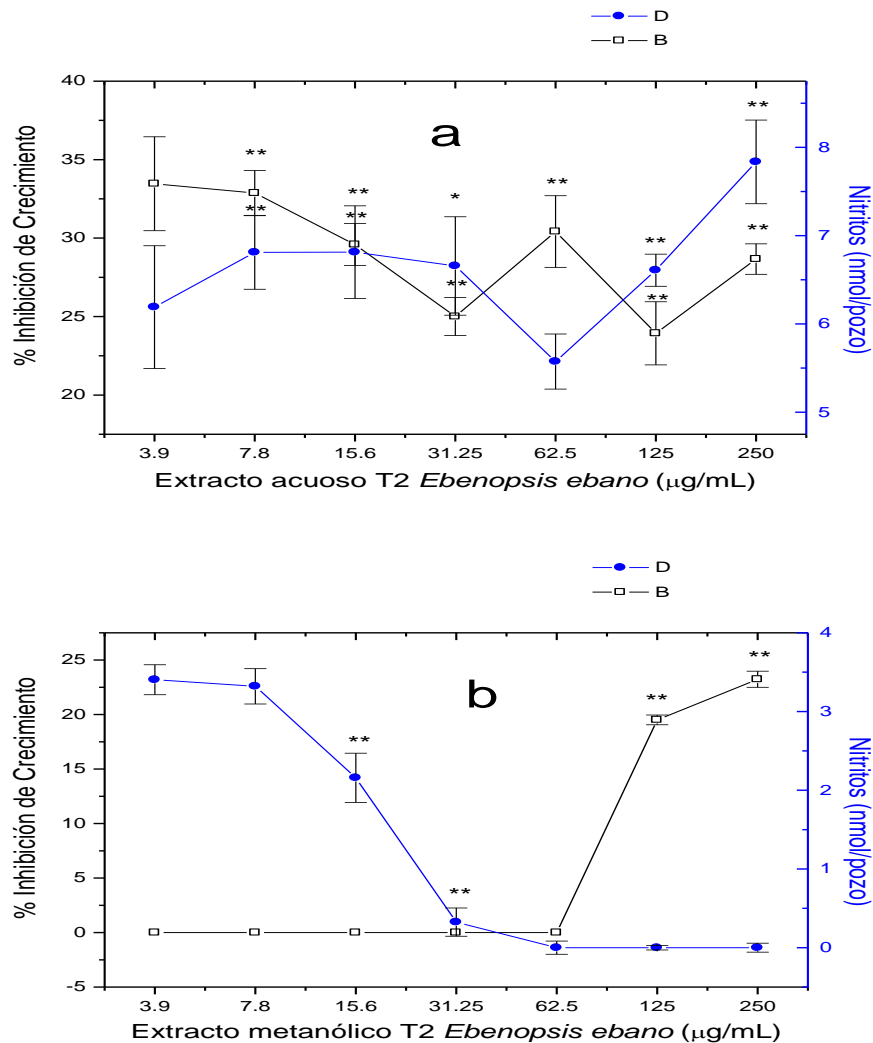


Fig. 54 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla tierna cocida (T2) sobre la inhibición del crecimiento en la proliferación de macrófagos peritoneales y producción de nitritos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio AIM-V. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de esta suspensión y se llevaron a incubación por 2h a 37°C y 5% CO_2 . Las células que no se adhieren se remueven, la placa se lava con $100 \mu\text{l}$ del medio. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron las placas por 72h a 37°C y 5% de CO_2 . De la suspensión se toman $50 \mu\text{l}$ para la determinación de la inhibición y se añaden $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incuban por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leen a 540nm en un lector de microplacas. Por otro lado para la determinación de nitritos, se toman $50 \mu\text{l}$ que se depositaron en otra placa se agregan Reactivo de Griess B, se incuban a $T = \text{amb}$ y en oscuridad por 10 min; se agregan $50 \mu\text{l}$ de Reactivo de Griess A, se incuban por 10 min en la oscuridad y se lee la densidad óptica a 570nm. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

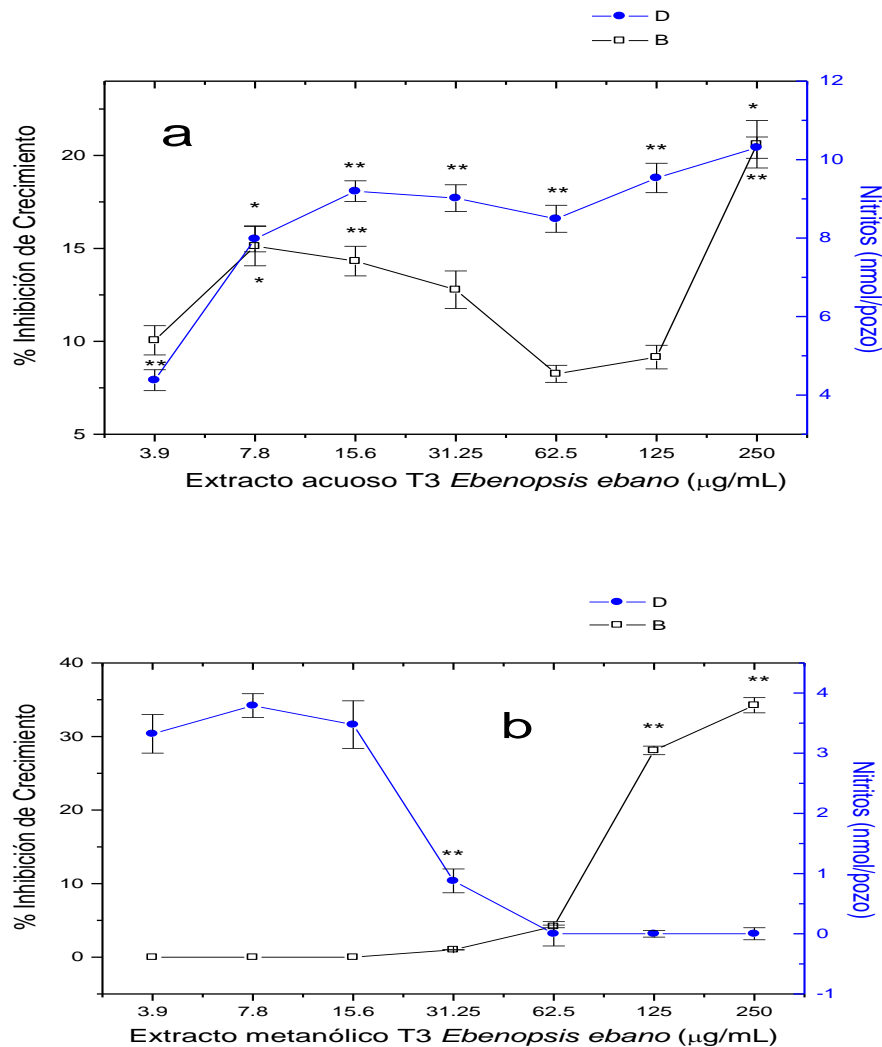


Fig. 54 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura cruda (T3) sobre la inhibición del crecimiento en la proliferación de macrófagos peritoneales y producción de nitritos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio AIM-V. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de esta suspensión y se llevaron a incubación por 2h a 37°C y 5% CO_2 . Las células que no se adhieren se remueven, la placa se lava con $100 \mu\text{l}$ del medio. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron las placas por 72h a 37°C y 5% de CO_2 . De la suspensión se toman $50 \mu\text{l}$ para la determinación de la inhibición y se añaden $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incuban por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leen a 540nm en un lector de microplacas. Por otro lado para la determinación de nitritos, se toman $50 \mu\text{l}$ que se depositaron en otra placa se agregan Reactivo de Griess B, se incuban a $T=\text{amb}$ y en oscuridad por 10 min; se agregan $50 \mu\text{l}$ de Reactivo de Griess A, se incuban por 10 min en la oscuridad y se lee la densidad óptica a 570nm. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

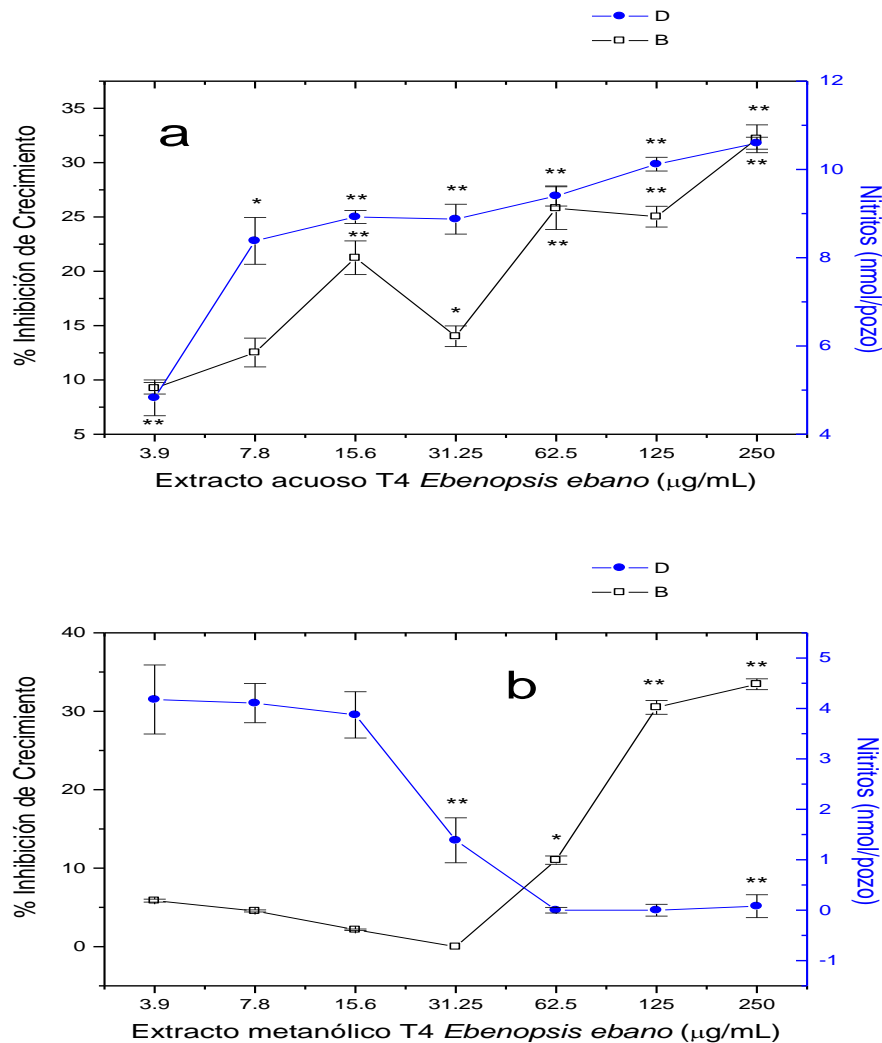


Fig. 54 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada (T4) sobre la inhibición del crecimiento en la proliferación de macrófagos peritoneales y producción de nitritos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio AIM-V. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de esta suspensión y se llevaron a incubación por 2h a 37°C y 5% CO_2 . Las células que no se adhieren se remueven, la placa se lava con $100 \mu\text{l}$ del medio. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron las placas por 72h a 37°C y 5% de CO_2 . De la suspensión se toman $50 \mu\text{l}$ para la determinación de la inhibición y se añaden $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incuban por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leen a 540nm en un lector de microplacas. Por otro lado para la determinación de nitritos, se toman $50 \mu\text{l}$ que se depositaron en otra placa se agregan Reactivo de Griess B, se incuban a $T = \text{amb}$ y en oscuridad por 10 min; se agregan $50 \mu\text{l}$ de Reactivo de Griess A, se incuban por 10 min en la oscuridad y se lee la densidad óptica a 570nm. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

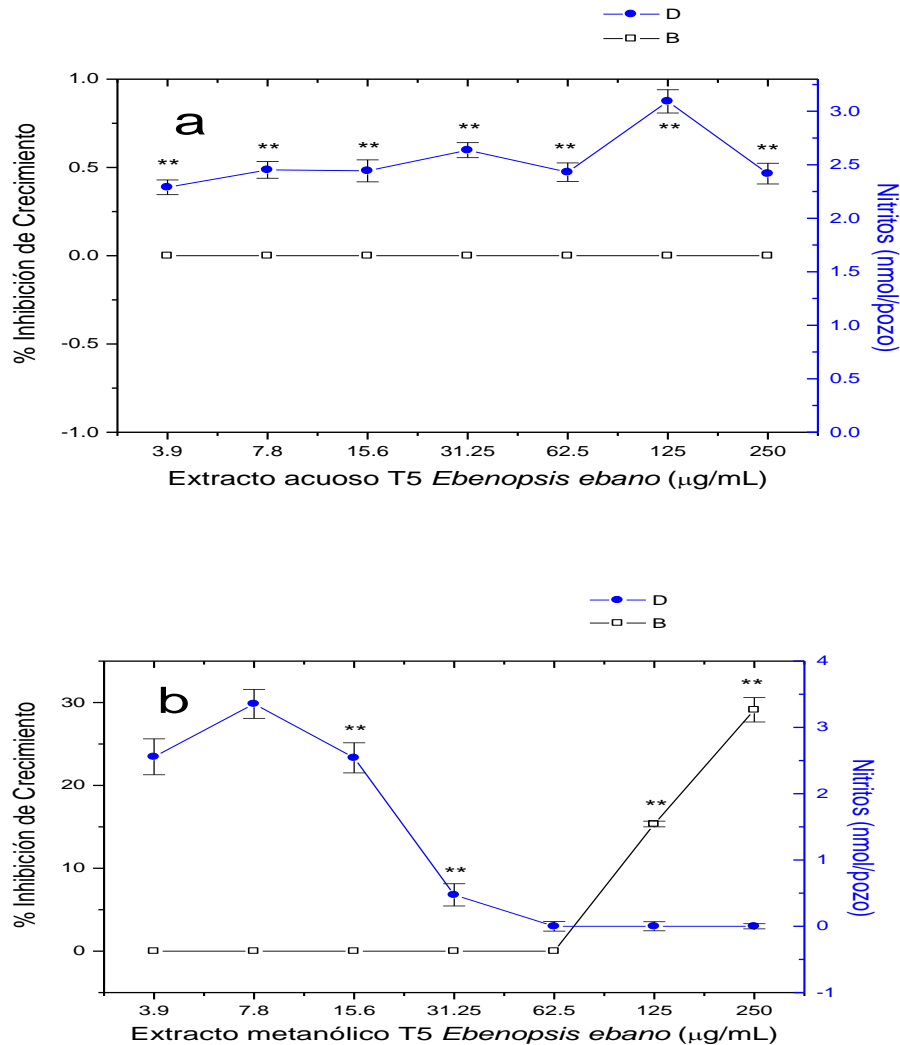


Fig. 54 Efecto del extracto acuoso y metanólico de la semilla madura tostada comercial (T5) sobre la inhibición del crecimiento en la proliferación de macrófagos peritoneales y producción de nitritos.

