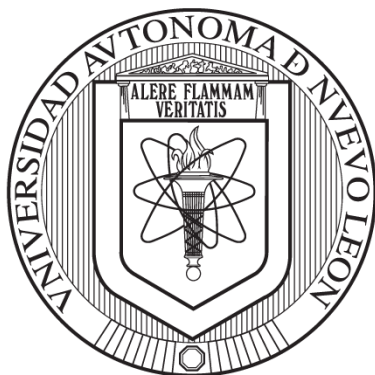


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**APLICACIÓN DE DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS NATURALES
(NADES) EN LA EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU
IMPACTO EN LA BIOACTIVIDAD DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO**

Por

Q.C.B. JESÚS ROLANDO MATA HUERTA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Química Biomédica

Junio, 2026

**APLICACIÓN DE DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS
NATURALES (NADES) EN LA EXTRACCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS Y SU IMPACTO EN LA BIOACTIVIDAD DE PLANTAS
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación de la Tesis



Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor
Directora de la tesis



Dr. C. Omar Jassiel Portillo Castillo
Codirector de la tesis



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.C.B. Jesús Rolando Mata Huerta Fecha de graduación: Julio 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título de estudio: Aplicación de Disolventes Eutécticos Profundos Naturales (NADES) en la extracción de metabolitos secundarios y su impacto en la bioactividad de plantas del noreste de México.

Número de páginas: 124 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Química Biomédica

Área de estudio: Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, UANL

Propósito y Método del Estudio: El propósito de este estudio fue analizar el uso de Disolventes Eutécticos Profundos Naturales en la extracción de metabolitos secundarios de plantas nativas del noreste de México y el efecto del uso de estos disolventes en la actividad biológica de estos extractos. Se prepararon y caracterizaron seis NADES los cuales se emplearon para la extracción de *Turnera diffusa*, *Leucophyllum frutescens* y *Cordia boissieri*. Se analizaron los extractos por HPLC-DAD, se realizó un análisis fitoquímico y se determinó su actividad antioxidante y efecto en la viabilidad celular.

Contribuciones y Conclusiones: Los NADES a base de azúcares permiten la extracción de compuestos de tipo flavonoide y taninos a partir del material vegetal, mientras que los NADES ácidos permiten la extracción de compuestos del tipo azúcares. La actividad antioxidante de *T. diffusa* aumenta con el uso de NADES ácidos. No se observó una disminución en la viabilidad celular de los extractos obtenidos con NADES.

Directora



Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme vida, salud y todo lo necesario para seguir en esta etapa de mi vida. También al destino o a la fuerza invisible que me acercó a las personas que conocí.

Agradezco a mi mamá **Alicia Huerta**. Es difícil pensar cómo podría haber terminado esta etapa de la vida (o de estudios) sin tu apoyo y amor incondicional. Cada día nos levantamos con adversidades, pero seguimos dando lo mejor de nosotros, todo lo que podemos dar. Tal vez se resume en tu lección más grande, disfrazada de la tercera ley del movimiento de Newton “Por cada acción ocurre una reacción de igual magnitud y con dirección opuesta a la primera acción”. Gracias por cuidarme, compartirme tu conocimiento y por acompañarme.

A mi papá **Remigio Mata**. De ti aprendí que nunca se deja de obtener conocimiento nuevo, a desarrollar la curiosidad, a analizar con cautela todo lo que se me ponga en frente y a cuidar a los demás.

A mi hermana **Rocío Abigail**. Siempre nos cuidamos el uno al otro, y seguirá siendo así. Espero por mucho tiempo. Aunque tenemos nuestros desencuentros, sé que me apoyarás incondicionalmente cuando lo necesite (a menos que estés trabajando de noche).

A mi familia: mis abuelos **Pedro y Alberto**, abuelas **Marcelina** (†) y **Marta**, tíos, tías, primos y demás. Aunque se siguen sorprendiendo cuando les explico lo que estoy estudiando, y a veces los dejo con más dudas que certezas, nunca dejan de darme ánimos y apoyarme.

Agradezco a la Dra. **Cecilia Delgado**. Me vio crecer desde que entré al laboratorio. Vio muchos errores de mi parte y aun así dedicó tiempo, paciencia y esfuerzo en ayudarme a comprender. Este trabajo, las horas en laboratorio (y las sorpresas) salieron adelante gracias a su dedicación y por creer en mi y confiar en lo que hacía.

Al Dr. **Omar Portillo**. No conocía a los NADES (o DES), ni tampoco era algo que tenía en mente para trabajar, pero todo lo que sé de ellos es gracias a usted. Le dio a este trabajo un refinamiento analítico

Al Dr. **Alejandro Pérez**. Gracias por su tiempo para resolver muchas de nuestras dudas técnicas y fitoquímicas. Y también por romper los empates cuando había diferencias creativas entre orgánicos y analíticos.

A **Karolina Antonio**. Te sigo presentando como mi hermana, así que aquí será igual (aunque te guste la coca sabor fresas con crema). Desde que nos conocimos, hemos crecido, muchas veces separados, pero nunca dejamos de preocuparnos por el otro. Gracias por el tiempo que le dedicaste a escucharme, los consejos y la compañía.

A **Angel Mendoza**. No recuerdo el día en el que te inscribiste al posgrado, pero ¿qué hubiera sido de este si no hubieses estado? Aunque te tocó sufrir más, la compañía durante los momentos más oscuros, las discusiones sobre la vida (sin olvidar las curvas de calibración) y las comidas juntos (especialmente las tiras de pollo y los chilaquiles) fue lo que en verdad hizo que este posgrado quede como un buen recuerdo.

A **Jocelyn Martínez**, mi siempre equipo. El mundo adulto se pone cada vez más difícil, pero tu compañía, consejos y tu forma de ver la vida,

hacen que todo se sienta más fácil. Seguimos siendo de diferentes mundos, pero eso nos permite dar un respiro cuando se complica todo.

A **Devany Andrade** (*my partner in crime*), **Valeria Medrano** y **Carla Beltrán**. Sin Microbiología la maestría habría sido diferente: la comida de la cafetería, más desabrida; los seminarios, más tediosos; la vida, más oscura. Gracias por todo el tiempo que nos dejaron entrar a Micro a pasar el tiempo, por escuchar nuestros problemas y por aconsejarnos cuando lo necesitábamos (y apoyar nuestras funas).

A **Rebeca Tea**. La persona más resiliente que conozco. Has salido adelante ante cualquier reto y nunca has dejado de brillar (y apoyar a cuanta persona se te cruce). Gracias por la confianza y el apoyo terapéutico en mis momentos más sombríos.

A **Zitlaly Martínez**. A pesar de que ya eres adulto responsable que sí trabaja, aún te tomas el tiempo para venir a pasar el rato (y seguir aprendiendo HPLC). Gracias por tu amistad y tiempo (pronto me iré a chambear).

Al cubículo de posgrado: **América Arroyo** (la hermana menor de posgrado, gracias por escuchar, apoyar mis planes como representante de QB y ser un gran apoyo moral), **Rodolfo Reyes** (el pipope máster en células, gracias por acompañar espiritualmente en este proceso y por esterilizar material) y **Aída Parra** (la hermana mayor de posgrado, gracias por guiarme y recordarme que debo tranquilizarme al exponer). También a mis compañeros del posgrado: **Amy Espinosa, Jahaziel Eufrazio, Samantha Armijo, Olga Rodríguez y Evelyn García.**

A las responsables de almacén de pregrado: **Judith Leura y Kathya Tovar.** Gracias por todo el apoyo moral durante las eternas prácticas, dejarme tomar material y reactivos que olvidé poner en la solicitud y por escuchar mis aventuras y desventuras.

A mis demás compañeros de generación: **Vianney Alfaro, Marcela Rivera, Emilio Rojas, Michelle Velarde, Fernanda Ramírez y Oliver García.** Nos peleamos por un reporte, pero de todas maneras siempre mantuvimos cierto grado de unidad, tanto para criticar asesores y departamentos, como para las fiestas.

A mis compañeros de laboratorio por hacer que las horas extrayendo plantas (y lavando material) fueran más ligeras: **Mayra Rodríguez** (por resolver todo tipo de problemas); **Emmanuel, Jesús Adolfo y Vivian** (los otros hijos de la doctora Ceci); **Emilio Muñoz** (y dejarme dormir en tu departamento), **Carolina Noyola y Angela Serrano**.

A **Nataly Morales, Fanny Reyes, Jaqui Preciado, Vale Reyes y Brandon Muñoz**. Porque, aunque en estas épocas ya nos vemos menos, su amistad sigue siendo igual de importante que siempre. Gracias por su tiempo y los momentos que pasamos.

A los miembros del departamento de Química Analítica: Dra. Verónica Rivas, Dra. Marsela, Dra. Rocío Castro, Dra. Blanca Alanís, Dra. Graciela Granados, Dr. Ricardo Lucio, Dra. Norma Cavazos, Dr. David Paniagua, Dra. Magdalena Escobedo, Dra. Rocío Álvarez, Julieta Sotelo y Tania Reyna.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Medicina tradicional y herbolaria	1
1.1.1 Plantas medicinales del noreste de México.....	5
1.2 <i>Turnera diffusa</i>	6
1.2.1 Actividades biológicas de <i>Turnera diffusa</i>	7
1.2.2 Compuestos aislados a partir de <i>Turnera diffusa</i>	8
1.3 <i>Leucophyllum frutescens</i>	9
1.3.1 Actividades biológicas de <i>Leucophyllum frutescens</i>	10
1.3.2 Compuestos aislados a partir de <i>Leucophyllum frutescens</i> ...	11
1.4 <i>Cordia boissieri</i>	13
1.4.1 Actividades biológicas de <i>Cordia boissieri</i>	14
1.4.2 Compuestos aislados a partir de <i>Cordia boissieri</i>	14
1.5 Extracción de metabolitos secundarios	15
1.6 Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES).....	17
1.6.1 Estructura y características de los NADES	20
1.6.2 Uso de los NADES como disolventes de extracción	21
1.6.2.1 Adición de agua a los NADES.....	22
1.6.2.2 Tiempo de extracción	22
1.6.2.3 Temperatura de extracción	23
1.6.2.4 Proporción disolvente-sólido	23
1.6.2.5 Método de extracción.....	24
1.6.2.6 Polaridad de los NADES	25
1.6.2.7 Viscosidad de los NADES	25
1.6.2.8 pH de los NADES.....	26
1.7 Antecedentes.....	26

1.8 Justificación	29
1.9 Objetivo general.....	30
1.10 Objetivos específicos.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 Material, equipos y reactivos	31
2.1.1 Material.....	31
2.1.2 Equipos	33
2.1.3 Reactivos.....	34
2.1.4 Material biológico	36
2.2 Material herbal	36
2.3 Preparación de los NADES	36
2.4 Caracterización fisicoquímica y espectroscópica de los NADES.	38
2.4.1 pH.....	38
2.4.2 Espectroscopía de Infrarrojo	38
2.4.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	38
2.5 Obtención de extractos.....	39
2.6 Evaluación cromatográfica de los extractos	40
2.7 Análisis fitoquímico de los extractos	40
2.7.1 Prueba de vainillina-ácido sulfúrico	41
2.7.2 Prueba de tricloruro de aluminio.....	41
2.7.3 Prueba de tricloruro férrico	41
2.7.4 Prueba de Dragendorff.....	42
2.7.5 Prueba de fenol-ácido sulfúrico	42
2.8 Evaluación de las actividades biológicas de los extractos.....	42
2.8.1 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH	43
2.8.2 Cultivo celular.....	44
2.8.2.1 Mantenimiento de las líneas celulares	44
2.8.2.2 Conteo celular	44
2.8.3 Determinación de la citotoxicidad de los extractos	45

RESULTADOS	47
3.1 Preparación y caracterización de los NADES	47
3.1.1 pH de los NADES	48
3.1.2 Espectros de IR de los NADES	49
3.1.4 Espectros de ¹ H-RMN de los NADES	54
3.2 Obtención de extractos	55
3.3 Análisis cromatográfico de los extractos	56
3.4 Pruebas fitoquímicas de los extractos	78
3.4.1 Terpenos	78
3.4.2 Flavonoides	79
3.4.3 Taninos	80
3.4.4 Alcaloides	81
3.4.5 Azúcares	81
3.5 Actividades biológicas de los extractos	83
3.5.1 Actividad antioxidante de los extractos	83
3.5.2 Citotoxicidad de los extractos	84
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	103
PERSPECTIVAS	105
REFERENCIAS	107

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Plantas utilizadas en los medicamentos herbolarios aprobados por COFEPRIS entre 2001 y 2021	3-4
II	Mezclas eutécticas probadas	37
III	Programa cromatográfico	40
IV	Características de los NADES preparados	48
V	pH de los NADES	49
VI	Resultados de la prueba de terpenos en los extractos obtenidos	78
VII	Resultados de la prueba de flavonoides en los extractos obtenidos	79
VIII	Resultados de la prueba de taninos en los extractos obtenidos	80
IX	Resultados de la prueba de alcaloides en los extractos obtenidos	81
X	Resultados de la prueba de azúcares en los extractos obtenidos	82
XI	Actividad antioxidante de los extractos, expresado como CE ₅₀ (%)	83
XII	Citotoxicidad celular de los extractos en células HepG2, CC ₅₀ (%)	85
XIII	Citotoxicidad celular de los extractos en células Vero, CC ₅₀ (%)	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ecorregiones del estado de Nuevo León	5
2	<i>Turnera diffusa</i>	6
3	Compuestos aislados a partir de <i>Turnera diffusa</i>	9
4	<i>Leucophyllum frutescens</i>	10
5	Compuestos aislados a partir de <i>Leucophyllum frutescens</i>	12
6	<i>Cordia boissieri</i>	13
7	Compuestos aislados a partir de <i>Cordia boissieri</i>	15
8	Diagrama de fases de temperatura-composición de dos compuestos cuando forman una mezcla eutéctica	18
9	Compuestos empleados en la elaboración de NADES, clasificados en aceptores (HBA) y donadores (HBD) de puentes de hidrógeno	19
10	Cámara de Neubauer	45
11	Espectro de IR del Cloruro de colina, Urea y NADES ChCl:Ur 1:2 M	50
12	Espectro de IR del Cloruro de colina, Sorbitol y NADES ChCl:Sor 1:1 M	51
13	Espectro de IR del Cloruro de colina, Fructosa y NADES ChCl:Fru 1:1 M	51
14	Espectro de IR del Cloruro de colina, Ácido málico y NADES ChCl:AM 1:1 M	52

15	Espectro de IR del Cloruro de colina, Ácido cítrico y NADES ChCl:AC 1:1 M	53
16	Espectro de IR de Betaína, Urea y NADES Bet:Ur 1:2 M	54
17	Espectro de 1H-RMN de NADES ChCl:Ur 1:2 M, Urea y Cloruro de colina	55
18	Extractos obtenidos con los diferentes NADES	
19	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Turnera diffusa</i> con metanol y metanol al 60%	57
20	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Leucophyllum frutescens</i> con metanol y metanol al 60%	57
21	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Cordia boissieri</i> con metanol y metanol al 60%	58
22	Cromatograma de NADES ChCl:Ur 1:2 M	59
23	Cromatograma de NADES ChCl:Sor 1:1 M	59
24	Cromatograma de NADES ChCl:Fru 1:1 M	60
25	Cromatograma de NADES ChCl:AM 1:1 M	60
26	Cromatograma de NADES ChCl:AC 1:1 M	61
27	Cromatograma de NADES Bet:Ur 1:2 M	61
28	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Turnera diffusa</i>	62
29	Cromatograma de extracto metanólico de <i>Turnera diffusa</i>	63
30	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con ChCl:Ur	64

31	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con Bet:Ur	64
32	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con ChCl: Sor	65
33	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con ChCl: Fru	65
34	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con ChCl: AM	66
35	Cromatograma de extracto de <i>Turnera diffusa</i> con ChCl: AC	66
36	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Leucophyllum frutescens</i>	67
37	Cromatograma de extracto metanólico de <i>Leucophyllum frutescens</i>	68
38	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con ChCl: Ur	68
39	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con Bet: Ur	69
40	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con ChCl: Sor	70
41	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con ChCl: Fru	70
42	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con ChCl: AM	71
43	Cromatograma de extracto de <i>Leucophyllum frutescens</i> con ChCl: AC	71
44	Comparación de los cromatogramas de los extractos de <i>Cordia boissieri</i>	72

45	Cromatograma de extracto metanólico de <i>Cordia boissieri</i>	73
46	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con ChCl:Ur	73
47	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con Bet:Ur	74
48	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con ChCl:Sor	75
49	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con ChCl:Fru	75
50	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con ChCl:AM	76
51	Cromatograma de extracto de <i>Cordia boissieri</i> con ChCl:AC	76
52	Fotografías representativas de células HepG2 tratadas con extractos de <i>T. diffusa</i>	87
53	Reacción de formación del complejo entre un flavonoide y $AlCl_3$	94
54	Reacción de reducción del DPPH por un antioxidante (AH)	97
55	Reacción de reducción del MTT a formazán	98

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μL	Microlitro
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
AC	Ácido cítrico
AM	Ácido málico
ATCC	American Type Culture Collection
Bet	Betaína
C-18	Octadecilsilano
CC₅₀	Concentración citotóxica 50
CE₅₀	Concentración efectiva 50
ChCl	Cloruro de colina
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
Fru	Fructosa
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
HBA	Aceptor de puentes de hidrógeno
HBD	Donador de puentes de hidrógeno
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos
MAE	Extracción asistida con microondas

MTT	Bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NADES	Disolventes eutécticos profundos naturales
NOESY	Espectroscopia de Efecto Overhauser Nuclear
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
SFB	Suero Fetal Bovino
Sor	Sorbitol
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
λ	Longitud de onda
UAE	Extracción asistida con ultrasonido
Ur	Urea

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Medicina tradicional y herbolaria

La medicina tradicional se define como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas indígenas que se usan en la prevención, diagnóstico, mejora y tratamiento de enfermedades físicas y mentales (Organización Mundial de la Salud, 2015). La práctica de esta forma de medicina está influida por factores como la cultura, importancia histórica, reglamentos y el contexto de cada región o país. Así, en algunos países su uso está extendido debido a un acceso limitado a servicios de salud convencionales (Cuevas, 2018). En México, además, forma parte integral de la cultura indígena, representando un símbolo de su identidad y defensa de sus derechos (Cuevas, 2018).

La medicina herbolaria forma parte de la medicina tradicional y se caracteriza por el uso de las diferentes partes de una planta, como raíces, hojas, flores o semillas, en la mejora, prevención y tratamiento de las enfermedades (Guzmán, 2017). El empleo de plantas con fines terapéuticos en México tiene su origen en

tiempos prehispánicos, donde estas representaban el principal recurso terapéutico para los pueblos indígenas (Campos-Navarro, 2016). Sin embargo, durante mucho tiempo estos conocimientos permanecieron marginados de la medicina convencional debido a la falta de evidencia científica que respaldara su eficacia terapéutica (Peña, 2020).

En la actualidad, la población ha recurrido a la herbolaria, dentro de la medicina tradicional, debido a factores como el costo y los efectos secundarios que presentan los medicamentos actuales (Peña, 2020). Asimismo, la publicación de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos resalta la importancia de las plantas medicinales en México y su potencial aplicación en diversas industrias, incluida la farmacéutica (Campos-Navarro, 2016).

De esta manera, el gobierno de México, a través de la Ley General de Salud (Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, 2021), reconoce tres tipos de productos herbolarios: medicamentos, remedios y suplementos alimenticios. Cada uno de estos productos es elaborado con material vegetal o sus derivados, empleándose la parte aérea o subterránea de una planta o preparaciones de esta: extractos, tinturas, jugos, resinas, aceites grasos y esenciales.

El país cuenta con una gran riqueza botánica que lo sitúa entre los tres países con mayor biodiversidad de América (Ulloa, 2017). Dentro de estas plantas, cerca de 4500 son medicinales y por lo menos el 90% de la población ha recurrido a estas en algún punto de su vida (Covarrubias-Gómez, 2009; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2021). A pesar de esto, solo un bajo porcentaje de este material vegetal ha sido estudiado científicamente (Torres-González,

2011). Además, solo algunos medicamentos herbolarios aprobados en México por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2021) provienen de plantas nacionales (Tabla I), por lo que surge la necesidad de investigar y desarrollar productos herbolarios a partir de plantas nativas.

Tabla I. Plantas utilizadas en los medicamentos herbolarios aprobados por COFEPRIS entre 2001 y 2021 (Morales, 2021).