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio AIM-V. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo de esta suspensión y se llevaron a incubación por 2h a 37°C y 5% CO_2 . Las células que no se adhieren se remueven, la placa se lava con $100 \mu\text{l}$ del medio. Posteriormente se añadieron $100 \mu\text{l}$ /pozo del extracto acuoso (a) o metanólico (b) a concentraciones de 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y $250 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron las placas por 72h a 37°C y 5% de CO_2 . De la suspensión se toman $50 \mu\text{l}$ para la determinación de la inhibición y se añaden $20 \mu\text{l}$ /pozo de MTT (5mg/ml) y se incubaron 4 hora adicionales. Inmediatamente después se agregaron $80 \mu\text{l}$ /pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incuban por 16h a 37°C y 5% de CO_2 . Las densidades ópticas se leen a 540nm en un lector de microplacas. Por otro lado para la determinación de nitritos, se toman $50 \mu\text{l}$ que se depositaron en otra placa se agregan Reactivo de Griess B, se incuban a $T = \text{amb}$ y en oscuridad por 10 min; se agregan $50 \mu\text{l}$ de Reactivo de Griess A, se incuban por 10 min en la oscuridad y se lee la densidad óptica a 570nm. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 repeticiones por tratamiento de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

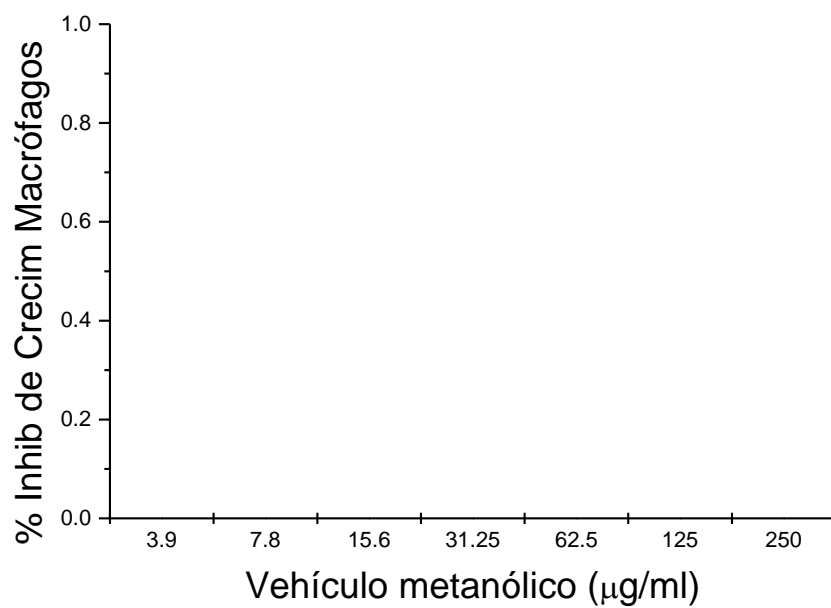


Fig. 59. Efecto del vehículo metanólico sobre el crecimiento de macrófagos peritoneales

7. DISCUSIÓN

Las plantas a lo largo del tiempo han sido utilizadas por el hombre para satisfacer sus necesidades tanto de nutrimentos como para mantener la salud ya que se ha comprobado que pueden aportar tanto nutrimentos como fitonutrientes los cuales pueden ser utilizados por el hombre para mantener la salud. En la actualidad existen un sinnúmero de reportes de investigación que demuestran la presencia de todo ese tipo de compuestos en los diferentes alimentos los cuales han sido utilizados en la agricultura, industria farmacéutica y de alimentos, sin embargo, el consumo de estas, especialmente las leguminosas puede ser directamente de la misma planta o bien, extraer los compuestos para darles la aplicación adecuada.

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años. Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo. Es necesario el estudio científico del potencial farmacológico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad (Suárez *et al.*, 1996).

7.1 Análisis proximal

La información sobre el contenido de nutrientes de los alimentos representa gran importancia, ya sea por la necesidad de contar con datos actualizados sobre el contenido de dichos nutrientes de productos regionales ya sea por su volumen o consumo o por las diversas aplicaciones tales como la evaluación nutricional de la población, planificación de dietas, elaboración de productos u otras actividades relacionadas. (Maldonado y Samman, 2000).

De acuerdo a los resultados del contenido de macronutrientes en los diferentes tratamientos de las semillas de *Ebenopsis ebano* se observa la presencia de los que aportan energía al organismo: proteínas, grasas y carbohidratos, sin embargo, se observa que el contenido de éstos es diferente estadísticamente ($p < 0.05$) en los tratamientos aplicados. Al comparar el contenido de proteína de la maguacata con la soya, leguminosa que presenta los contenidos más altos (comparado con otras leguminosas) se observa que la semilla tierna cruda contiene 68.19%, un valor superior al de la soya que contiene alrededor del 46%, este valor similar al de la semilla tierna cocida; en el caso de las semillas maduras los valores de 35.91 a 37.28 son superiores a los de los frijoles cuyo contenido varía de 18 a 22%, por lo que este alimento puede ser una buena fuente de proteínas, aunque la recomendación es que sea consumida con cereales para complementar las deficiencias de ambos grupos de alimentos (Maldonado y Samman, 2000; Prada *et al.*, 2005).

Con relación al contenido de grasa se observa que la diferencia entre las semillas tiernas y maduras es importante, presentando el valor más alto las semillas maduras, sin embargo, estadísticamente los cuatro tratamientos son diferentes ($p < 0.05$). Las leguminosas no se consideran fuentes importantes de grasa como se muestra en el presente estudio Prada *et al.*, (2005). Existe un tipo de frijol llamado frijol alado para el que se reportan valores de grasa del 16%, observándose una disminución en el contenido de carbohidratos (León *et al.*, 1993).

El contenido de carbohidratos se observa en un 30% más bajo del T1 con relación a los otros tres tratamientos analizados, sin embargo, el contenido de carbohidratos en general para las leguminosas es alto, este dato no coincide con lo reportado en la literatura ya que para este alimento se observaron valores bajos, esto es debido a la distribución de los componentes en general (Prada *et al.*, 2005).

Con relación al contenido de fibra dietética se observan niveles importantes de este componente, el cual, aunque no es utilizado por el organismo para proporcionar energía si tiene una función importante ya que ayuda a incrementar el paso de los alimentos a través del tracto gastrointestinal y esto mejora la digestión.

Por otro lado, se observa en todos los tratamientos y estados de madurez la presencia de fibra dietética, esto es importante desde el punto de vista funcional en el organismo ya que este componente de los alimentos ayudan a que el paso de los alimentos por el tracto digestivo sea más rápido y así evitar problemas de digestión, así como disminución enfermedades que en la actualidad han sido denominadas "enfermedades de la civilización" tales como de la presión arterial, reducción del

riesgo de cáncer colorrectal, efecto hipocolesterolémico, menor riesgo de enfermedad cardiovascular y un mejor control de la diabetes mellitus tipo II evitando la aparición de problemas crónico degenerativos, los cuales en la actualidad representan graves problemas para el sector salud (Sáenz *et al.*, 2002; Cabrera y Cárdenas, 2006).

7.2 Contenido de compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos son uno de los grupos más grandes de compuestos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal con más de 8000 estructuras conocidas. A estos compuestos se les han atribuido efectos antioxidantes, quimiopreventivos, antibiótico, antimutagénica, antiinflamatoria probados en modelos con animales, además estos compuestos aportan a los alimentos características organolépticas (deseables e indeseables) que definen en gran medida su estilo como: color, astringencia y amargor (Mazza, et al 1999; Carando *et al.*, 1999; Kaur y Kapoor, 2001; Vila *et al.*, 2005).

Las leguminosas además de contener los principales macronutrientes como se describe en el párrafo anterior, también contienen compuestos bioactivos, los cuales se han relacionado con la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles entre los que se encuentran además de la fibra dietética, saponinas, isoflavonas (Dávila *et al.*, 2003; Prada *et al.*, 2005).

El contenido de compuestos polifenólicos es afectado por el grado de madurez, al momento de la cosecha, diferencias genéticas, condiciones ambientales de la

precosecha, condiciones de almacenamiento y procesado después de la cosecha, o época del año, pero no por las prácticas de cultivo (Tabart *et al.*, 2006).

El contenido de compuestos polifenólicos fue determinado por diferentes métodos y en todos los casos se observa la presencia de este tipo de componentes, cada uno de los diferentes métodos evalúa diferentes tipos de compuestos, aunque todos son sustancias que forman parte de este grupo de compuestos. En el caso del contenido de polifenoles totales se expresan en general como ácido ferúlico. Al evaluar el extracto crudo acuoso se observa el mayor contenido para la semilla tierna cocida (T2), esto puede ser debido a que el cocimiento de la semilla en agua implica que pueda haber disolución de los compuestos y que migren de la vaina y la testa a los cotiledones provocando una concentración más alta en los mismos. El contenido de polifenoles de las semillas maduras tostadas comerciales (T5) es similar estadísticamente a las semillas maduras tostadas (T4) ($p < 0.05$), y estos tratamientos presentan el contenido de polifenoles más alto que las semillas tiernas crudas (igualadas estadísticamente a las semillas maduras crudas (T3) y maduras tostadas (T4) ($p < 0.05$ (estos tres tratamientos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$)), presentando el contenido más bajo. Este mismo comportamiento se observa para los extractos crudos metanólicos, aunque el contenido de polifenoles en la semilla madura tostada comercial es estadísticamente diferente a la semilla madura tostada ($p < 0.05$).

Al evaluar el grado de polimerización de los compuestos polifenólicos el cual establece cuatro grupos de compuestos (derivados del ácido benzoico, expresados

como ácido gálico; derivados de ésteres tartáricos, expresados como ácido benzoico; derivados de flavonoides, expresados como quercetina y como cuarto grupo los derivados de antocianinas, expresados como malvidin-3-glucósido) (Cabrita *et al.*, 2003). En los extractos crudos acuosos de las semillas maduras tostadas comerciales (T5), estas presentan el mayor contenido de ácido ferúlico, ácido cafeico y quercetina esto puede ser debido a que en la preparación de este tratamiento las semillas son expuestas a altas temperaturas por tiempos prolongados y los compuestos químicos sufren transformaciones los cuales absorben a la longitud de onda que son evaluados y esto provocar un incremento en su concentración. En ninguno de los tratamientos (T1 a T5) se detectan compuestos derivados de los flavonoides, estos principalmente son los que imparten colores oscuros a los alimentos y plantas, por lo que es factible que estos no hayan sido detectados por el método que se evaluaron ya que las semillas en su estado tierno presentan colores claros y en el estado maduro la parte de la semilla que presenta este tipo de colores es la vaina y la testa, aunque estas partes de la planta no fueron evaluadas. Al comparar el tipo de compuesto que predomina en los diferentes tratamientos se observa que predominan los derivados del ácido cafeico con relación al ácido ferúlico y a la quercetina.

En los extractos crudos metanólicos se observa el mismo comportamiento con relación al contenido de polifenoles y a la distribución de los compuestos en los tratamientos, sin embargo, el contenido es menor en los extractos metanólicos con respecto a los extractos acuosos, esto se puede deber a que tanto el agua como el metanol son compuestos polares y los compuestos polifenólicos por su estructura química son solubles en este tipo de solventes.

Por otro lado de acuerdo a la literatura se menciona que la testa (hollejo) es más rico con respecto a la pulpa en minerales, polifenoles, aromas y compuestos enzimáticos (Disegna *et al.*, 2003).