Nombre científico	Nombre común
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Castaño de Indias
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst.	Hisopo de agua
<i>Calendula officinalis</i> L.	Caléndula
<i>Cassia angustifolia</i> M. Vahl	Sen
<i>Echinacea pallida</i> Nutt.	Equinácea pálida
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Equinácea púrpura
<i>Eleutherococcus senticosus</i> Rupr.	Ginseng siberiano, eleuterococo
<i>Echinacea angustifolia</i> DC.	Equinácea de hoja estrecha
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cola de caballo
<i>Equisetum laevigatum</i> A.Braun	Caña carricillo, cola de caballo
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P.Karst.	Hongo reishi
<i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	Yerba mate
<i>Lepidium meyenii</i> Walpers	Maca

<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey	Ginseng
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Pasiflora
<i>Paullinia cupana</i> Kunth	Guaraná
<i>Plantago psyllium</i> L.	Zaragatona
<i>Plantago ovata</i> Forssk.	Psyllium rubio
<i>Rhodiola rosea</i> L.	Rodiola
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Cardo mariano
<i>Smilax aristolochiifolia</i> Mill.	Zarzaparrilla
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Schult) DC.	Uña de gato
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valeriana
<i>Vitis vinifera</i> L.	Vid

El noreste de México es una región árida que incluye a los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas y se caracteriza por climas extremos y una amplia variedad de flora (Estrada, 2022). En Nuevo León, se presentan múltiples ecorregiones (Figura 1) con sus propias características climáticas y geográficas (Secretaría de Medio Ambiente del Estado de Nuevo León, 2025). Esta heterogeneidad ambiental se refleja en una elevada diversidad de especies vegetales, entre las que se encuentran helechos, árboles, arbustos, enredaderas y coníferas (Estrada, 2022).

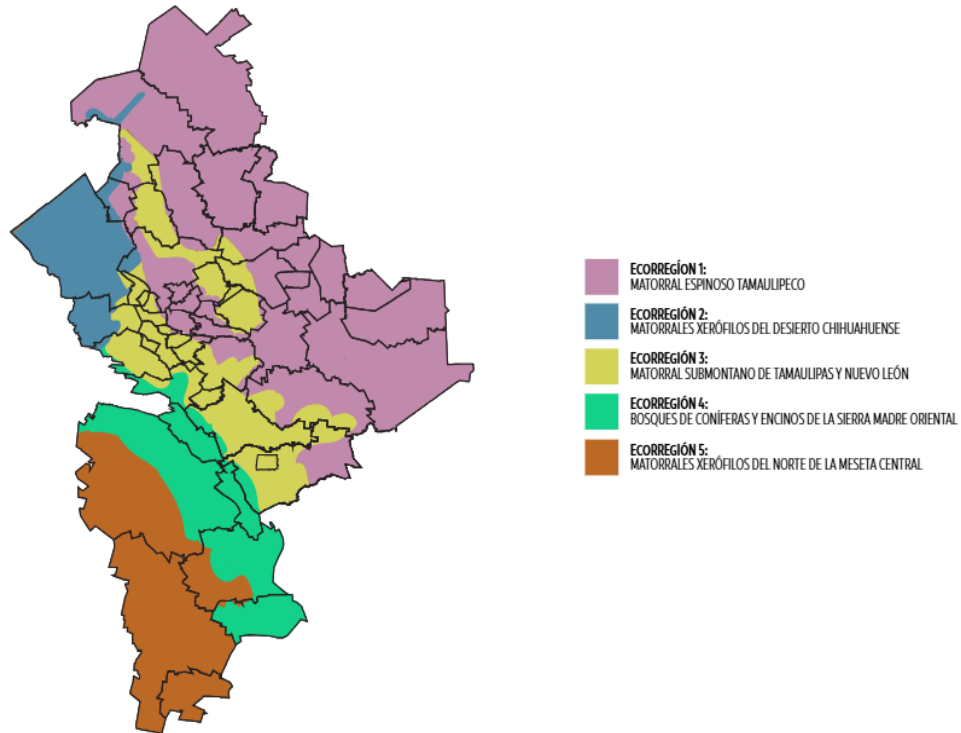


Figura 1. Ecorregiones del estado de Nuevo León (Imagen tomada de Secretaría de Medio Ambiente del Estado de Nuevo León, 2025).

1.1.1 Plantas medicinales del noreste de México

Diversos estudios etnobotánicos han documentado la riqueza vegetal presente en la región noreste de México, así como los usos tradicionales, formas de preparación y métodos de administración de las especies empleadas con fines terapéuticos. Entre las principales contribuciones en este ámbito se encuentran “Las zonas áridas del centro y noreste de México y el aprovechamiento de sus recursos” publicado por el entonces Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables (1964), “Vegetación y flora de Nuevo León, una guía botánico-ecológica” (Alanís, 1996) y “Plantas curativas del noreste mexicano” (Adame, 2000).

Particularmente en Nuevo León, las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional pertenecen a diversas familias botánicas, entre las que destacan Turneraceae, Scrophulariaceae, Boraginaceae, Cactaceae, entre otras (Bustamante, 2013).

1.2 *Turnera diffusa*

Turnera diffusa Willd. ex Schult. es una especie perteneciente a la familia Passifloraceae, sin embargo, en sistemas de clasificación anteriores se ubica dentro de la familia Turneraceae (Fonnegra, 2023). Crece en terrenos áridos de Norteamérica, especialmente en México; es un arbusto de entre 50 y 200 cm de altura, aromático, densamente seríceo, de tallo ramoso, con hojas alternadas de forma ovalada y flores pequeñas de color amarillo (Adame, 2000). En la Figura 2 se muestra una fotografía de la planta.



Figura 2. *Turnera diffusa*.

Esta especie es la más importante dentro del género *Turnera* debido a su uso en la medicina tradicional (Szewczyk, 2014). Los mayas la empleaban para tratar

el mareo, apertura del canal de parto durante el nacimiento y en el tratamiento de cólicos, enuresis nocturna y asma (Braun, 2015). Asimismo, se consume en preparaciones alcohólicas como afrodisiaco, aromatizante y saborizante de postres, helados, bebidas no alcohólicas y licores (Fonnegra, 2023).

1.2.1 Actividades biológicas de *Turnera diffusa*

Los extractos de *Turnera diffusa* presentan algunas actividades biológicas comprobadas a través de ensayos *in vitro* como *in vivo*. Salazar y colaboradores (2008) demostraron que el extracto metanólico posee actividad antioxidante a través de la prueba de reducción del radical DPPH, asimismo inhibió la actividad de la enzima xantina oxidasa.

Por otra parte, Torres-González y colaboradores (2011) determinaron que el extracto metanólico presentó actividad hepatoprotectora en un modelo celular *in vitro* de daño con CCl₄. De igual forma, este mismo extracto presentó actividad hipoglucemiante (Parra-Naranjo, 2017).

En el ámbito inmunológico, Lawal y colaboradores (2021) encontraron que los aceites esenciales de *T. diffusa* redujeron la inflamación en un modelo de edema inducido en ratas, efecto que persistió hasta tres horas después del tratamiento.

Otras investigaciones reportan la actividad antiaromatasa de los extractos metanólicos (Zhao, 2008), protección testicular contra el daño inducido por amitriptilina por extractos acuosos (Tousson, 2020) y la actividad ansiolítica

(Dorantes-Barron, 2019), antiviral (Silva-Trujillo, 2022), antifúngica y antibacteriana (Baez-Parra, 2019).

1.2.2 Compuestos aislados a partir de *Turnera diffusa*

Entre los compuestos aislados de *Turnera diffusa* se encuentran flavonoides, ácidos fenólicos, glucósidos cianogénicos, terpenoides y alcaloides (Szewczyk, 2014). Se ha demostrado la presencia de compuestos como gonzalitozin I, tetrafilina B, pineno, eremofilano y apigenina (Avelino-Flores, 2014).

Otro compuesto aislado es el hepatodamianol, un flavonoide C-glicosilado derivado de luteolina, cuya presencia se asoció con la actividad hepatoprotectora en un modelo celular *in vitro* de daño con CCl₄ (Delgado-Montemayor, 2022). Aguirre y colaboradores (2024) aislaron la teuhetenona A, un terpeno, que mostró potencial hipoglucemiante mediante la sensibilización de células hepáticas a la insulina en un modelo *in vitro*.

Por otra parte, la pinocembrina, un flavonoide aislado de *T. diffusa*, ha demostrado modular la respuesta inmunológica en un modelo murino de endotoxemia inducida por lipopolisacárido, reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Soromou, 2013).

En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de los compuestos hepatodamianol, teuhetenona A y pinocembrina, aislados a partir de *T. diffusa*.

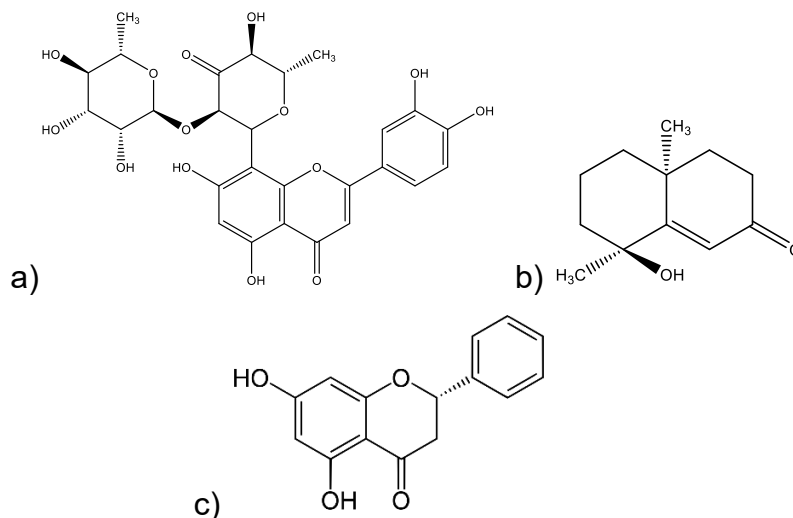


Figura 3. Compuestos aislados a partir de *Turnera diffusa*.
a) Hepatodamianol, b) Teuhetenona A y c) Pinocembrina.

En conjunto, la diversidad de metabolitos secundarios presentes en *T. diffusa* y las múltiples actividades biológicas reportadas respaldan su relevancia farmacológica y justifican la continuación de estudios orientados al aislamiento, caracterización y evaluación biológica de sus compuestos bioactivos.

1.3 *Leucophyllum frutescens*

Leucophyllum frutescens (Berl.) I.M. Johnst. es una planta perteneciente a la familia Scrophulariaceae que crece en el noreste de México (Thabet, 2021). Este arbusto alcanza entre 120 y 250 cm de altura y presenta hojas perennes, pequeñas, ovaladas y vellosas, de color blanquecino-pardo, característica de la cual deriva su nombre común, cenizo (Adame, 2000; Thabet, 2021). Sus flores son pequeñas, de color lila, y la floración ocurre durante períodos prolongados, particularmente después de las lluvias. Además, la especie presenta una notable

resistencia a las sequías y a temperaturas extremas (Oxford, 2013). En la Figura 4 se muestra una fotografía de esta planta.



Figura 4. *Leucophyllum frutescens*.

En la medicina tradicional, *L. frutescens* se ha utilizado para aliviar la fiebre y el dolor reumático, así como en el tratamiento de afecciones hepáticas y de la vejiga (Balderas-Rentería, 2007). Por otro lado, también existen reportes de su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias, como tos y asma (Molina-Salinas, 2007), así como contra la diarrea y disentería (Adame, 2000).

1.3.1 Actividades biológicas de *Leucophyllum frutescens*

Los extractos de diclorometano y metanol de *L. frutescens* han mostrado actividad antioxidante, antidiabética y citotóxica en diferentes modelos experimentales (Ahmad, 2022). Asimismo, se ha reportado actividad hepatoprotectora en un modelo *in vivo* con ratas Wistar (Jaramillo-Morales, 2023). De la misma forma, extractos metanólicos presentaron actividad antimicrobiana contra cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (Molina-

Salinas, 2007). En el mismo estudio de Ahmad y colaboradores (2022), se encontró que extractos de hexano de la parte aérea de *L. frutescens* presentaron actividad hemolítica e inhibición de la enzima α -glucosidasa en ensayos *in vitro*.

Además, Thabet y colaboradores (2021) encontraron que el aceite esencial de *L. frutescens* presentó actividad inhibitoria de las enzimas colagenasa y elastasa, lo que sugiere un potencial efecto antienvjecimiento debido a la participación de estas enzimas en la degradación de componentes de la matriz extracelular.

1.3.2 Compuestos aislados a partir de *Leucophyllum frutescens*

Los análisis fitoquímicos realizados en *L. frutescens* han demostrado la presencia de taninos, terpenoides, esteroides, alcaloides y saponinas (Poonam, 2016). Entre los metabolitos identificados se encuentran limoneno, heneicosano, dehidroepingaona, ésteres de ácidos grasos (particularmente 9-octadecenoato de metilo), así como fitol y escualeno (Ahmad, 2022; Thabet, 2021).

El fraccionamiento biodirigido de extractos de hexano-acetato de etilo permitió aislar diversos lignanos con actividad fitotóxica, entre ellos diyangambina, epiyangambina, diasesartemina y epiasantina (Rimando, 1999; De León, 2002). La diyangambina mostró actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora en ensayos *in vitro*, al inhibir la proliferación de linfocitos y la generación de prostaglandina E₂ en macrófagos. Asimismo, en modelos *in vivo* redujo la formación de edema tras la inducción de inflamación en un modelo de ratones

(De León, 2002). Por otra parte, este mismo compuesto demostró actividad antimicrobiana en un modelo vegetal *in vitro* al inhibir la germinación de semillas (Rimando, 1999).

Asimismo, a partir de extractos metanólicos de la raíz se aisló leubetanol, un diterpeno con actividad frente a cepas resistentes y virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* (Molina-Salinas, 2011). Por otra parte, el verbascósido, un glucósido polifenólico, ha sido asociado con la actividad hepatoprotectora observada en esta especie (Jaramillo-Morales, 2023).

En la Figura 5 se muestran las estructuras químicas de los compuestos diayangambina, leubetanol y verbascósido, aislados a partir de *L. frutescens*.

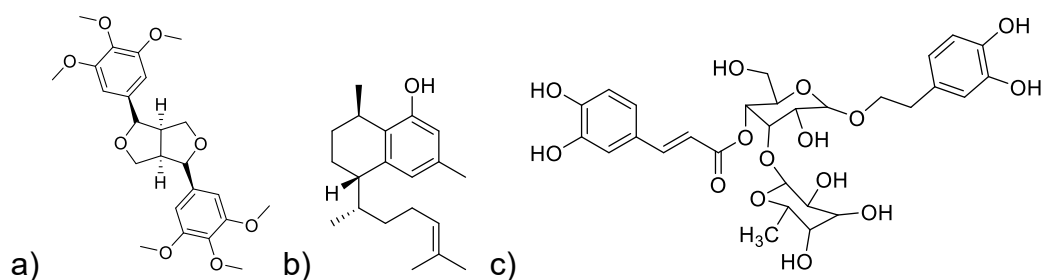


Figura 5. Compuestos aislados a partir de *Leucophyllum frutescens*.
a) Diayangambina, b) Leubetanol y c) Verbascósido.

En conjunto, los estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados en *L. frutescens* sugieren que esta especie constituye una fuente importante de metabolitos bioactivos con potencial terapéutico, particularmente en procesos inflamatorios, infecciosos y metabólicos.

1.4 *Cordia boissieri*

Cordia boissieri A.DC., comúnmente conocida como anacahuita, es un árbol perteneciente a la familia Boraginaceae, nativo del noreste de México y del sureste de Estados Unidos (Martínez-Adriano, 2016). Esta especie puede alcanzar hasta cinco metros de altura y presenta un tallo leñoso de color grisáceo, hojas alternas, ovaladas y dentadas, cubiertas por vellosidades, flores blancas y frutos de color verde amarillento (Adame, 2000). Se ha documentado su empleo como remedio herbolario, particularmente ente mujeres con diabetes en algunas regiones de Estados Unidos. Asimismo, se ha utilizado como emoliente en las Antillas y México (Owis, 2016). En la Figura 6 se muestra una fotografía de este árbol.



Figura 6. *Cordia boissieri*.

Preparaciones a partir de sus hojas se emplean en el alivio de reumatismo y enfermedades pulmonares, como asma, bronquitis, catarros y tuberculosis (Owis, 2016; Adame, 2000). Otras afecciones tratadas con preparaciones como cataplasmas e infusiones incluyen dolores estomacales y menstruales, tos y resfriado (Oza, 2017).

1.4.1 Actividades biológicas de *Cordia boissieri*

Los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de *C. boissieri* han mostrado actividad antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (Owis, 2016). Además, se ha observado actividad antioxidante en los extractos metanólicos de las flores de la planta (Oza, 2017). A partir del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de la planta se aislaron compuestos con actividad protectora frente al síndrome metabólico inducido en ratas Wistar. Dicho efecto se manifestó mediante una mejora en la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa, así como una disminución en el estrés oxidativo e inflamación (Owis, 2016).

Viveros-Valdéz y colaboradores (2016) encontraron que los extractos de la pulpa del fruto de *C. boissieri* mostraron actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales y capacidad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa.

1.4.2 Compuestos aislados a partir de *Cordia boissieri*

Entre los metabolitos identificados en *C. boissieri* se encuentran kaempferol, 3,4-dimetilkaempferol y p-hidroxibenzaldehído, (-)-espatulenol y (E)-cariofileno [R7.1](Owis, 2014). De estos, el kaempferol, un flavonoide al que se le asocia con la actividad antioxidante y la protección frente el síndrome metabólico (Owis, 2016). Otros compuestos aislados incluyen la alantoína (ureida), quebrachitol (ciclitol derivado del inositol) y ácidos grasos (Oza, 2017). La alantoína y el

quebrachitol se han relacionado con efectos hipoglucemiantes y antihiperoglucemiantes, ya que ambos compuestos regularon los niveles de glucosa en sangre en modelos in vivo de normoglucemia y diabéticos (Mendoza, 2017). En la Figura 7 se muestran las estructuras químicas de los compuestos kaempferol, quebrachitol y alantoína, aislados a partir de *C. boissieri*.

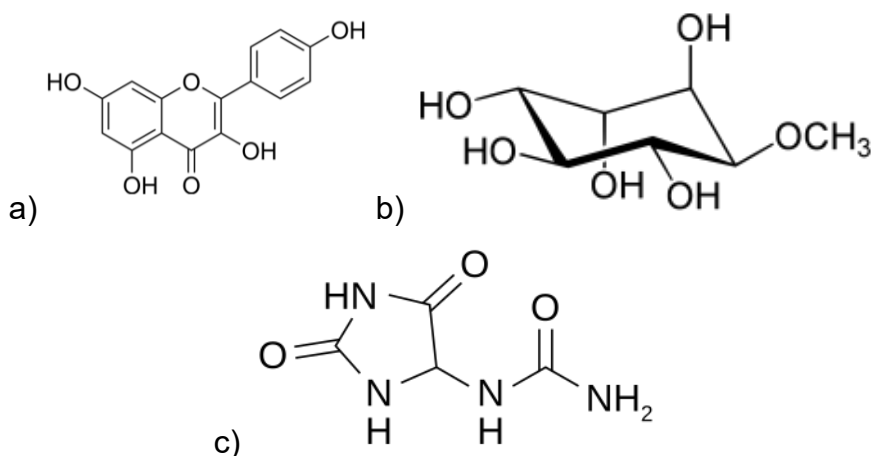


Figura 7. Compuestos aislados a partir de *Cordia boissieri*. a) Kaempferol b) Quebrachitol c) Alantoína.

1.5 Extracción de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por las plantas a partir de metabolitos primarios y desempeñan diversas funciones ecológicas y fisiológicas. Entre ellas se encuentran la adaptación al entorno, la regulación de procesos de floración y fructificación, el mantenimiento del crecimiento y la defensa frente a microorganismos, insectos y otros factores de estrés biótico y abiótico (Teoh, 2016).

A diferencia de los metabolitos primarios, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, los metabolitos secundarios presentan una distribución más específica y pueden variar entre familias, géneros e inclusive en especies. Asimismo, su composición y concentración dependen de diversos factores, entre ellos la especie vegetal, las condiciones ambientales y el sitio de crecimiento (Jain, 2019).

Gran parte de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas medicinales se relacionan con la presencia de metabolitos secundarios, entre los que destacan flavonoides, compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides y glucósidos. Por ello, el desarrollo de métodos eficientes y sostenibles para su extracción constituye un aspecto fundamental en la investigación de productos naturales (Zuo, 2023).