No es posible evaluar con precisión la ingesta de polifenoles a través de la dieta, ya que se carece de datos suficientes y fiables sobre su contenido en alimentos. Tanto la cantidad como la proporción de los diferentes polifenoles ingeridos van a variar ampliamente, según el tipo de alimentos consumidos en función de los hábitos dietéticos y sus preferencias (Santos, 2001). Los beneficios atribuidos a las isoflavonas pueden igualmente ser proporcionados por una ingesta apropiada de leguminosas como parte de una dieta balanceada. (Dávila *et al.*, 2003). La catequina es un potente antioxidante, que además activa la termogénesis e inhibe el crecimiento de la flora bacteriana oral que favorece la lesión del esmalte, las caries y la halitosis (Poveda, 2005).

Frecuentemente la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia. Es necesario someter a los extractos de plantas medicinales a un ensayo general inicial donde sea posible identificar el verdadero potencial biológico de los mismos. El ensayo hipocrático es una de éstas pruebas iniciales a las que se deben de someter los extractos crudos de plantas. Este permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, da información toxicológica inicial, orienta sobre qué otras pruebas biológicas se deben de efectuar con el extracto y guía el fraccionamiento químico del extracto según la actividad biológica de las fracciones (Suárez *et al.*, 1996).

Actividad antioxidante

La búsqueda de sustancias con actividad antioxidante en el reino vegetal ha tomado diferentes caminos: por un lado es encontrar fuentes para ser usados como aditivos alimentarios que puedan reemplazar parcial o totalmente a los sintéticos como el BHA o BHT. Por otro lado productos que signifiquen un aporte en el tratamiento y prevención de patologías ligadas a la oxidación de moléculas biológicas. Tras la actividad de un extracto vegetal existe una serie de principios activos (Pastene *et al.*, 2001; Jirovetz *et al.*, 2006).

Para evaluar la actividad antioxidante se prepararon extractos acuosos y metanólicos a partir de los cinco tratamientos de las semillas tiernas y maduras (T1 a T5). En los extractos acuosos se observa una mayor actividad antioxidante en la semilla tierna cocida (T2) comparada con los otros extractos y contra dos compuestos que se utilizan comercialmente en el caso de alimentos que fueron el BHA y n-propil galato. Para el BHA se observa mayor actividad del T2 ya que se tuvo que utilizar una mayor cantidad del compuesto para obtener una actividad equivalente a la del extracto, sin embargo, en el caso del n-propil galato este presenta una mayor actividad comparado con el T2 ya que se utilizó una menor cantidad del compuesto para obtener resultados similares. El efecto del T2 puede ser debido a que en la preparación de este tratamiento el cocimiento se lleva a cabo en agua hirviendo y se coloca la semilla completa con vaina y testa, esto puede provocar que los compuestos migren hacia los cotiledones ya que son compuestos solubles en agua aumentando así la actividad.

Para los extractos metanólicos se observan resultados similares que para los extractos acuosos, solo que en este caso la actividad antioxidante es mayor, esto puede ser debido al tipo de compuestos que se encuentran presentes en cada uno de los diferentes extractos.

Se ha reportado que el aceite esencial de las hojas de clavo (*Eugenia caryophyllus*) presentan una actividad antioxidante mayor que eugenol, BHA y BHT (Jirovetz *et al.*, 2006).

7.4 Actividad antibiótico

En la actualidad el uso indiscriminado de antibióticos ha permitido que los microorganismos desarrollen resistencia a los mismos, principalmente bacterias, (Russell, 2002) por lo que ha sido necesario recurrir a las plantas para utilizarlas como alternativa en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y provocar menor cantidad de efectos secundarios en los pacientes, aunque su uso está limitado en programas de salud debido a su baja actividad y usualmente son clasificados como antimicrobiales aquellos que su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se encuentra en el rango de 100 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque una CMI típica de antibióticos contra bacterias y hongos se encuentran en el rango de 0.01 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tegos *et al.* (2002), este hecho es importante para los resultados obtenidos en el presente estudio.

El aislamiento y evaluación de agentes antimicrobianos de plantas, particularmente de las semillas de *Ebenopsis ebano*, puede permitir descubrir antibióticos naturales para los cuales bacterias y otros microorganismos pueden ser susceptibles. Las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional ya que contienen compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades crónicas e infecciosas (Diallo *et al.*, 1999). De los compuestos presentes tales como alcaloides, flavonoides, taninos y compuestos polifenólicos, entre otros Edeoga *et al.* (2005). Los compuestos polifenólicos han sido reconocidos por ser efectivos contra virus, bacterias y hongos (Cowan, 1999; Murphy, 1999; Marangoni *et al.*, 1988). Estos compuestos además han demostrado presentar propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (D'Alessandro *et al.*, 2003; Kim y Lee, 2004; Arts y Hollman, 2005; Lambert *et al.*, 2005).

En este estudio, se encuentran presentes diferentes niveles de ácido gálico, ácido cafeico y quercetina, tanto en los extractos acuosos como metanólicos de las semillas de *Ebenopsis ebano*, los cuales, varían en su contenido dentro de los diferentes tratamientos (T1 a T5); sin embargo, los compuestos polifenólicos muestran cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en los valores de los mismos con los grados de madurez de las semillas. Las semillas maduras tostadas comerciales (T5) se observa que presentan el mayor contenido de compuestos polifenólicos (Tablas 4 y 5), esto puede ser debido a una variedad de factores indeterminados, entre los que se puede mencionar el proceso de tostado. Sin embargo, los niveles de polifenoles que se observan en los diferentes grados de madurez y tratamientos de las semillas no están relacionados con la actividad antibiótica de los microorganismos probados;

esto es mostrado por una reducción en la actividad antibiótico encontrada en los extractos acuosos comparada con los extractos metanólicos, sin embargo, los compuestos polifenólicos son más solubles en agua que en metanol. Esta actividad sugiere que pueden estar involucrados otro tipo de compuestos diferentes a los compuestos polifenólicos de los cuales la actividad es independiente del grado de madurez de la semilla.

Actividad antitumoral e inmunoreguladora

La búsqueda de compuestos naturales con actividad antineoplásica es una de las prioridades actuales en la lucha contra el cáncer, en todos los países del mundo. El creciente empleo de la medicina verde en la prevención y cura de diferentes enfermedades ha llevado a la evaluación antitumoral de nuevos extractos de plantas, principalmente pertenecientes a la flora autóctona de cada país. Las plantas presentan una composición muy variada en su estructura y de ellas son diversos los compuestos activos que manifiestan efecto antitumoral. Por estas razones la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas continúa siendo una tarea de interés en la obtención de mecanismos novedosos de actividad antitumoral. En los últimos años se ha generado una intensa búsqueda de nuevos agentes antitumorales de diversas fuentes de origen, entre ellas, de la flora autóctona. Las plantas han sido fuente de medicamentos de amplio uso en la quimioterapia del cáncer (Colom *et al.*, 2005).

Estudios realizados con *Calendula officinalis* de la familia *Asteraceae* mostraron actividad citotóxica y antitumoral e inmunomoduladora, mismas que fueron detectadas para *Ebenopsis ebano* (Jiménez-Medina *et al.*, 2006). Un nuevo extracto de la planta *Calendula officinalis* produce in vitro un efecto dual: actividad citotóxica antitumoral y activación de linfocitos (Jiménez-Medina *et al.*, 2006).

Las cumarinas y otros compuestos relacionados presentan actividades biológicas de importancia terapéutica, entre las cuales destaca su efecto antitumoral para las cuales se utilizaron concentraciones inferiores a las del presente estudio reportando actividad antitumoral, sin embargo la sensibilidad entre las distintas líneas celulares fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición (López *et al.*, 1998).

Estudios realizados en *Spirulina (Arthrospira)* mostraron que presentan actividades biológicas entre ellas antitumoral. Para probar el efecto antitumoral la spirulina fue administrada directamente en ratones en concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/kg por vía oral, presentando una tendencia a una mayor supervivencia, hecho que fue significativo a la dosis superior (Chamorro *et al.*, 2002).

Los macrófagos juegan un papel central en la modulación de la inmunidad humoral y celular en contra de enfermedades infecciosas y del cáncer. Las funciones inmunomoduladoras del macrófago dependen de su activación por señales de sensibilización, provistas principalmente por citocinas, tales como el interferón-gamma (IFN- γ) y por señales de activación como el lipopolisacárido (LPS). Los macrófagos activados producen mediadores de citotoxicidad, tales como el óxido nítrico y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), los cuales protegen al organismo

en contra del desarrollo de infecciones y tumores. Por su parte, los linfocitos T responden al reto antigénico, mediante la proliferación y expansión de las clonas de linfocitos específicos de antígeno, para amplificar las respuestas inmunes. Se puede estudiar la actividad funcional de las células T mediante el uso de mitógenos policlonales como la concanavalina A (Con A) y la fitohemaglutinina (PHA), los cuales se unen a ciertos residuos de azúcares presentes en las glucoproteínas de superficie en estas células, incluyendo el receptor de antígenos de las células T y la proteína CD3, estimulando la respuesta proliferativa de los linfocitos T (Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Para los extractos acuosos y metanólicos de las semillas de *Ebenopsis ebano* se observa que presentan inhibición del crecimiento contra las células tumorales (L5178Y-R), sin embargo, también se observa que presentan inhibición del crecimiento contra células normales de timo y bazo.

Al comparar el efecto de los extractos acuosos (T1 a T5) sobre las células de la línea tumoral y los linfocitos de timo y bazo estadísticamente se observa una diferencia entre las células tumorales y timo y bazo, sin embargo, en las células maduras (T3 a T5) la inhibición del crecimiento se observa más marcado sobre las células tumorales que sobre las células sanas de timo y bazo. En el caso de T5 la diferencia entre el efecto de la inhibición del crecimiento entre las células tumorales y las células sanas es mayor y al relacionar este comportamiento con el contenido de compuestos polifenólicos del extracto acuoso se observa que para este tratamiento el contenido de ácido ferúlico, ácido cafeico y quercetina es mayor comparado con los otros tratamientos, por lo que la inhibición puede ser debida a la presencia de estos

compuestos. Para T1 este comportamiento no se observa muy definida la inhibición, inclusive la inhibición es mayor para las células sanas que para las tumorales.

En el caso de los extractos metanólicos el comportamiento de los extractos T1 a T5 no presenta una regularidad en el efecto de la inhibición del crecimiento estadísticamente, ya que para un mismo tratamiento a diferentes concentraciones para algunos casos la inhibición es mayor para las células tumorales y en otros casos para las células sanas de timo y bazo.

Con relación al efecto de los extractos acuosos de las semillas de *Ebenopsis ebano* (T1 a T5) se observa que estos presentan inhibición del crecimiento en los tratamientos T1 a T4, mientras que en el caso del T5 se observa proliferación de las células, esto puede ser debido a la presencia de cierto tipo de compuestos que se generan durante el tostado de las semillas.

En los extractos metanólicos a diferencia de los extractos acuosos solo se observa inhibición del crecimiento a las concentraciones de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a las concentraciones de 3.9 a 31.2 $\mu\text{g/mL}$ se observa proliferación de las células para todos los tratamientos.

Para nuestro reconocimiento, este es el primer reporte que muestra que los extractos crudos de la semilla de *Ebenopsis ebano* inhibe el crecimiento de bacterias y levaduras. Existe un gran número de plantas para ser evaluadas a nivel molecular, celular y fisiológico por su potencial para el tratamiento de las enfermedades humanas. Este estudio permite realizar futuros estudios para evaluar y caracterizar

los compuestos activos de los extractos de las semillas de *Ebenopsis ebano in vivo* e *in vitro* que puedan presentar diferentes actividades biológicas.

8. CONCLUSIONES

El consumo de leguminosas representa una fuente de alimentación importante dado su bajo costo, además de ser la fuente más importante de energía, así como fuente de proteínas. La semilla tierna cocida contiene 48.47% de proteína, un valor alto y comparable al de la soya.

La semilla tierna cocida es la que presenta un mayor contenido de ácido ferúlico expresado en g/L comparada con los otros tratamientos que se probaron tanto en los extractos acuosos como metanólicos, observándose la misma proporción de compuestos en ambos extractos en los tratamientos.

Los compuestos evaluados de acuerdo al grado de polimerización en ambos extractos se expresan divididos en cuatro grupos: a) derivados del ácido benzoico (ácido gálico), b) derivados de ésteres tartáricos (ácido cafeico), c) derivados de flavonoides (quercetina) y d) derivados de antocianinas (malvidin-3-glucósido). Se observa que tanto en los extractos acuosos como los metanólicos si se comparan como grupos de compuestos los que predominan son los derivados de los ésteres tartáricos, no observándose la presencia de los derivados de las antocianinas en ninguno de los dos casos.

Al comparar el contenido de compuestos entre tratamientos, se observa que en la semilla madura tostada comercial es donde se presenta un mayor contenido de los diferentes compuestos polifenólicos, no observándose una regularidad de la distribución de los compuestos en los otros tratamientos, para los diferentes compuestos.