Los métodos convencionales empleados para la extracción de metabolitos secundarios se basan principalmente en el uso de disolventes orgánicos e incluyen técnicas como infusión, reflujo, lixiviación y percolación (Martínez-Ávila, 2021). Sin embargo, estos disolventes presentan diversas desventajas, entre ellas su alta presión de vapor, inflamabilidad, toxicidad y posible presencia residual en los extractos finales cuando no son eliminados correctamente. Esto se traduce en un impacto ambiental debido a su baja biodegradabilidad y a las emisiones asociadas a su uso y disposición, impactando al medio ambiente (Zuo, 2023; Hikmawanti, 2021).

Debido a estas limitaciones, en los últimos años ha aumentado el interés por desarrollar estrategias de extracción más sostenibles, orientadas a disminuir el

consumo de disolventes orgánicos y los tiempos de procesamiento, al tiempo que se maximiza la recuperación de compuestos bioactivos (Martínez-Ávila, 2021).

Entre las alternativas destacan los denominados disolventes ecológicos o disolventes “verdes”, dentro de los cuales se encuentran los disolventes eutécticos profundos (DES) y los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES), considerados opciones prometedoras para la extracción sostenible de metabolitos secundarios (Hikmawanti, 2021).

1.6 Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES)

Los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) son sistemas líquidos formados por la combinación de al menos un aceptor y un donador de puentes de hidrógeno, cuya interacción genera una disminución significativa del punto de fusión de la mezcla respecto al de sus componentes individuales (Chaisawat, 2024). Esto forma una mezcla eutéctica, la cual es una combinación de dos o más compuestos que en proporciones específicas originan una mezcla con punto de fusión mínimo característico, denominado punto eutéctico (Sharma, 2025). En la Figura 8 se muestra el diagrama de fases de temperatura y composición de una mezcla eutéctica.

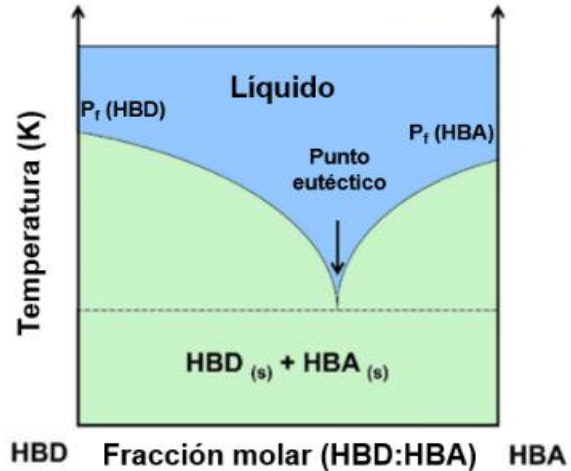


Figura 8. Diagrama de fases de temperatura-composición de dos compuestos cuando forman una mezcla eutéctica (Imagen modificada de Pereira, 2025).

Particularmente, los NADES son mezclas eutécticas formadas por metabolitos primarios de origen natural como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, alcoholes y aminas (Casado-Hidalgo, 2024). Las sales de amonio o aminoácidos son generalmente las sustanciasceptoras de puentes de hidrógeno (HBA), mientras que los azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes funcionan como los donadores de puentes de hidrógeno (HBD) (Koh, 2023). En la Figura 9 se muestran algunos de los compuestos comúnmente utilizados como HBA y HBD en la preparación de los NADES.

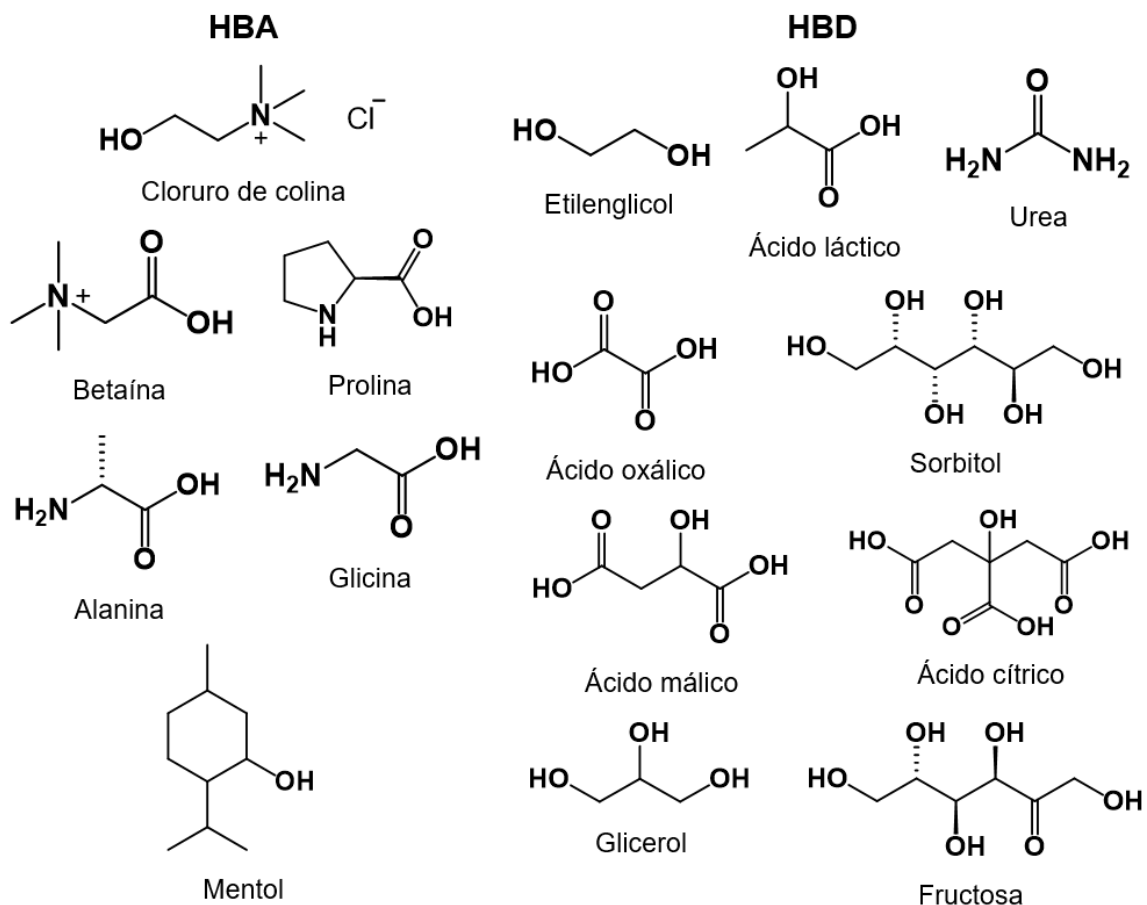


Figura 9. Compuestos empleados en la elaboración de NADES, clasificados en aceptores (HBA) y donadores (HBD) de puentes de hidrógeno.

Los NADES pueden clasificarse dependiendo de los componentes que los conforman en NADES iónicos (ácidos y bases), NADES neutros (azúcares solos o polialcoholes), NADES neutros con ácidos (azúcares o polialcoholes y ácidos orgánicos), NADES neutros con bases (azúcares o polialcoholes y bases orgánicas) y NADES a base de aminoácidos (aminoácidos y ácidos orgánicos o azúcares) (Hikmawanti, 2021).

Entre sus propiedades fisicoquímicas destacan: punto de fusión menor a sus componentes individuales, amplia gama de polaridades (desde sistemas

hidrofílicos hasta hidrofóbicos), viscosidad variable y elevada estabilidad química (Hikmawanti, 2021). Estas propiedades pueden traducirse en algunas ventajas al emplearse como disolventes de extracción, incluyendo una baja toxicidad para el analista, presentan baja volatilidad, son de preparación simple, costos relativamente bajos y no son inflamables; características que reducen los riesgos asociados a su manipulación (Hikmawanti, 2021). Además, se consideran disolventes de diseño, debido a la posibilidad de realizar múltiples combinaciones de compuestos, lo cual se traduce en diferentes propiedades fisicoquímicas (Kua, 2019; Jiménez-Ortega, 2024; Aktaş, 2024).

Estos disolventes pueden prepararse a través de diferentes métodos, la elección del método depende principalmente a las propiedades fisicoquímicas de los componentes empleados y de la proporción en la que se combinan. De esta forma, se han reportado diversos métodos para preparar los NADES, entre los que destacan el método de agitación y calentamiento, por molienda, mediante evaporación, a través de liofilización y asistido por microondas o por ultrasonido (Zuo, 2023).

1.6.1 Estructura y características de los NADES

Se ha reportado que la organización y formación de los NADES se debe a interacciones de tipo puentes de hidrógeno, cuya formación se atribuye principalmente a una extensa red de puentes de hidrógeno intermoleculares entre los componentes aceptores y donadores (Koh, 2023). Las características físicas

de los puentes de hidrógeno como fuerza, direccionalidad y corta longitud favorecen la creación de una red supramolecular tridimensional (Chaisawat, 2024), la cual finalmente lleva a la disminución del punto de fusión de las sustancias (Koh, 2023). Otras interacciones secundarias que también participan en la formación de estos disolventes son las fuerzas de van der Waals, las cuales contribuyen a la estabilización de estos sistemas, especialmente en NADES que contienen compuestos con cadenas hidrocarbonadas de mayor longitud (Koh, 2023).

Para estudiar la formación de estas interacciones se emplea comúnmente técnicas espectroscópicas como espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Ma, 2025; Sakurai, 2024; de Lima, 2024).

Por otro lado, existen NADES basados en interacciones hidrofóbicas, cuyas fuerzas principales de formación son las interacciones π - π . Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofóbica, presentan dificultad para su aplicación directa con matrices acuosas (Casado-Hidalgo, 2024).

1.6.2 Uso de los NADES como disolventes de extracción

Los disolventes eutécticos profundos naturales se han empleado en la extracción de compuestos a partir de diferentes matrices. Algunos de los parámetros que afectan o determinan la eficiencia en la extracción se detallan a continuación.