Se observa que tanto los extractos acuosos como los metanólicos crudos de los diferentes tratamientos de la semilla de *Ebenopsis ebano*, presentan actividad antioxidante; sin embargo, ésta es mayor en el caso de las semillas tiernas cocidas y comparable con la del BHA, el cual es un antioxidante que se utiliza comercialmente. Al comparar los diferentes extractos acuosos entre sí se observa la mayor actividad antioxidante además de la semilla tierna cocida, la semilla tierna y madura cruda presentan los valores mayores, no así para los tratamientos de la semilla madura. En el caso de los tratamientos acuosos no se observa regularidad en los valores de la actividad antioxidante, y tiende a ser hasta en un 30% menor comparada con el BHA para la semilla tierna cruda y la semilla madura tostada comercial.

En lo que respecta a la actividad antibiótico contra *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans* para los extractos acuosos, se observa que presenta mayor actividad la semilla madura tostada comercial contra *E. coli* y *Salmonella*, seguido de los tratamientos de la semilla madura, tanto cruda como tostada, observándose los valores más bajos para las semillas tiernas. En los extractos acuosos, estadísticamente no se observa actividad contra *C. albicans*. En el caso de los extractos metanólicos la mayor actividad se presenta contra *C. albicans*, muy similar entre todos los tratamientos, seguida esta actividad contra *E. coli* y en más bajo

porcentaje contra *Salmonella*. Relacionando el contenido de compuestos polifenólicos de los extractos crudos, tanto acuosos como metanólicos con la actividad antibiótica se observa relación entre la semilla madura comercial y la actividad contra los tres microorganismos probados, no así, para los demás tratamientos ya que no se observa regularidad en el contenido de polifenoles y la actividad antibiótica.

Al evaluar la actividad antitumoral e inmunorreguladora en los diferentes extractos acuosos y metanólicos contra las células tumorales, linfocitos de timo, bazo y macrófagos peritoneales, se observa que para los extractos acuosos la inhibición del crecimiento se presenta más marcada contra las células tumorales que contra las células sanas de timo y bazo en el caso de las semillas maduras comerciales, este mismo comportamiento se observa para los demás tratamientos, excepto para las semillas tiernas crudas, donde la inhibición es mayor para las células sanas, además, para los diferentes tratamientos de las semillas se presenta la proliferación de macrófagos peritoneales, así como la producción de óxido nítrico, excepto para el tratamiento de la semilla madura tostada comercial. En el caso de los extractos metanólicos, el comportamiento de los extractos frente a las células es diferente con relación a los extractos acuosos, ya que se observa mayor inhibición del crecimiento frente a las células sanas que contra las células tumorales probadas. En el caso de los extractos metanólicos contra los macrófagos peritoneales a las concentraciones más altas probados de los extractos se presenta un aumento en la inhibición del crecimiento de los macrófagos, no observándose así la producción de óxido nítrico.

LITERATURA CITADA

- Abdullaev F, Caballero-Ortega H, Riveron-Negrete L, Pereda Miranda R, Rivera-Luna R, Hernández JM, Pérez López I, Espinoza-Aguirre JJ. 2002. Evaluación *in vitro* del potencial quimipreventivo del azafrán. *Revista de Investigación Clínica* 54(5):430-436.
- Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ. 1996. Phenolic content of various beverages determine the extent of inhibition of serum and low-density lipoprotein oxidation *in vitro*: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science* 91:449-458.
- Adrian J, Potus J, Poiffait A. 2000. Análisis nutricional de los alimentos. Editorial Acibia. Zaragoza, España. p. 1.
- Akerele O. 1988. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. *Fitoterapia* 59:355-363.
- Ali-Shtayed M, Yaghmour R, Faid Y, Salem K, Al-Nuri M. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 60:265-271.G
- Anónimo. 1991. Reunión Anual de la Red Iberoamericana de Productos Naturales de uso Medicinal. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Sao Paulo, Brasil pp. 15-19.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. USA.
- Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1):317S-325S.
- Asamy DK, Hong Y, Barrett DM, Mitchell A. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(5):1237-1241.
- ATCC. 1994. Cell lines and hybridomas. 8th Edition. American Type Culture Collection. pp. 152-335.
- Barousse M, Espinosa T, Dunlap K, Fidel P. 2005. Vaginal epithelial cell anti-*Candida albicans* activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. *Infection and Immunity* 73(11):7765-7767

Bäumler AJ. 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends in Microbiology 5(8):318-322.

Bonner F. *Pitecellobium dulce* (Roxb.) Benth.
<http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Pitecellobium.pdf>

Bonner, F. *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby & Grimes.
<http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Ebenopsis.pdf>

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. Nutritional Review 56:317-333.

Cabrera J, Cárdenas M. 2006 Importancia de la fibra dietética para la nutrición humana. Revista Cubana Salud Pública 32(4):0-0.

Cabrita, M, Da-Silva JR, Laureano O. 2003. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. Memorias I Seminario Internacional de Vitivinicultura. 24 y 25 de Septiembre de 2003. Disponible en el sitio de red:
<http://www.isa.utl.pt/riav/Pdf/Memoria>.

Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against Enterobacteria. Journal of Ethnopharmacology 30:55-73.

Caldú P, Hurtado I, Fiol C. 1996. White wine reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidaton. American Journal Clinical Nutrition 63:403.

Carando S, Teissedre PL, Pascual-Martínez L, Cabanis JC. 1999. Leveles of flavan-3-ols in french wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(10):4161-4166.

Cardoso ML, Álvarez MA, Aguirre MV, Brandan W, Lucas GV. 2005. Evaluación *in vitro* de la acción del formocresol sobre la actividad fagocitaria, necrosis y apoptosis en macrófagos murinos. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/3-Medicina/M-000.htm>. Universidad Nacional de Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen M-031.

Carreras N, Rosales JA, Vázquez G, Vázquez MS. 2005. Tipificación metabólica y genéticomolecular de *Escherichia coli* diarreagénica 1:0-0

Chamorro G, Salazar M, Gomes de Lima K, Pereira C, Ceballos G, Fabila L. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (Arthrospira), un alimento no convencional. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52(3):232-240.

Charley H. 2001. Tecnología de Alimentos. Editorial Limusa. México, DF. pp. 623-624.

Colom Y, Azcue M, Pérez R, Respall M, Ruiz R, Quesada W. 2005. Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la leucemia linfocítica P-388. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 10(2):0-0

Correl DS, Johnston MC. 1970. Manual of vascular plants of Texas. Texas Research Foundation. Renner Texas, USA. p. 769.

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564-582.

D'Alessandro T, Prasain J, Benton MR, Botting N, Moore R, Darley-Usmar V, Patel R, Barnes S. 2003. Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils. *Journal of Nutrition* 133:3773S-3777S.

Da Porto C, Calligaris S, Celotti E, Nicoli MC. 2000. Antiradical properties of commercial cognacs, assessed by the DPPH test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4241-4245.

Darwin KH and Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Review* 12(3):405-428.

Dávila M, Sangronis E, Granito M. 2003. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 53(4):348-354.

Daymi-Pineda A, Salucci M, Lázaro R, Madani G, Ferro-Luzzi A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 13(2):104-111.

De los Ríos C, Hidalgo D, Quintero M, Marques G, Crescente O. 1999. Estudio preliminar *in vitro* de la actividad biológica de *Chromolaena voglii* (Robinson) H. Huber. *Revista de la Facultad de Farmacia* 36:22-25.

Desrosier NW. 1997. Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial Continental SA de CV. México, pp 72-73.

Diallo D, Hveem B, Mahmoud MA, Betge G, Paulsen BS, Maiga A. 1999. An ethnobotanical survey of herbal drugs of Gourma District, Mali. *Pharmaceutical Biology* 37:80-91.

DIFCO Supplementary Literatura. 1977. DIFCO Laboratorios, Detroit, Michigan, USA.

Dimayuga R, García S. 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacol* 31:181-182.

Disegna E, Boido E, Carrau F, Fariña L, Medina K, Méndez M, Rodríguez P, Dellacassa E. 2003. Efectos de la aplicación del regulador de crecimiento 3,5-dioxo-4-propionilciclohexancarboxilato de calcio (BAS 125) en la producción de uvas, composición del vino y aroma del cv. "Tanta". In: XIII Jornadas Groupe DÉtude de Systemes de Conduite de la Vigne. Montevideo. Libro de Actas. pp. 51-55.

Duyff RL. 1998. The American Dietetic Association's. Complete Food and Nutrition Guide. Minnesota: Chronimed Publishing. Disponible en el sitio de red: <http://www.nwcherries.com/health.html>

Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology 4:685-688.

Estrada AE, Marroquín JS. 1992. Leguminosas en el centro-sur de Nuevo León. Reporte Científico Especial No. 10. Facultad de Ciencias Forestales, UANL. Linares, NL, México. p. 71.

Estrada-López F. 1995. Pruebas de germinación y desarrollo temprano del ébano, (*Phitecellobium fexicaule* Benth.) Coult y su respuesta al establecimiento en el suelo de tres municipios del estado de Nuevo León, México. Tesis (Licenciatura) Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. Bulletin World Health Organization 63:965-981.

Farnsworth NR, Akerel O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. 1989. Las plantas medicinales en la terapéutica. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 107:314-329.

Felker P, Bandurski R. 1979. Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. Economic Botany 33(2):162.

Ferruzzi MG, Böhm V, Courtney PD, Schwartz SJ. 2002. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. Journal of Food Science 67(7):2589-2595.

Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedere PL. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Journal Agricultural Food Chemistry 43:890-894.

Giral F, Sotelo A, Lucas B, De la Vega A. 1978. Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds quart. Journal of Crude Drug Research 16(3):143-149.

Gislene G, Nascimento F, Locatelli J, Freitas P, Silva G. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 31(4): 247-256.

Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Metha RT. 1995. Determination of MIC's for *Mycobacterium avium-M intracellulare complex* in liquid medium by a colorimetric method. Journal of Clinical Microbiology 33:1842-1846.

González-Quijada MR. 1999. Caracterización físicoquímica y valoración nutricional y funcional de un aislado proteico obtenido de la semilla de ébano *Pithecellobium flexicaule* (Beth.). Tesis (Doctorado) Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

González-Sánchez A. 1985. Colección y caracterización de germoplasma de algunas leguminosas forrajeras existentes en la región semiárida del noreste de México. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Guerra M, Vega R, Martínez R, Méndez R, Gutiérrez A, Guerra I. 2004. Actividad antimicrobiana y toxicidad de un extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 9(1):0-0.

Hernández-Ángel M, Prieto EA. 1999. Plantas que contienen polifenoles, antioxidantes dentro del estilo de vida. Revista Cubana de Investigación Biomédica. 18(1):12-14.

Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal Agricultural Food Chemistry 46(10):4107-4112.

Huissain RF, Noun AME, Oliver RTD. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. Journal of Immunological Methods 160:89-96.

Hurtado I, Caldú P, Gonzalo A, Ramón JM, Mínguez S, Fiol C. 1997. El contacto del mosto con la piel de la uva durante el proceso de producción de vino blanco incrementa su capacidad antioxidante. Clinical Investigation Arterioesclerosis 9:1-8.

INEGI XII Censo General de Población y Vivienda 2000. México.

Jafarova FA, Caballero OH, Riveron NL, Hernández JM. 2002. Evaluación *in vitro* del potencial quimopreventivo del azafrán. Revista de Investigación Clínica 45(5):430-436.

Jiménez-Medina E, García-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer 6:119-132.

Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E. 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(17):6303 -6307.

Jurado E, Reid N. 1989. Influencia de factores edáficos, topográficos y perturbación sobre el matorral espinoso Tamaulipeco en Linares, NL. Reporte Científico No. 10. Facultad de Ciencias Forestales, UANL.

Karadeniz F, Burdurlu H, Koca N, Soyer Y. 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. Turkey Journal Agricultural For 29:297-303.

Katewa S, Chaudhary B, Jain A. 2004. Folk herbal medicines from tribal arca of Rajasthan, India. Journal of Ethnopharmacology 94:41-46.

Kaur Ch, Kapoor H. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – The Millenium's health. *Internacional Journal of Food Science and Technology* 36:703-725.

Kim DO, Lee CY. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and it's structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44:253-273.

Kinsella JE, Frenkel E, Germán B, Kanner J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* 4:85-89.

Kosar M, Kafkas E, Paydas S, Can Baser H. 2004. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(6):1586-1589.

Krieger M, Herz J. 1994. Structures and functions of multigand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptor and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review Biochemistry* 63:601-637.

Kwon YM and Ricke SC. 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9):3458-3463

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:284S-291S.

Lamuela –Raventós RM, Waterhouse AL. 1994. A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal Enology Viticulture* 45:1-5.

Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science* 67(5):1660-1667.

Leighton F, Urquiaga I. 1999. Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 29(2):241-254.

León R, Angulo I, Jaramillo M, Requena F, Calíbrese H. 1993. Caracterización química y valor nutricional de granos de leguminosas tropicales para la alimentación de aves. *Zootecnia Tropical* 11(2):151-170.

Loarca-Piña FG, Aparicio-Fernández X, Castaño-Tostado E, Manzano-Bonilla L. 2002. Biological activity of phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* black and white varieties. *Nutraceutical and Functional Foods II. Annual Meeting and Food Expo of Institute of Food Technologists. Anaheim, California. (Resumen).*

Licón Y, Petrovna G, Peregrina J. 2005. Estudio del efecto inmunomodulador del extracto tímico purificado T-activin en el modelo del linfoma murino. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA.* pp 319-323.

López J, García V, Aguilar D, Medina F, Cervera I, Rivera R, Mondoki J, León F, Velasco M. 1998. Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*: 11(4):261-7.