1.6.2.1 Adición de agua a los NADES

Los NADES presentan diversas características fisicoquímicas, tales como una viscosidad, tensión superficial y polaridad variables, dichas propiedades afectan el proceso de extracción cuando se usan como fases extractantes, por lo que, es habitual mezclar el NADES con agua para reducir la viscosidad, disminuir la resistencia al flujo y aumentar la solubilidad de algunos compuestos (Chaisawat, 2024). La reducción de la viscosidad del disolvente mejora la transferencia de masa de los compuestos hacia el disolvente, sin embargo, al interactuar directamente con el NADES, una adición excesiva de agua puede alterar la red de puentes de hidrógeno responsable de la estructura eutéctica del sistema (Zuo, 2023).

1.6.2.2 Tiempo de extracción

En general, el rendimiento de extracción aumenta conforme se incrementa el tiempo de contacto entre el material vegetal y el disolvente, sin embargo, luego de un periodo se observa una tendencia estable, que eventualmente concluye en la disminución de la eficiencia luego de un tiempo prolongado de extracción (Zuo, 2023). Se han reportado tiempos variables de extracción de metabolitos a partir de material vegetal, que van desde los 15 hasta los 120 minutos, lo cual depende tanto del material vegetal empleado, como del NADES usado (Pereira, 2025). Así, aunque los tiempos de extracción largos favorecen una mayor extracción, también debe considerarse que, una vez alcanzado el equilibrio de extracción,

prolongar el proceso produce incrementos mínimos en la recuperación de compuestos (Chaisawat, 2024).

1.6.2.3 Temperatura de extracción

Un incremento en la temperatura reduce la viscosidad del NADES y favorece la difusión de los compuestos, aumentando la transferencia de masa entre el material vegetal y el disolvente, lo que se traduce en un aumento de la eficiencia de extracción (Chaisawat, 2024). Un punto importante es que los metabolitos de las plantas son susceptibles a la descomposición por temperatura, llevando a una disminución de la cantidad de materia extraída (Santos-Martín, 2023).

En la literatura se reportan rangos de temperatura de extracción desde 25 °C hasta los 90 °C (Mavai, 2024), sin embargo, se observa una prevalencia de temperaturas entre 40 y 60 °C debido al riesgo de degradación de metabolitos termolábiles (Pereira, 2025).

1.6.2.4 Proporción disolvente-sólido

Hay una relación directa entre la proporción disolvente-sólido y la eficiencia de extracción: una mayor cantidad de disolvente incrementa el área de contacto efectiva entre la matriz vegetal y el medio extractante. Lo anterior facilita la transferencia y aumenta la diferencia de concentraciones de los metabolitos en el material vegetal y el disolvente, facilitando su difusión (Wang, 2024).

Se encuentran reportes de proporciones disolvente-sólido entre 5 y 100 mL/g de material vegetal, sin embargo, generalmente un aumento excesivo en la cantidad de disolvente no produce un aumento significativo en la extracción, pero sí en los costos (Zuo, 2023).

1.6.2.5 Método de extracción

La extracción puede ser realizada a través de diferentes métodos, incluyendo calentamiento, agitación, sonicación y microondas (Zuo, 2023), incluso se ha desarrollado un método asistido por infrarrojo, donde se calienta el material vegetal con radiación infrarroja (Rajha, 2019). De entre estos, destaca la extracción asistida con ultrasonido (UAE) (Pereira, 2025).

En la extracción asistida con ultrasonido se usan ondas de sonido de alta frecuencia que generan efectos de vibración y cavitación donde se producen y colapsan cavidades microscópicas en el medio líquido, generando ondas de choque y calor localizado, incrementando el calor y presión en el líquido (Chaisawat, 2024). Esto acelera la liberación y difusión de los compuestos intracelulares vegetales (Hao, 2024).

El ultrasonido facilita la ruptura de las paredes celulares del material vegetal, promoviendo la liberación de metabolitos intracelulares y reduciendo simultáneamente los tiempos de extracción (Chaisawat, 2024; Hao, 2024).

De este modo, es posible optimizar parámetros como la frecuencia del ultrasonido, favoreciendo la formación de cavitación por la energía acústica, la

potencia e intensidad del ultrasonido, así como la duración y frecuencia de los ciclos de sonicación dentro del tiempo total de extracción (Siddiqui, 2025).

1.6.2.6 Polaridad de los NADES

La polaridad del disolvente determina la eficiencia de la extracción debido a la afinidad de los compuestos con el disolvente (Koh, 2023). Esta polaridad proviene de los componentes del NADES: aquellos basados en ácidos orgánicos suelen presentar una elevada polaridad, mientras que aquellos basados en azúcares y polialcoholes presentan polaridad similar al metanol (Kua, 2019).

A pesar de su polaridad, los NADES pueden diseñarse con características hidrofílicas o hidrofóbicas y ser capaces de extraer tanto compuestos polares como no polares (Dai, 2013). La eficiencia de esta extracción depende principalmente de la formación de interacciones intermoleculares (Kua, 2019).

1.6.2.7 Viscosidad de los NADES

La alta viscosidad de los NADES se traduce en una baja difusión de los compuestos desde el material vegetal hacia el NADES, que conlleva menores porcentajes de recuperación (Hao, 2024). Esta viscosidad es fruto de la amplia cantidad de puentes de hidrógeno (Koh, 2023). Como se mencionó, la viscosidad disminuye la transferencia de masa de los compuestos, que se observa como una baja eficiencia de extracción, pero puede ser modificada a través de la adición de agua o con la manipulación de la temperatura, facilitando la

transferencia de masa de los compuestos y aumentando su extracción (Koh, 2023).

1.6.2.8 pH de los NADES

El pH es un punto crítico del disolvente a emplear en la extracción, considerando que afecta la estabilidad de los compuestos a extraer y puede favorecer reacciones secundarias (Koh, 2023). Este parámetro es fácilmente identificable gracias a los componentes que conforman el NADES, ya que pueden ser ácidos o bases orgánicas, los cuales afectan directamente el valor de pH, mientras que los azúcares presentan un pH cercano a la neutralidad o acidez baja (Koh, 2023). Dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos de interés, un pH adecuado puede favorecer su estabilidad y extracción. Por ejemplo, compuestos fenólicos presentan una mayor estabilidad en condiciones ácidas (de Lima, 2024).

1.7 Antecedentes

Los NADES se han empleado en la extracción de metabolitos secundarios de diferentes propiedades fisicoquímicas, debido a la amplia variedad de combinaciones posibles entre sus componentes. Así, se ha observado que presentan una mejor eficiencia de extracción de compuestos bioactivos, como flavonoides, y que mejoran la estabilidad química de estos metabolitos (Hao, 2024).

Cheng y colaboradores (2024) emplearon un sistema de cloruro de colina y ácido acético (1:2 M) para extraer flavonoides de las hojas y tallo de cacahuate, obteniendo una extracción 36% superior con el NADES que cuando se comparó con las extracciones alcohólicas. De la misma forma, Wang y colaboradores (2024) optimizaron la extracción de flavonoides a partir de hojas de *Perilla frutescens*, donde se encontró que un sistema de glucosa y glicerol (1:4.3 M) con adición de agua en un 46.9% mejoró significativamente la extracción en comparación con el etanol. En este caso, además de extraer una mayor cantidad de flavonoides empleando este tipo de disolventes, se observó una mayor capacidad antioxidante, una mayor inhibición de enzimas asociadas a la inflamación (hialuronidasa y ciclooxigenasa-2) y una mejor estabilidad de los flavonoides en NADES luego del almacenamiento prolongado de los extractos.

Por otra parte, en la extracción de antioxidantes polifenólicos de las hojas de *Pluchea indica*, la extracción con el sistema de cloruro de colina y urea (1:3 M) permitió obtener concentraciones de flavonoides y compuestos fenólicos 3.1 veces superiores en comparación con los extractos metanólicos (Hikmawanti, 2024).

Los NADES también se han empleado para la extracción de alcaloides como la cafeína. Loukri y colaboradores (2022) emplearon un NADES de cloruro de colina y glicerol (1:3 M) para la extracción de este compuesto a partir de pulpa de café. En este estudio, se observó un 12% más de extracción de cafeína comparada con la extracción acuosa y una actividad antirradicalaria, expresada

como equivalentes de Trolox por gramo de extracto, mayor comparada con extractos metanólicos (83.4%), etanólicos (88.47%) y acuosos (54.88%).

Por otro lado, para la extracción de vainillina, un aldehído fenólico, a partir de vainas de vainilla, se empleó un NADES de cloruro de colina – 1,4 butanediol y ácido láctico (1:1:1 M). En este caso, se observó una mayor cantidad extraída del compuesto cuando se empleó el NADES, ya que, en un ensayo de actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco, la vainillina extraída con NADES presentó una actividad comparable con el estándar puro del compuesto (Xu, 2024).

Vo y colaboradores (2024) emplearon un NADES de ácido láctico y glucosa (2:1 M) para la extracción simultánea de terpenoides, fenoles y flavonoides a partir de *Codonopsis pilosula*. Además de mejorar la recuperación de metabolitos, en estudios farmacocinéticos se observó que los NADES favorecen la biodisponibilidad de los compuestos presentes en extractos preparados con estos disolventes cuando fueron administrados a ratas (da Silva, 2020).

Por otro lado, en estudios sobre citotoxicidad de los NADES, se reportó que presentan una citotoxicidad dependiente de la concentración, observándose una baja citotoxicidad cuando la concentración del disolvente se ubica entre 0 y 10% (Peng, 2025).

Estos resultados hacen surgir la pregunta acerca del posible uso de los NADES como disolventes de extracción de plantas del noreste del país para

obtener una mayor cantidad de metabolitos secundarios y en su caso, potenciar su actividad biológica.

1.8 Justificación

Las plantas representan una rica fuente de compuestos bioactivos, muchos de ellos con propiedades terapéuticas potenciales. Sin embargo, su aprovechamiento se ve limitado por los métodos de extracción convencionales y la toxicidad de los disolventes utilizados.

Hoy en día, la creciente demanda por métodos de extracción más eficientes, respetuosos con el medio ambiente y biocompatibles, han impulsado el desarrollo de nuevos procesos ecológicos en el campo de la fitoquímica. En este contexto, los disolventes eutécticos profundos naturales surgen como una alternativa prometedora frente a los disolventes orgánicos tradicionales, debido a su bajo impacto ambiental, bajo costo y capacidad para extraer una amplia gama de metabolitos secundarios.

Por lo tanto, en este trabajo se propone evaluar el uso de disolventes eutécticos profundos naturales para la extracción de metabolitos secundarios de tres plantas del noreste de México y evaluar su efecto en la actividad biológica, lo cual puede tener implicaciones importantes en el desarrollo de fitomedicamentos.

1.9 Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de Disolventes Eutécticos Profundos Naturales en la extracción y bioactividad de plantas del noreste de México.

1.10 Objetivos específicos

1. Preparar y caracterizar fisicoquímica y espectroscópicamente diferentes NADES.
2. Evaluar el desempeño de diferentes NADES en la extracción de metabolitos secundarios de plantas del noreste de México.
3. Evaluar la citotoxicidad y actividad antioxidante de los extractos obtenidos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material, equipos y reactivos

2.1.1 Material

- Acrodiscos de poro de 0.2 μm membrana de nylon marca Pall Life Sciences.
- Bulbo para pipeta Pasteur.
- Cajas de cultivo celular T-25, T-75 y T-125 con filtro marca Corning.
- Cajas para criotubos con capacidad de 25 marca VWR.
- Cámara de Neubauer.
- Columna HPLC de octadecilsilano C-18 Hipersyl-Gold 4.6x150 mm, tamaño de partícula de 5 μm marca Thermo Scientific.
- Criotubos de 2 mL de capacidad marca Nalgene.
- Embudo de filtración marca Pyrex.
- Espátulas para polvos.

- Gradillas.
- Jeringas estériles desechables de 1 mL y 5 mL de capacidad.
- Matraces bola de fondo plano de 150 mL marca Pyrex.
- Matraces volumétricos de 10 mL y 25 mL.
- Papel filtro # 40 marca Whatman.
- Pinzas de tres dedos.
- Pipeta automática multicanal 10 – 100 μ L marca Eppendorf.
- Pipetas automáticas de 100 – 1000 μ L, 20 – 200 μ L y 1 – 20 μ L marca Eppendorf.
- Pipetas lineales de 5 mL, 10 mL y 25 mL estériles marca VWR.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetor automático marca VWR.
- Placas de 96 pozos de fondo plano, estériles y con tapa marca Corning.
- Probetas de 25 mL, 50 mL y 250 mL marca Pyrex.
- Puntillas de 10 – 100 μ L y 100 – 1000 μ L marca Eppendorf.
- Soporte universal.
- Termómetro de mercurio.
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL estériles con tapa marca Corning.
- Tubos de ensayo 13 x 100 marca Pyrex.
- Tubos de microcentrífuga claros de 1.5 mL marca Eppendorf.
- Tubos de RMN de 5 mm.
- Vasos de precipitado de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 600 mL marca Pyrex.
- Viales para HPLC claros con tapa y septo de 1.5 mL marca Agilent.

2.1.2 Equipos

- Autoclave marca Market Forge Sterilmatic.
- Balanza analítica modelo GR-120 marca AND.
- Baño de recirculación DC10-B3 marca Haake.
- Baño de ultrasonido modelo 2510 marca Branson.
- Bomba de vacío de 1 caballo de fuerza marca Gast.
- Campana de extracción CEE-120 marca Lumistell.
- Campana de flujo laminar modelo CSB 120 marca Prendo.
- Centrifuga refrigerada modelo ST1R Plus MD marca Thermo Scientific.
- Espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier con reflectancia total atenuada modelo Spectrum One marca Perkin Elmer.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Avance III HD 400 MHz con sonda SP BBO de 5 mm con gradientes de campo en Z marca Bruker.
- HPLC Waters 1525 con automuestreador Waters 717 plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996.
- Incubadora modelo MIDI 40 marca Thermo Scientific.
- Lector de placas Multiskan FC marca Thermo Scientific.
- Microscopio con objetivos 4X, 10X y 100X modelo CM 240 marca Eagle.
- Microscopio invertido modelo CKX41 marca Olympus.
- Placa de calentamiento marca Thermo Scientific.
- Potenciómetro Orion Star A211 marca Thermo Scientific.

- Refrigerador Daewoo.
- Rotavapor Heidolph Laborota 4000-efficient.
- Sistema de purificación de agua modelo Simplicity marca Merck Milipore.
- Vórtex VWR Scientific Products.

2.1.3 Reactivos

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) marca Sigma-Aldrich.
- Ácido cítrico marca CTR.
- Ácido fórmico 88.5% marca Fermont.
- Ácido gálico 97.5% marca Sigma-Aldrich.
- Ácido málico 99% marca Sigma-Aldrich.
- Ácido nítrico 65% marca J.T. Baker.
- Ácido sulfúrico 96% marca J.T. Baker.
- Agua bidestilada.
- Agua destilada.
- Agua deuterada 99.9% con 0.75% de ácido 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimetilsilil-propiónico marca Sigma-Aldrich.
- Antibiótico Penicilina – Estreptomina (10 000 U/mL – 10 000 µg/mL) 10X marca Gibco.
- Azul tripano 0.4% probado para cultivo celular marca Sigma-Aldrich.
- Bromuro de metiltiazoltetrazolio (MTT) 97.5% marca Sigma-Aldrich.
- Buffer de fosfatos en solución salina (PBS) 10X marca Sigma-Aldrich.

- Cafeína marca Sigma-Aldrich.
- Cloruro de colina 98% marca Sigma-Aldrich.
- Cloruro de hierro (III) 99.5% marca J.T. Baker.
- D-Fructosa 99% marca Sigma-Aldrich.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9% probado para cultivo celular marca Sigma-Aldrich.
- Doxorrubicina hidroclicorada 98% marca Sigma-Aldrich.
- D-Sorbitol 98% marca Sigma-Aldrich.
- Etanol absoluto marca Fermont.
- L-Glutamina 200 mM 100X marca Gibco.
- Limadura de magnesio marca Productos Químicos Monterrey.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (ADMEM) marca Gibco.
- Metanol 99.8% marca Fermont.
- Metanol grado HPLC 99.9% marca Tedia.
- Nitrato de bismuto pentahidratado 98% marca Productos Químicos de Monterrey.
- Quercetina 96% marca TCI América.
- Suero fetal bovino marca Gibco.
- Tricloruro de aluminio 99% marca Sigma-Aldrich.
- Tripsina 0.25% 1x marca Gibco.
- Urea 99.5% marca Sigma-Aldrich.
- Yoduro de potasio marca CTR.

2.1.4 Material biológico

Se emplearon las líneas celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano, ATCC HB-8065) y Vero (células de riñón del mono verde, ATCC CCL-81) de la American Type Culture Collection (ATCC).

2.2 Material herbal

Se empleó la parte aérea de *T. diffusa* y *L. frutescens*, así como las hojas de *C. boissieri*. El material fue recolectado en Cadereyta y Villaldama, Nuevo León en julio de 2025. Las plantas fueron secadas a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, posteriormente fueron molidas y almacenadas en un lugar fresco, seco y oscuro.

2.3 Preparación de los NADES

Se prepararon diversos NADES a través del método de calentamiento. Los NADES seleccionados se basaron de los reportados en la literatura, así como en la disponibilidad de reactivos, buscando preparar aquellas mezclas basadas en alcoholes, azúcares, ácidos orgánicos, aminas y amidas (Tabla II). Se pesaron ambos componentes de la mezcla, considerando la proporción molar, y se colocaron las sustancias en un matraz bola de fondo plano. Con ayuda de una placa de calentamiento, se mantuvo en agitación magnética a 600 rpm a 90°C en

baño de agua por 1 hora. La formación del NADES se confirmó cuando, al finalizar el proceso se obtuvo un líquido homogéneo y estable a temperatura ambiente. Los NADES formados se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

Se evaluaron inicialmente las mezclas mostradas en la Tabla II; únicamente aquellas que formaron sistemas homogéneos y estables fueron utilizadas en los experimentos posteriores

Tabla II. Mezclas eutécticas probadas.

HBA	HBD	Relación molar
Cloruro de colina	Urea	1:2
Cloruro de colina	Glicina	1:1
Cloruro de colina	Sacarosa	1:1
Cloruro de colina	Manitol	1:1
Cloruro de colina	Ácido málico	1:1
Cloruro de colina	Sorbitol	1:1
Cloruro de colina	Ácido cítrico	1:1
Cloruro de colina	Fructosa	1:1
Betaína	Urea	1:2
Betaína	Glicina	1:1
Betaína	Sacarosa	1:1
Betaína	Ácido cítrico	1:1

2.4 Caracterización fisicoquímica y espectroscópica de los NADES

2.4.1 pH

El pH se determinó en soluciones de NADES al 60% preparadas con agua desionizada. Se empleó un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific) el cual fue calibrado a tres puntos. Se realizó la medición de cada NADES por triplicado.

2.4.2 Espectroscopía de Infrarrojo

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo de los compuestos individuales del NADES, así como de la mezcla formada, con un espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Para ello, se colocó una pequeña cantidad de las sustancias o de la mezcla en el portamuestras del equipo y se procedió a obtener los espectros en un intervalo de 4000 a 550 cm^{-1} . Se realizaron 10 barridos para la obtención de cada espectro.

2.4.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Se obtuvieron los espectros de RMN de protón de las sustancias individuales, así como del NADES formado. De los componentes del NADES, se disolvió una pequeña cantidad de muestra en 600 μL en agua deuterada con 0.75% de ácido 2,2,3,3-tetradetero-3-trimetilsilil-propiónico (TSP). Respecto a los NADES

formados, se preparó una solución entre 80 y 90% con el mismo disolvente. Las soluciones se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm y se obtuvo su espectro.

El espectro de ^1H -RMN se obtuvo con la secuencia de pulsos estándar de Bruker para el espectro de protón, con las siguientes características: ángulo de giro de 90° , tiempo de adquisición de 4.08 s con 16 acumulaciones (scans).

2.5 Obtención de extractos

Se prepararon NADES al 80% y 60% con agua desionizada para realizar las extracciones. Para ello, se tomó un volumen determinado del NADES y se añadió el volumen correspondiente de agua para tener una proporción de NADES del 60 y 80%; se mezcló con ayuda de vórtex hasta que el líquido se observara homogéneo.

Las extracciones se realizaron en tubos cónicos de plástico tomando 1 g del material vegetal y añadiendo 20 mL del NADES puro y soluciones acuosas al 80% o al 60%. Se realizaron tres ciclos consecutivos de extracción por sonicación durante 30 minutos. Luego de cada extracción se centrifugó el tubo a 3500 rpm por 10 min y posteriormente se recuperó el sobrenadante y se añadió de nueva cuenta NADES según cada caso. Se recuperaron los extractos en tubo Corning y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Cada extracción se realizó por triplicado. De la misma forma, se realizaron extracciones con metanol puro, al 80% y 60% de cada material vegetal de estudio. Se siguieron las mismas condiciones de extracción.