Maldonado S, Samman N. 2000. Composición química y contenido de minerales de leguminosas y cereales producidos en el noreste de Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(2):195-199.

Malone MH, Robichaud RC. 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 24:320-332.

Marangoni A, Alli A, Kermasha S. 1988. Composition and properties of seeds of the tree legume *Tamarindus indica*. *Journal of Food Science* 53(5):1452-1455.

Maxwell S, Thorpe G. 1996. Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity. *British Medical Journal* 313:229.

Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10):4009-4017.

Menendez RA, Pavón V. 1999. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 4(3):110-115.

Merino MC y Gruppi A. 2006. Origen y desarrollo de linfocitos B1 una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina* 66(2):165-172.

Meyer AS, Yi O-S, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel BN. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1638-1643.

Millemann Y. 1998. Le pouvoir pathogène des Salmonelles: facteurs de virulence et modèles d'étude. *Vet Res* 29:385-407

Murphy M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564-582.

Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31(4):247-256.

Nataro JP y Kaper JB. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review* 11:142-201

Ng I, Liu SL, Sanderson KE. 1999. Role of genomic rearrangements in producing new ribotypes of *Salmonella typhi*. *Journal of Bacteriology* 181(11):3536-3541.

Nicoli MC, Anese M, Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science Technology* 10:94-100.

Nielsen SS. 1991. Digestibility of legume proteins. *Food Technology* 45(9):112-118.

Oliveira MM, Velázquez D, Bermúdez A. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista Ciencia y Tecnología de América* 30(8):453-459.

Palacios MP, Lupiola P, Del Nero E, Pardo A, Rodríguez F, Pita ML, Tejedor MT. 1999. Primeros resultados del estudio de la presencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. Estudio de la Zona No-Saturada del Suelo. Editores R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA: Tenerife. ISBN 84-699-1258-5.

Palazón J, Cusidó RM, Morales C. 2001. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. *ACE Revista de Enología* 9:0-0

Pastene E, Wilkomirsky T, Bocaz G, Havel J, Peric I, Vega M, González M, Alderete J. 2001. Uso de espectroscopía de RMN y MALDI-TOF MS en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes de la planta medicinal Chilena *Cheilanthes glauca* (Cav.) Mett. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46(4):449-457.

Peña Martínez José, Inmunología-online. Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics (Spain), SL, ISBN 84-607-6953@Inmunología. 2003.
<http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>

Perales & Audicana. 1989. Semisolid media for isolation of *Salmonella* spp from coastal waters. *Application of Environmental Microbiology* 55(11):3032-33.

Pérez RM, Ávila AD, Edgill R, Colon Y, Quezada W, Bello JL, Panfet C. 2005. Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana* L. *Revista Cubana Plantas Medicinales* 10(3-4):0-0.

Perurena MR, Fernández CM, Martínez G, *et al.*, 2006. *Candida dubliniensis*: necesidad de establecer un diagnóstico correcto. *Revista Cubana de Biología Tropical* 58(3):0-0

Poveda M. 2005. El te verde se incorpora a los alimentos funcionales. *Diario Médico.com. Endocrinología.* www.diariomedico.com Publicado el 14/12/2005

Prada G, Soto A, Hernán O. 2005. Consumo de leguminosas en el departamento de Santander. Colombia. 2000-2003. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55(1):64-70.

Primo YE. 1998. *Química de los Alimentos.* Editorial Síntesis. Madrid, España. pp. 204, 205, 431-432.

- Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D, Velasco E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavón) Pers. Revista de la Facultad de Farmacia 42:43-46.
- Rodríguez AJ, Quesada CN, Pérez R, Ávila AD, Guzmán AM, León CG. 2004. Evaluación de la toxicidad por administración única del producto QT2B21 en ratas Sprague Dawley. Revista Cubana de las Plantas Medicinales 9(1):0-0.
- Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Revista Salud Pública de México 44(5):464-475.
- Rojas A, Hernández L, Pereda R, Mata R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extract pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 38:31-38.
- Rojas-Mendoza P. 1965. Generalidades sobre la vegetación del Estado de Nuevo León y datos acerca de su flora. Tesis (Doctorado) Facultad de Ciencias, UNAM.
- Russell AD. 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92:121S-135S.
- Rzedowsky J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México, DF. pp 59-63.
- Sáenz C, Sepúlveda E, Pak N, Pak N, Vallejos X. 2002. Uso de fibra dietética de nopal en la formulación de un polvo para flan. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52(4):387-392.
- Sanabria A, Mendoza A, Moreno A. 1998. Actividad antimicrobiana *in vitro* de angiospermas Colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 27:47-51.
- Sánchez C, Gupta M, Vásquez M, Montenegro YM. 1993. Bioensayo con *Artemia salina* para predecir la actividad antimicrobiana y farmacológica. Revista Médica Panamá 18:62-69.
- Sandberg F. 1987. The integrated natural products research in the development of plant-derived pharmaceuticals. Fitoterapia 57:309-313.
- Santos C. 2001. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. V Congreso Internacional Alimentación, Nutrición y Dietética: Sección Nutrición y Dietética p 20-26 E-mail: csb@usal.es. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid 14 al 16 de Nov de 2001.
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. 1998. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. Journal of Nutrition 128:1003-1007.
- Sheldon J, Balick M, Laird S. 1997. Medicinal plants: ¿Can utilization and conservation coexist? New York Botanical Garden. Nueva York. p. 104.

- Shih MC, Yang KT, Kuo SJ. 2002. Quality and antioxidative activity of black soybean tofu as affected by bean cultivar. *Journal of Food Science* 67:480-484.
- Shrestha P, Dhillon S. 2003. Medicinal plant density and use in the highlands of Dolakha District, Nepal. *Journal of Ethnopharmacol* 86:81-96.
- Silvestre A. 1998. *Toxicología de los Alimentos*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp. 229 y 230.
- Skeel A, Yoshimura T, Showalter S, Tanaka S, Appella E, Leonard E. 1991. Macrophage simulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *The Journal of Experimental Medicine* 173:1227-1234
- Souza V, Rocha M, Sander L, Eguiarte LE. 2001. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. *Interciencia INCI* 26(10):513-517
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Koo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol. Modification of low density-lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal Medicine* 320:915-924.
- Suárez UA, Ulate MG, Ciccio J. 1996. Efectos de la administración aguda y subaguda de extractos de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas. *Revista Biología Tropical* 44/45(3/1):39-45.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J-O, Dommès J. 2006. Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(17):6271 -6276.
- Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P, Weber R, Gómez-Flores R, Calderón C. 2001. Activación de macrófagos y linfocitos *in vitro* por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*. *Revista Ciencia UANL* 4(3):0-0.
- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(10):3133-3141.
- Turner BL. 1959. *The legumes of Texas (Leg Tex)*. University of Texas, Press. Austin. pp. 284.
- Urquiaga I, Leighton, F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research* 33(2):55-64.
- Valle P, Lucas FB. 2000. *Toxicología de Alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. México, DF.
- Vila H, Catania C, Ojeda H. 2005. Efecto del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec de Argentina. X Congreso Brasileiro de Viticultura e Enología. 7-11 noviembre de 2005. pp. 115-124

Vinson JA, Hontz BA. 1995. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:401-403.

Vires RA. 1986. *Trees, shrubs and woods vines of the southwest*. University Texas Press. Austin, Texas. p 514.

Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby CL. 2002. Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science* 67(7):2600-2603.

Walker S. 1999. *Microbiología*. Mc Graw Hill, Interamericana, México.

Wenzel E y Lajolo F. 2000. Contenido en fibra dietética y almidón resistente en alimentos y productos iberoamericanos. Editorial Docuprint. pp 26-28

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Halee A. 1995. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry* 41:32-35.

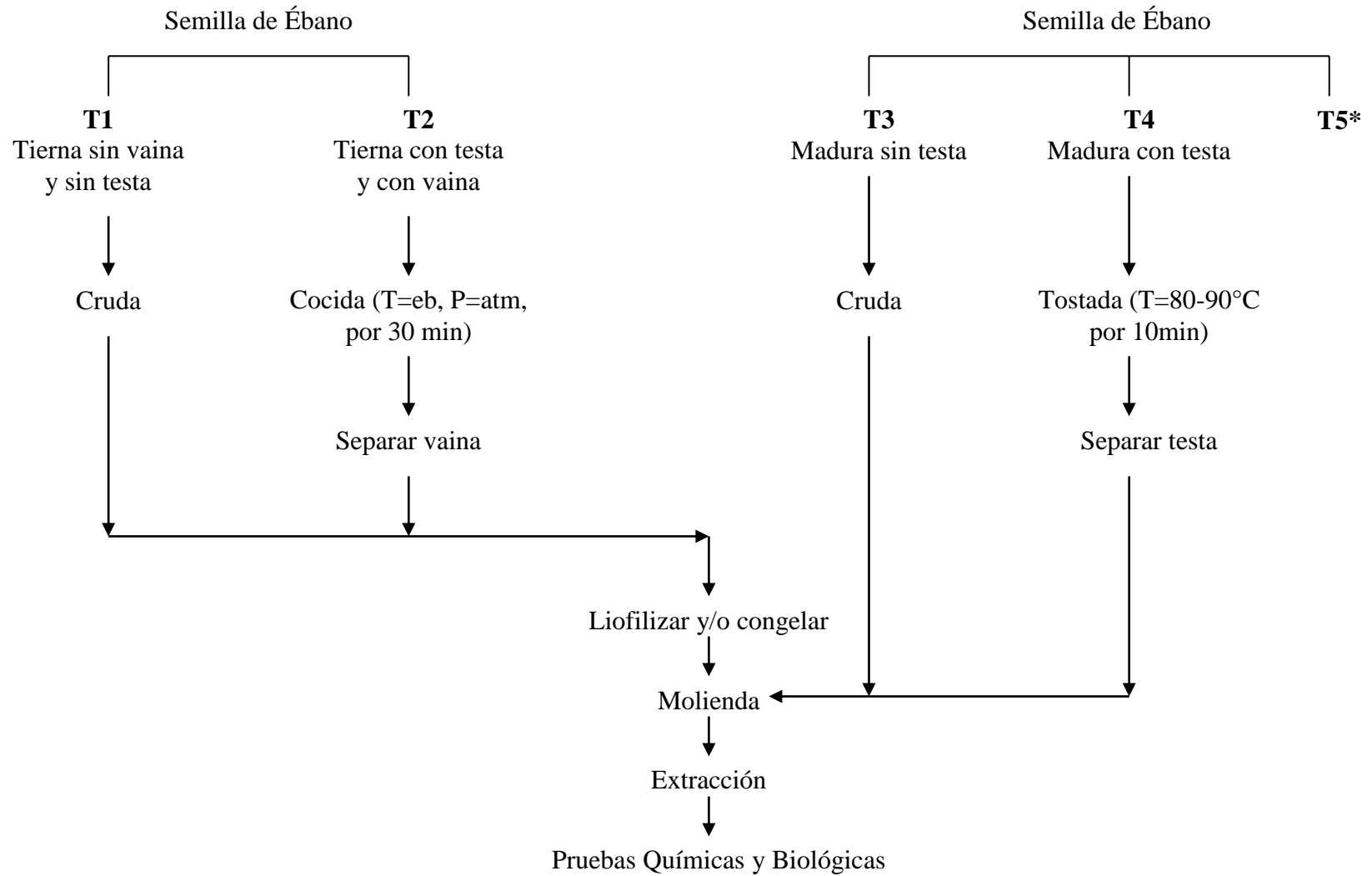
Worley MJ, Ching K, Heffron F. 2000. *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular Microbiology* 36(3):749-761.

Wray C. 1985. Is salmonellosis still a serious problem in veterinary practice?. *Veterinary Record* 116:485-489.

Zang YC, Halder JB, Sarnanta AK, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. 2002. Regulatory effects of estriol 011 TCell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF-kappa B. *Neuroimmunology* 4:106-114.

Zárate R, Gorriti A, Lobatón M, Jurado B. 1999. Estudio farmacognóstico de *Werneria apiculata* y *Werneria marcida* s.f. Blake. *Ciencia e Investigación* 2(2):0-0.

APÉNDICE A. Diagrama de Flujo



*T5 Semilla Madura (Adquirida en el mercado local)

T1, T2 = Tratamiento Semilla Tierna

T3, T4= Tratamiento Semilla Madura

APENDICE B: Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuoso y metanólico) entre microorganismos.

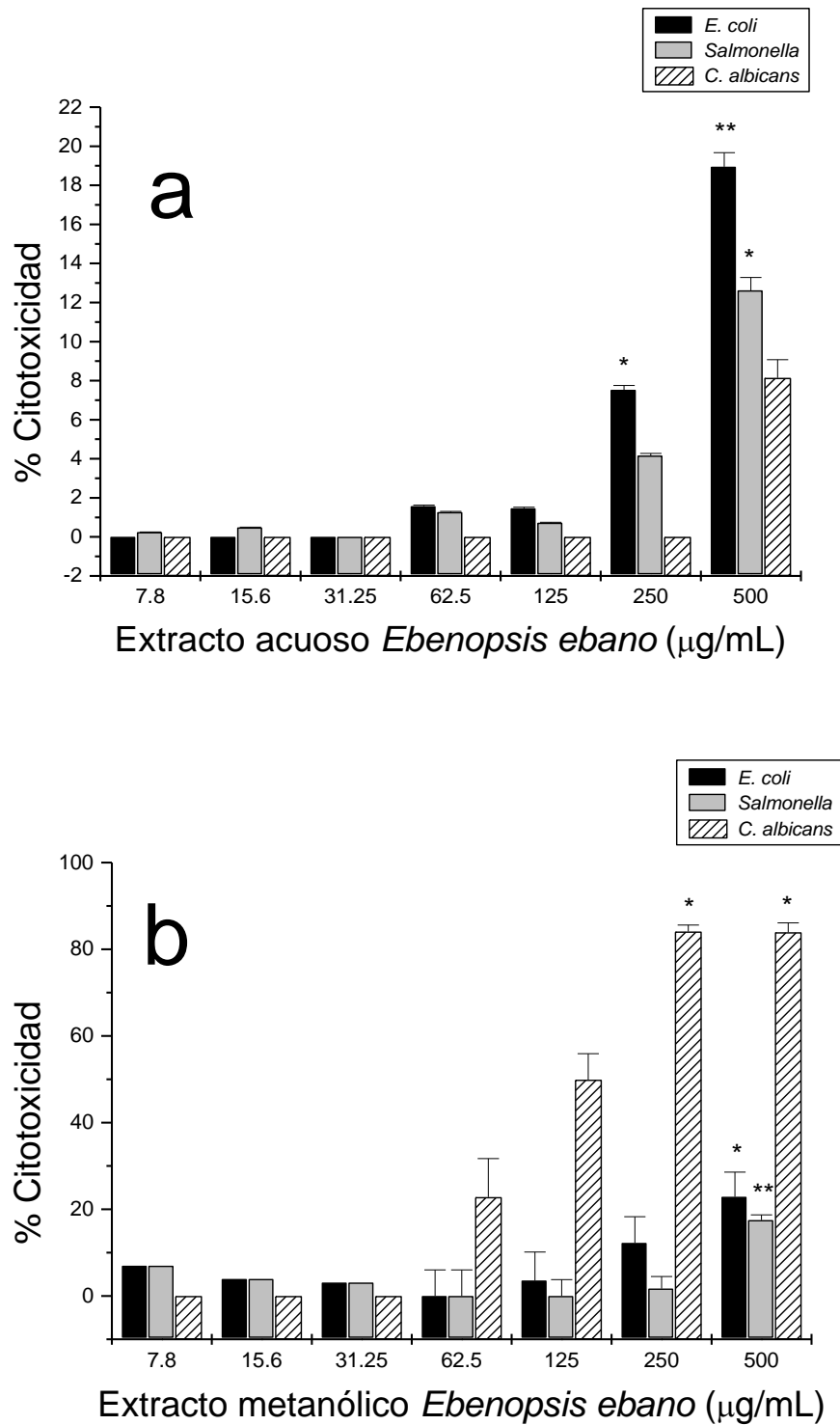


Fig. 61. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans*

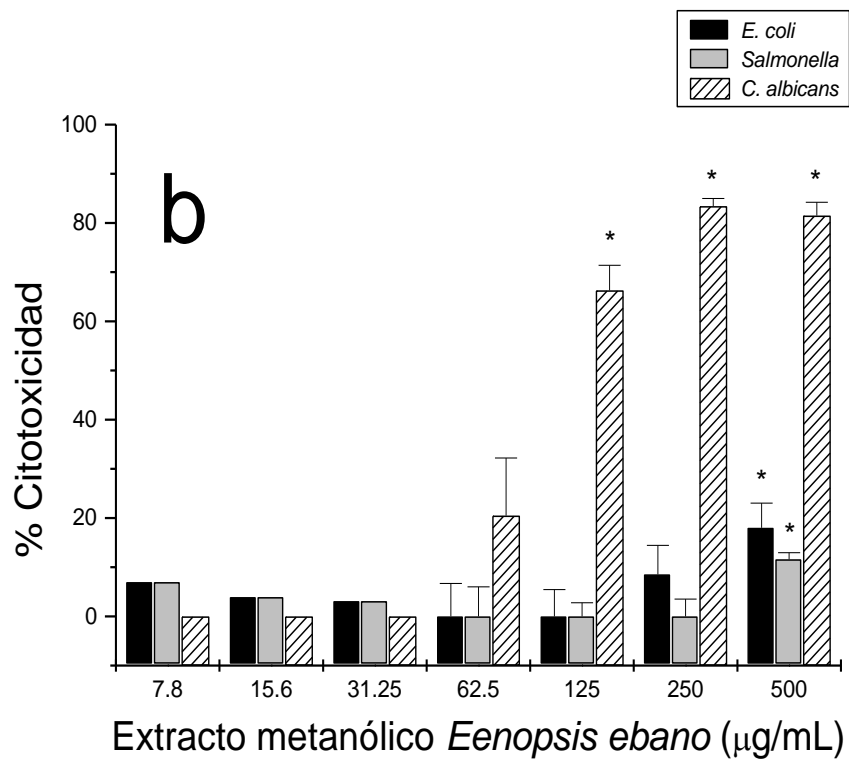
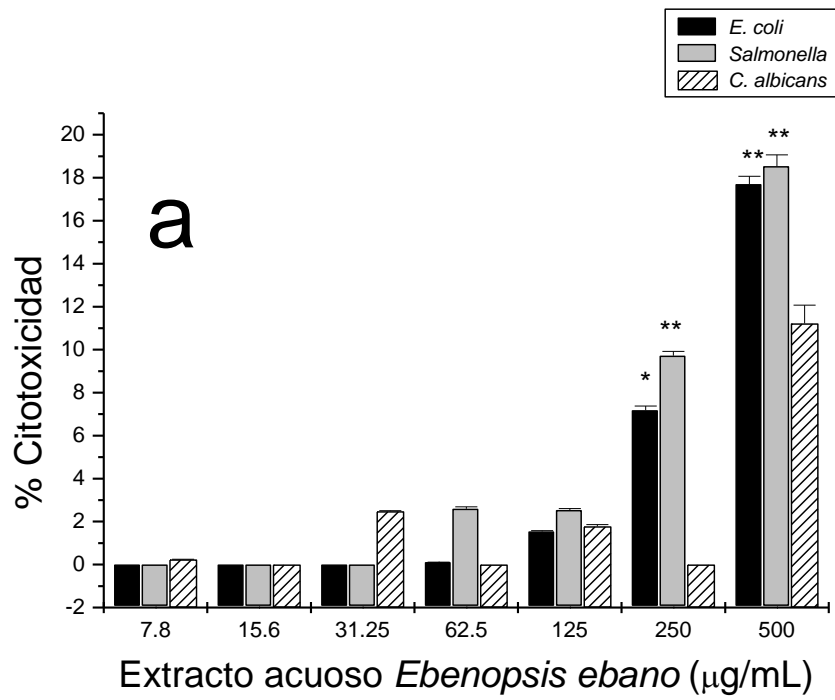


Fig. 62. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans*

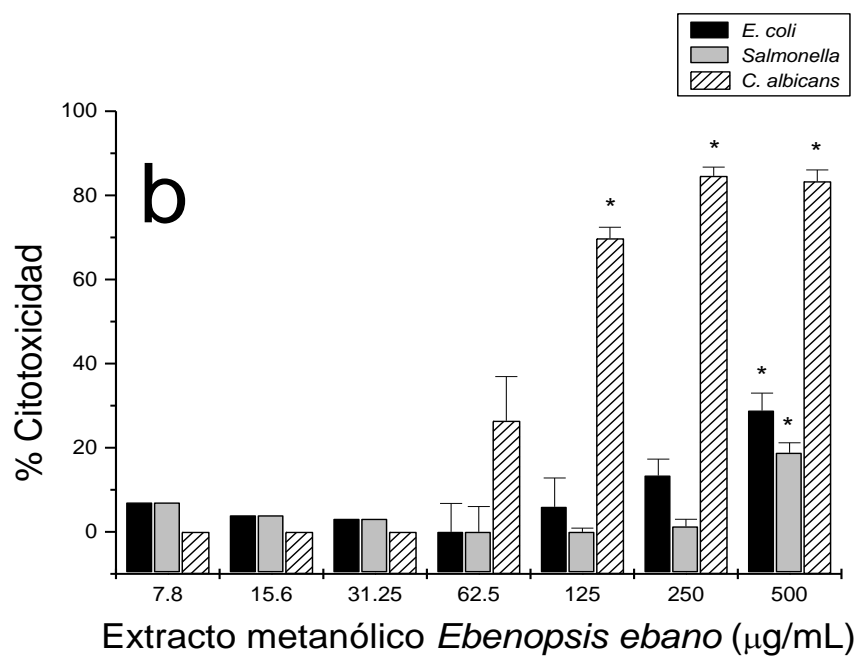
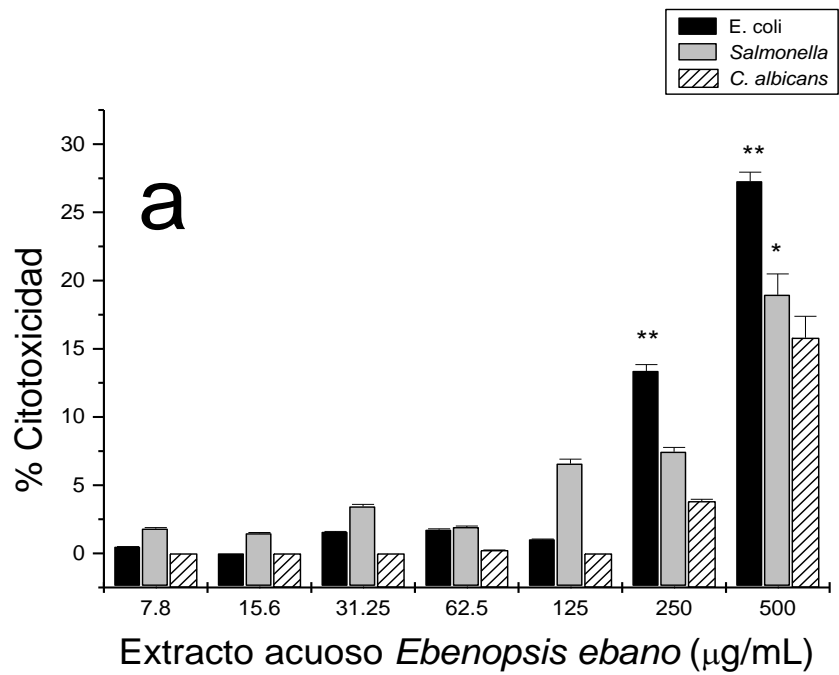


Fig. 63. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans*

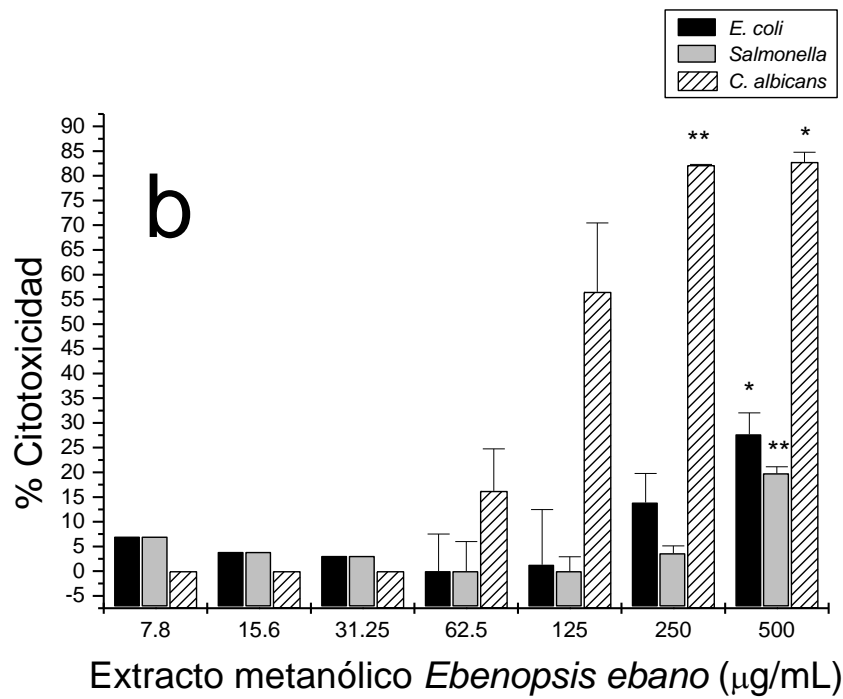
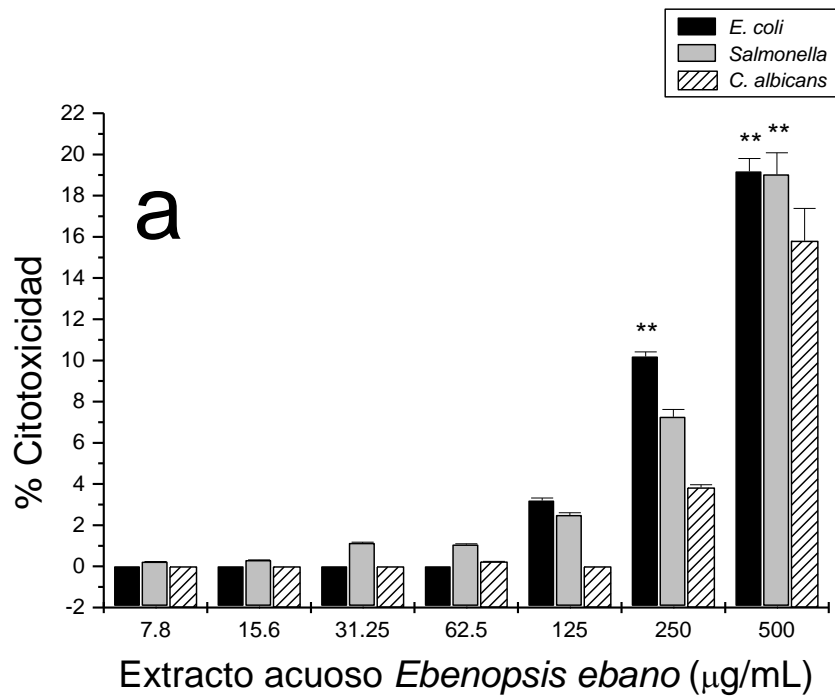


Fig. 64. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans*

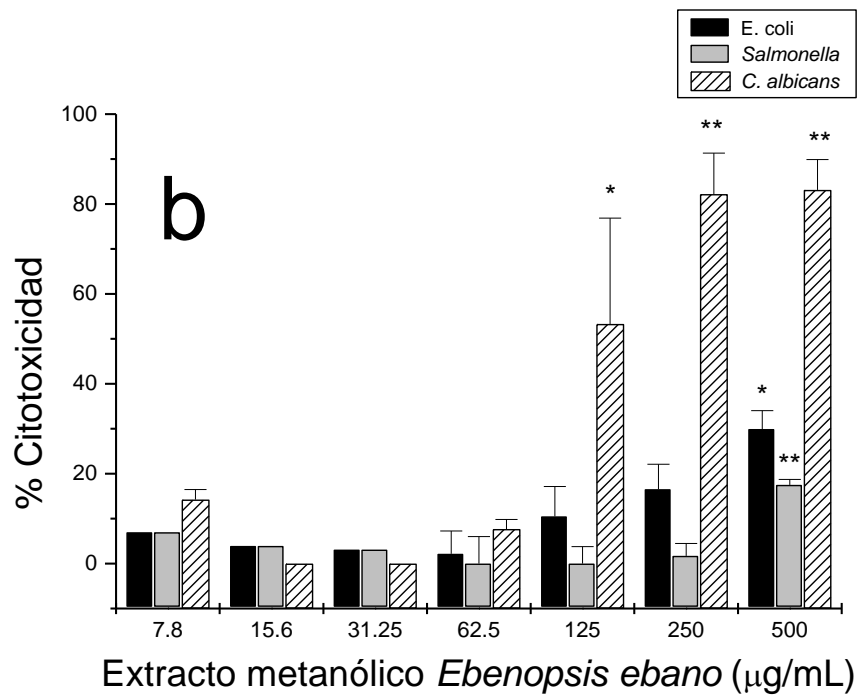
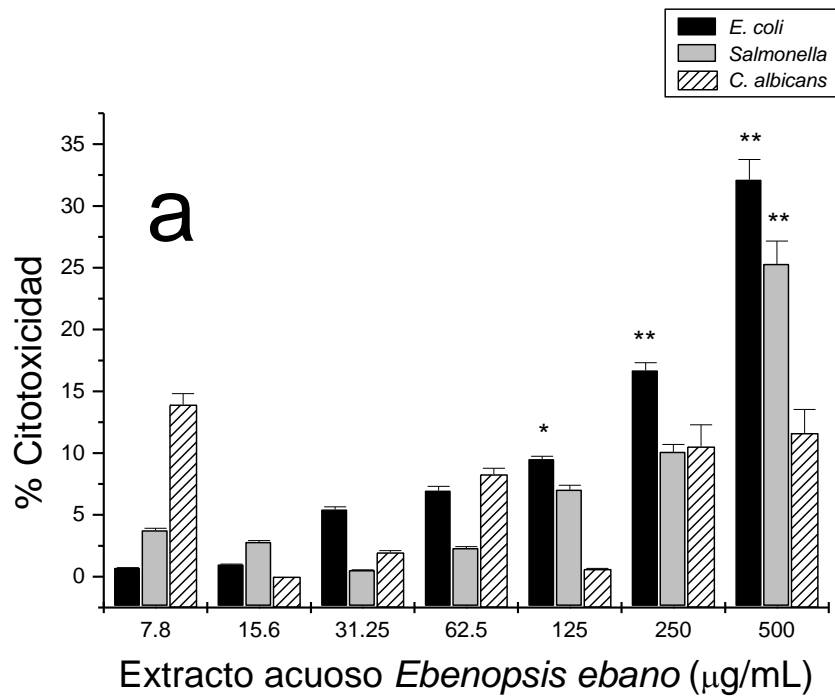


Fig. 65. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* y *C. albicans*

APENDICE C: Figuras comparativas para cada tratamiento (T1 a T5) y extractos (acuoso y metanólico) entre células

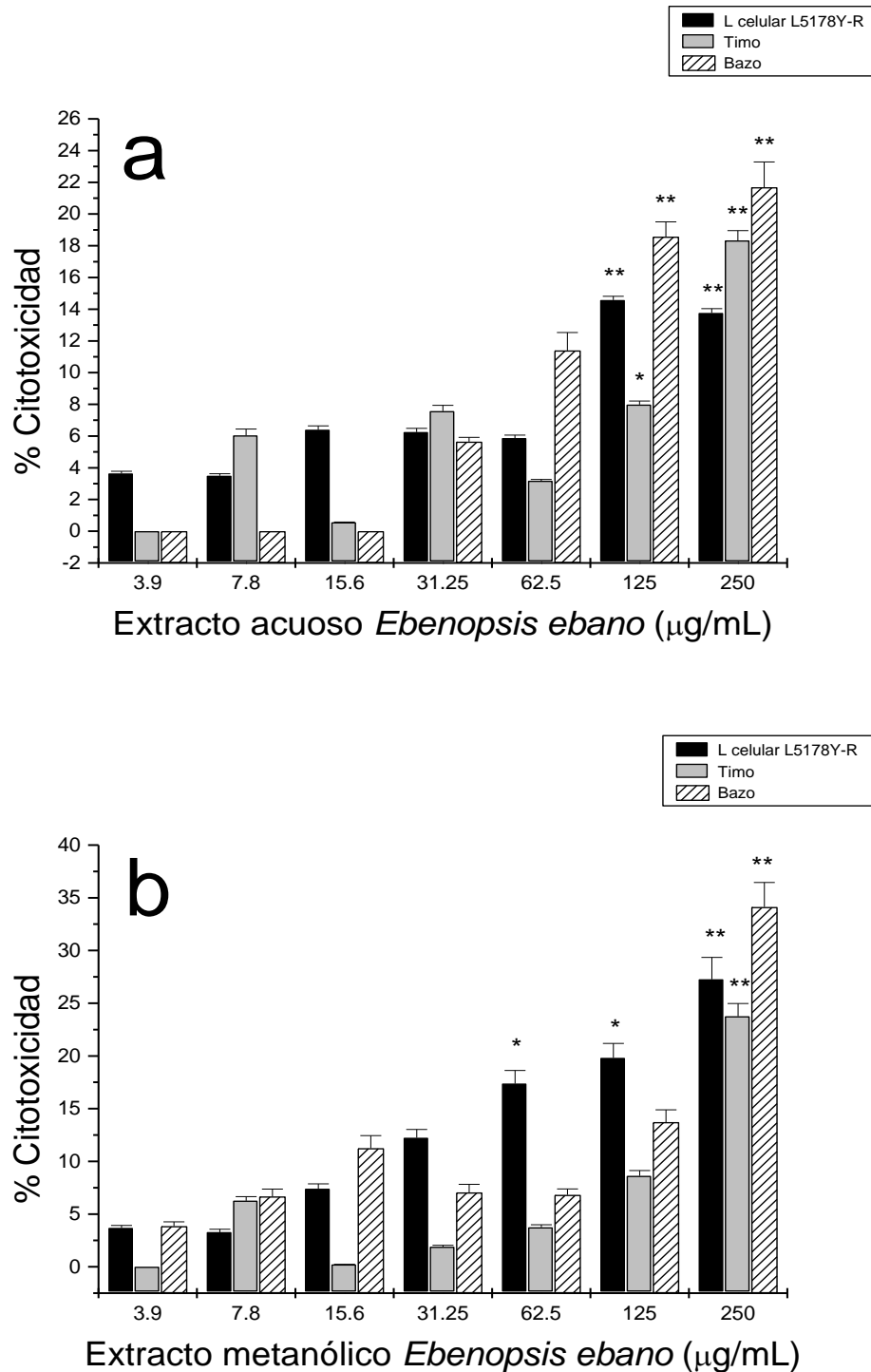


Fig. 66. Efecto de los extractos crudos T1 sobre el crecimiento de L. celular, linfocitos de timo y bazo

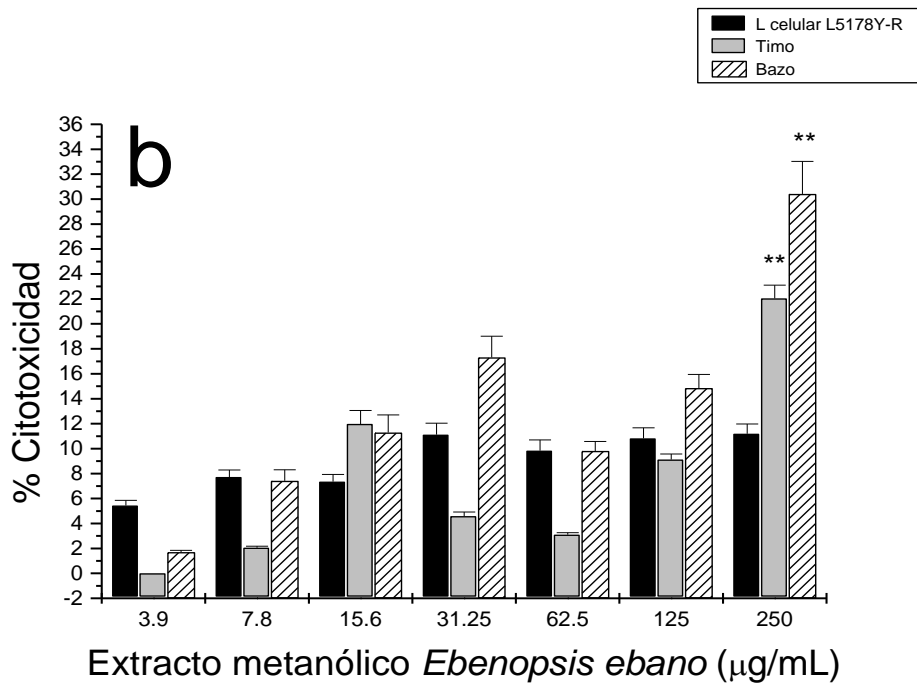
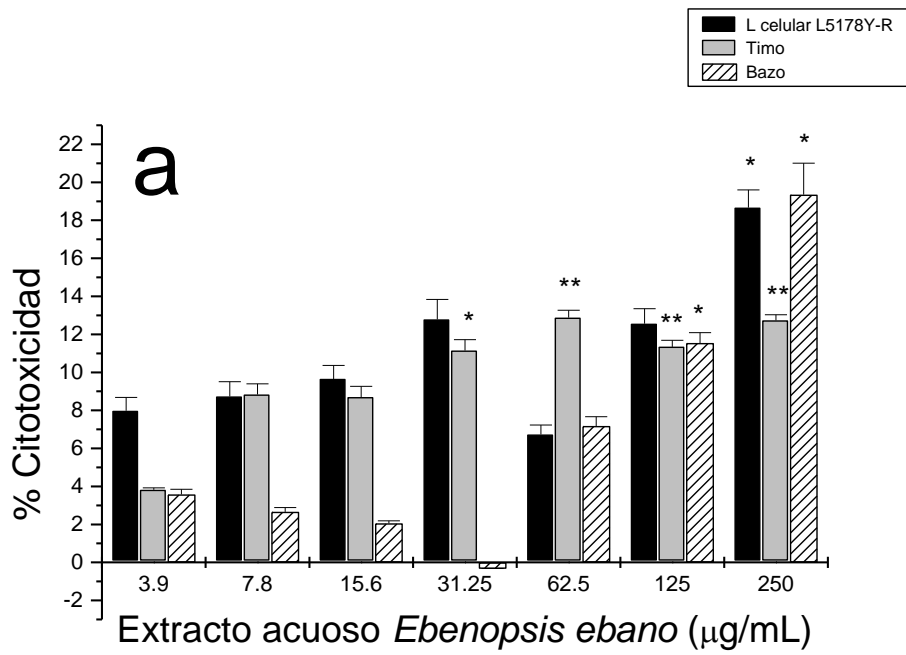


Fig. 67. Efecto de los extractos crudos T2 sobre el crecimiento de L. celular, linfocitos de tímo y bazo

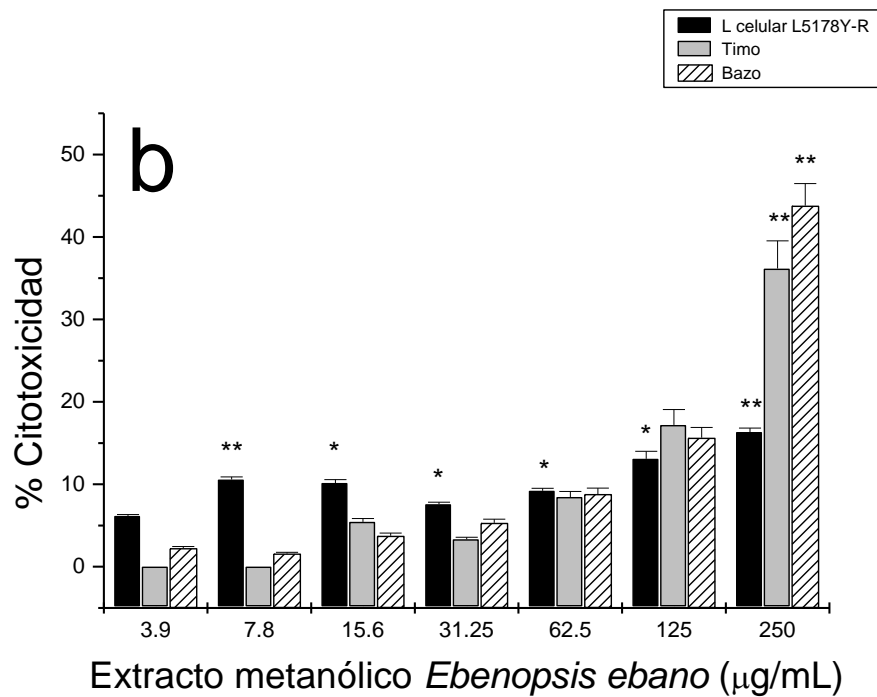
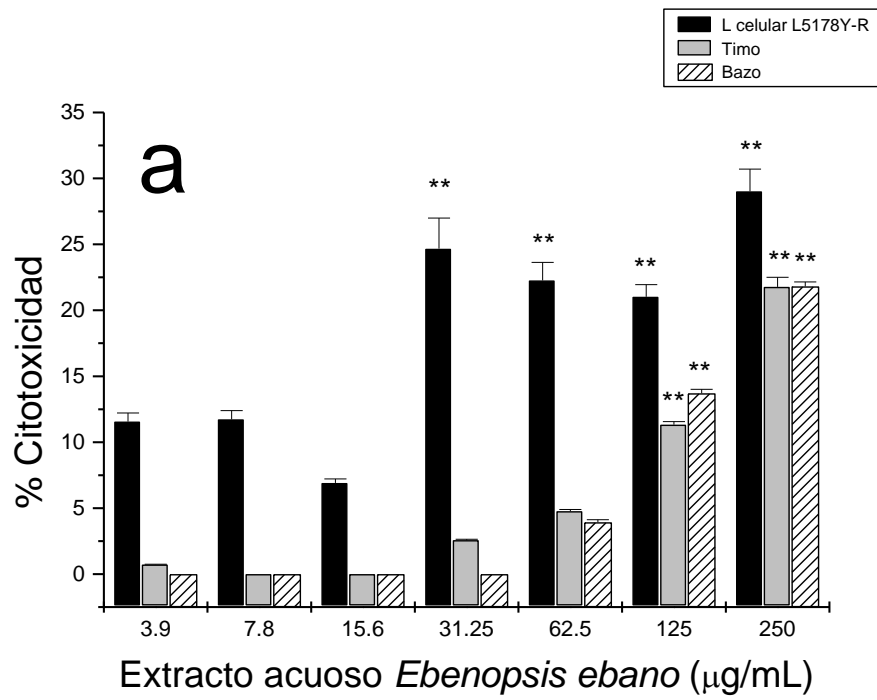


Fig. 68. Efecto de los extractos crudos T3 sobre el crecimiento de L. celular, linfocitos de tímo y bazo

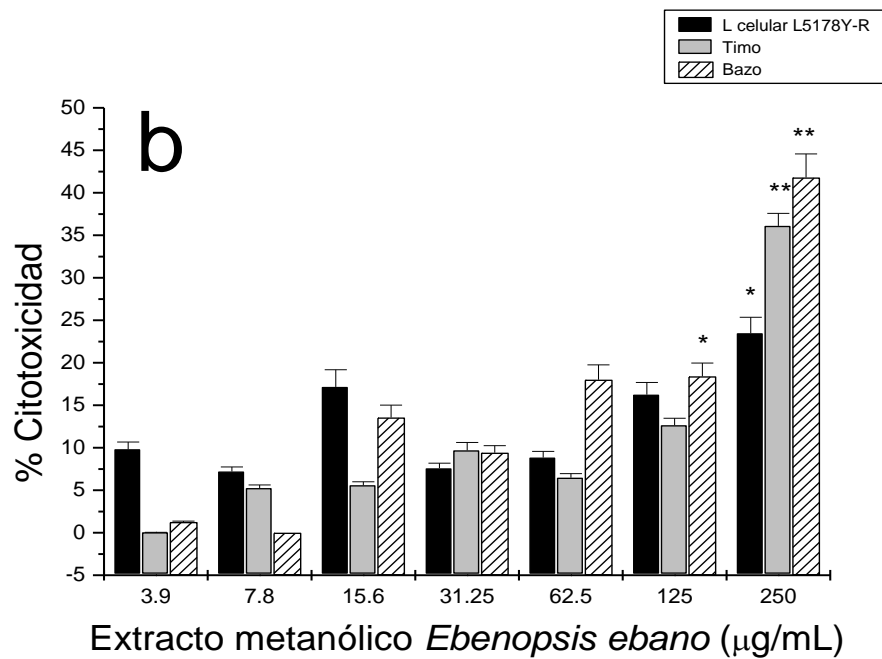
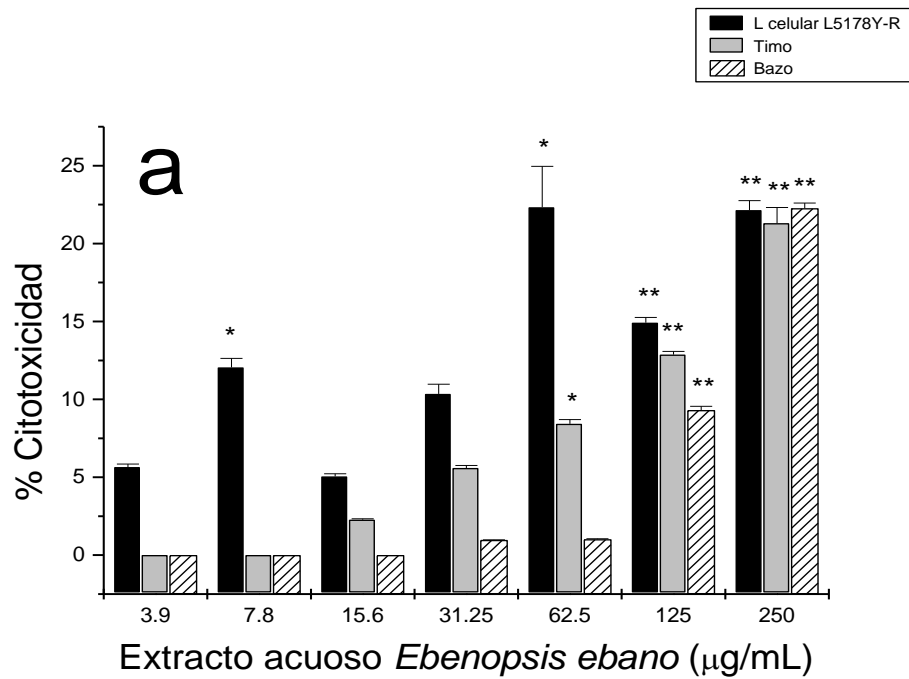


Fig. 69. Efecto de los extractos crudos T4 sobre el crecimiento de L. celular, linfocitos de timo y bazo

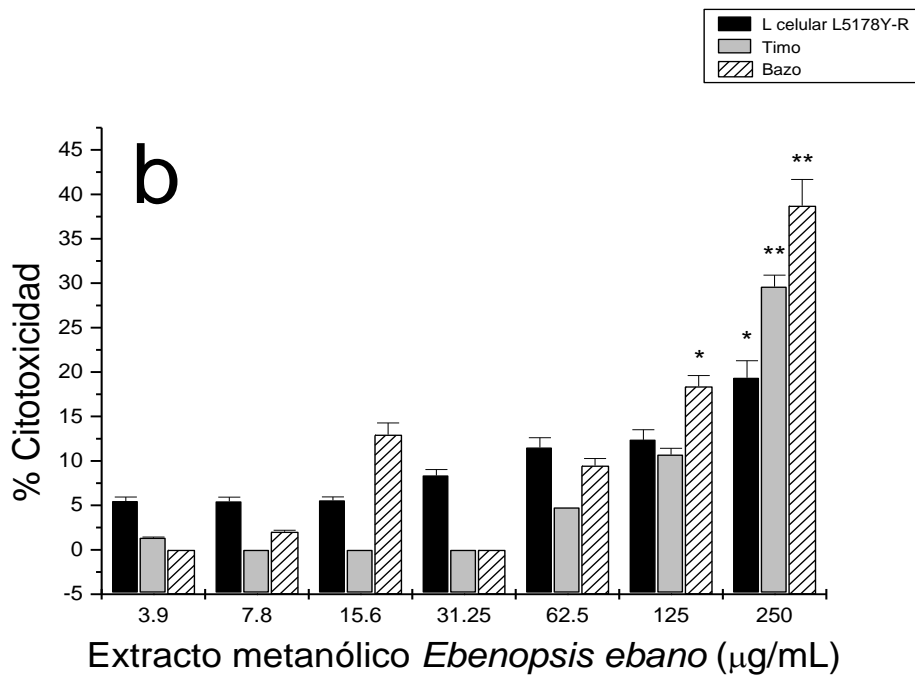
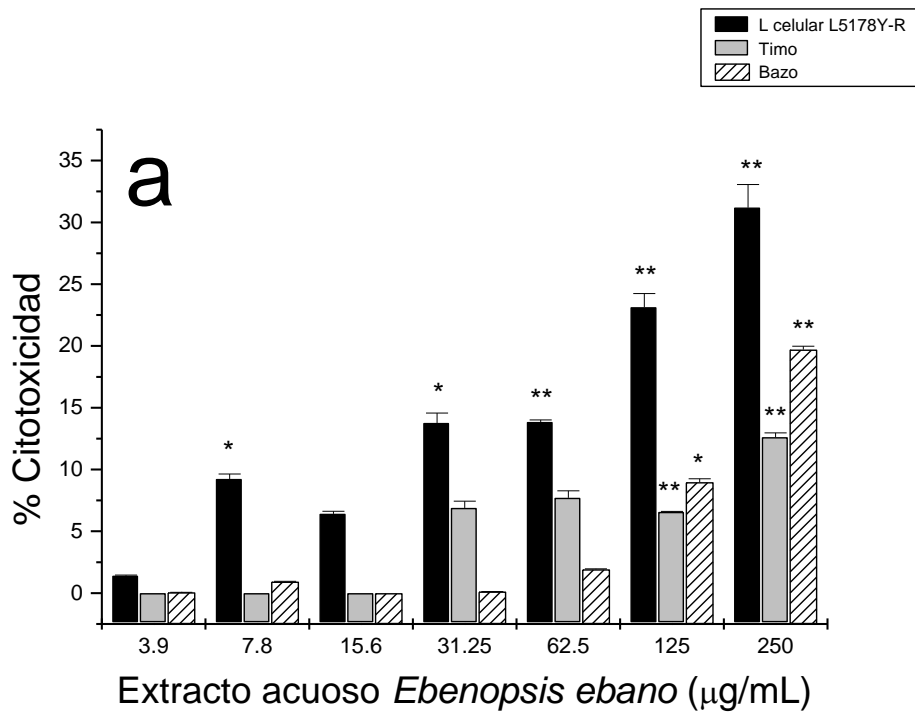


Fig. 70. Efecto de los extractos crudos T5 sobre el crecimiento de L. celular, linfocitos de timo y bazo

RESUMEN CURRICULAR

Yolanda Araceli Gracia Vásquez

Candidato para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE POLIFENOLES DE LA SEMILLA DE *Ebenopsis ebano* (Ébano)

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en H. Matamoros, Tan el 6 de febrero de 1962, hija de Carlos René Gracia Quintanilla y Ma. Elena Vásquez Jiménez

Educación: Egresada de la Fac. de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el título de Químico Farmacéutico Biólogo en 1984, egresada de la Fac. de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Alimentos en 2001.

Experiencia Profesional: Químico Analista en Industrias Conasupo en 1984, Químico Analista en el Laboratorio de Alimentos Medicamentos y Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL de 1984 a 1994, Profesor de Tiempo Parcial en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL de 1985 a 1994, Profesor de Tiempo Completo en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL de 1994 a la fecha, Profesor de Posgrado en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL de 2003 a la fecha.

Organizaciones Profesionales: Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de Nuevo León AC (Presidenta), IFT (Institute of Food Technologists)

Publicaciones: 2 capítulos de Libro de Memorias, 47 presentaciones en cartel, resúmenes en extenso en revista indexada, resúmenes en congresos, 2 tesis dirigidas concluidas y 2 en proceso