2.6 Evaluación cromatográfica de los extractos

Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución usando un equipo Waters Alliance 1525 empleando un detector de arreglo de diodos 2996. Se empleó una columna de Hypersil-Gold C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m) y una fase móvil en gradiente de metanol y ácido fórmico 0.1% (Tabla III). Se empleó un flujo de 0.2 mL/min y un volumen de inyección de 5 μ L. Los cromatogramas se obtuvieron a 254 nm.

Tabla III. Programa cromatográfico.

Tiempo (min)	Ácido fórmico 0.1% (%)	Metanol (%)
0	70	30
20	40	60
25	30	70
30	30	70
40	70	30
45	70	30

2.7 Análisis fitoquímico de los extractos

Se realizaron diferentes pruebas fitoquímicas cualitativas para determinar la presencia de terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides y azúcares en los

extractos obtenidos. Se siguieron procedimientos reportados en la literatura (Krishnaswamy, 2012; De la Rosa, 2022).

2.7.1 Prueba de vainillina-ácido sulfúrico

Se siguió el procedimiento descrito por Krishnaswamy (2012) con ligeras modificaciones. Se sembró cada extracto en una cromatoplaaca de fase inversa (TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S). Posteriormente se dejó correr con una fase móvil de metanol al 50% ligeramente acidificada. Las placas se rociaron con ácido sulfúrico al 2% en etanol, posteriormente fueron calentadas y se adicionó vainillina al 2% en etanol. La formación de un color azul permitió establecer la positividad de la prueba. Como control positivo a la prueba, se empleó geraniol.

2.7.2 Prueba de tricloruro de aluminio

Se realizó un proceso modificado de Krishnaswamy (2012). En un tubo se mezclaron 5 gotas de extracto y 5 gotas del AlCl₃ 2% en etanol. La aparición de un color amarillo indicó la presencia de flavonoides en el extracto. Se empleó rutina como control positivo.

2.7.3 Prueba de tricloruro férrico

Se siguió el proceso descrito por De la Rosa (2022). En un tubo se mezclaron 5 gotas del extracto con 5 gotas de FeCl₃ 2% en agua. La formación de un color

rojo, verde o azul indicó la presencia de taninos en el extracto. Se empleó ácido gálico como control positivo a la prueba.

2.7.4 Prueba de Dragendorff

Siguiendo el proceso descrito por De la Rosa (2022), se sembró cada extracto en una cromatoplaaca de fase inversa, luego se dejó correr usando una fase móvil de metanol 50% ligeramente acidificada. Las placas se revelaron usando el reactivo de Dragendorff. La aparición de un precipitado café cercano al punto de sembrado indicó la presencia de alcaloides. Debido a la posible interferencia ocasionada por los componentes de los NADES, se evaluó tanto el NADES correspondiente como una solución de cafeína como control positivo a la prueba.

2.7.5 Prueba de fenol-ácido sulfúrico

Se siguió el procedimiento descrito por De la Rosa (2022). Se mezcló en tubos de ensayo 200 μ L de cada extracto con 100 μ L de fenol al 5% seguido de 500 μ L de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color rojo indicó la presencia de azúcares en los extractos. Como control positivo a la prueba se empleó sacarosa.

2.8 Evaluación de las actividades biológicas de los extractos

2.8.1 Determinación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH

Se siguió la metodología de Granados-Guzmán (2017) usando una técnica a microescala en placas de 96 pozos. Considerando que no se eliminaría el disolvente NADES de los extractos, se trabajó con ellos considerando el extracto como un 100% de concentración. Se añadieron 100 μ L de etanol a los 96 pozos. Se tomaron 100 μ L de los extractos de NADES y metanólicos y se añadieron al primer pozo de cada fila. A partir de esta solución se realizó una serie de diluciones seriadas (factor 1:2) en los 7 pozos restantes (concentraciones 25 a 0.20%). Posteriormente, a cada uno de los pozos se agregó 100 μ L de DPPH 280 μ M y se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se leyó la placa en lector de placas a 540 nm. Como control positivo se empleó quercetina y etanol como blanco.

La CE_{50} se estableció a partir de la capacidad reductora de los extractos, que se determinó por medio del porcentaje de reducción, según la ecuación 1.

$$\% \text{ Reducción} = \frac{(\text{Abs control negativo} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control negativo}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Los porcentajes de reducción se graficaron contra la concentración del extracto en cada pozo; a partir del gráfico se calculó la ecuación de la recta y se determinó la concentración del extracto necesaria para obtener un 50% de reducción.

2.8.2 Cultivo celular

2.8.2.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Se descongeló una alícuota de cada línea celular y se propagó en varios frascos de cultivo; una vez que el cultivo llegó a una confluencia entre el 70 y 80% se retiró el medio usando una bomba de aspiración. Posteriormente se lavaron las células dos veces con solución buffer de fosfatos (PBS), se les añadió 3 mL de tripsina y se incubaron por 5 minutos a 37 °C con 5% de CO₂.

Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 6 mL de medio de cultivo DMEM Advanced (ADMEM) con suero fetal bovino (SFB) al 1% para neutralizar la tripsina. Esta solución se recolectó en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó por 3 minutos a 2000 rpm a 25 °C. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 4 mL de medio de cultivo.

2.8.2.2 Conteo celular

Para llevarlo a cabo se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular. En un tubo Eppendorf se mezclaron 170 µL de medio de cultivo, 10 µL de azul tripano y se añadieron 20 µL de la suspensión celular. De esta solución se tomaron 10 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer por capilaridad.

Para el conteo solo se tomaron en cuenta las células que no estuvieran teñidas con el colorante y que se encontraran en los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 de la cámara de Neubauer (Figura 10).

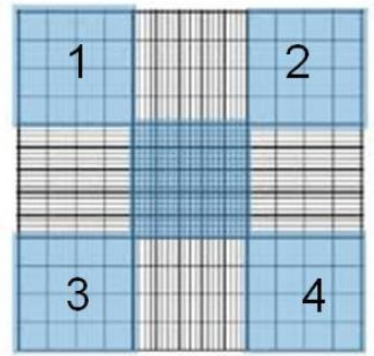


Figura 10. Cámara de Neubauer.

El cálculo del número de células por mililitro se realizó siguiendo la ecuación 2.

$$\# \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{Total de células}}{4} \right) \times \text{Factor de dilución} \times 10^4 \quad \text{Ecuación 2}$$

2.8.3 Determinación de la citotoxicidad de los extractos

Se determinó la citotoxicidad de los extractos de NADES y metanólicos siguiendo la metodología descrita por Mossman (1983), a través del ensayo de reducción de sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolio (MTT).

Se agregaron 5000 células Vero o HepG2 por pocillo, calculadas por medio de la ecuación 2, en placas de 96 pozos. Tras una incubación a 37 °C con 5% de CO₂ por 24 horas para su adhesión en las placas, se les retiró el medio y se les añadió 100 µL de medio nuevo. Se añadieron 100 µL de los extractos a los primeros pozos de cada columna y se realizó una dilución seriada en los 7

pocillos restantes (concentraciones de 25 a 0.20%). Como control positivo se empleó doxorubicina y como control negativo células solamente expuestas a medio de cultivo.

La placa se incubó por 48 horas más a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente se lavó dos veces con PBS y se agregaron 100 µL de MTT de concentración 0.5 mg/mL y se incubó por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de DMSO, se agitó por 8 min a 220 rpm y se leyó en lector de placas a una λ de 570 nm, donde la absorbancia es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas. A partir de los datos, se calculó la CC₅₀, definida como la concentración de extracto necesaria para disminuir la viabilidad de las células a un 50%, según la ecuación 3.

$$Viabilidad\ celular = \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control\ negativo} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Preparación y caracterización de los NADES

De las doce combinaciones evaluadas, únicamente seis formaron sistemas líquidos homogéneos y estables a temperatura ambiente (Tabla IV). Se obtuvieron cinco NADES a base de cloruro de colina y uno a base de betaína. Debido a la naturaleza de la molécula empleada como HBD, los seis NADES se clasificaron en NADES básicos (empleando urea), NADES neutros (aquellos que emplearon azúcares) y NADES ácidos (aquellos que emplearon ácidos orgánicos).

Tabla IV. Características de los NADES preparados.

HBA	HBD	Relación molar HBA:HBD (M)	Abreviatura	Aspecto físico
Cloruro de colina	Urea	1:2	ChCl:Ur	Líquido viscoso y transparente
Betaína	Urea	1:2	Bet:Ur	Líquido viscoso y transparente
Cloruro de colina	Ácido málico	1:1	ChCl:AM	Líquido viscoso y amarillo
Cloruro de colina	Sorbitol	1:1	ChCl:Sor	Líquido viscoso y transparente
Cloruro de colina	Ácido cítrico	1:1	ChCl:AC	Líquido viscoso y transparente
Cloruro de colina	Fructosa	1:1	ChCl:Fru	Líquido viscoso y amarillo

3.1.1 pH de los NADES

Se midió el pH por triplicado de cada uno de los NADES al 60%, diluyéndolos con agua desionizada. Los resultados se resumen en la Tabla V.

Los NADES basados en ácidos orgánicos (ChCl:AM 1:1 M y ChCl:AC 1:1 M) presentaron los valores de pH más bajos, mientras que los sistemas basados en Urea mostraron valores alcalinos.

Tabla V. pH de los NADES.

NADES	pH
ChCl:Ur	10.37 ± 0.07
Bet:Ur	9.11 ± 0.07
ChCl:Sor	3.64 ± 0.12
ChCl:Fru	3.34 ± 0.13
ChCl:AM	0.68 ± 0.04
ChCl:AC	0.29 ± 0.03
Agua desionizada	6.77 ± 0.27

n=3. Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar

3.1.2 Espectros de IR de los NADES

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo de cada componente de los NADES, así como del NADES formado.

En el espectro de cloruro de colina se observó, entre otras señales, una señal amplia en la región correspondiente a los grupos hidroxilo (~3200 – 3300 cm⁻¹), mientras que en el espectro de urea se observaron señales características del

grupo amino en la región de $\sim 3500 - 3400 \text{ cm}^{-1}$, y del grupo carbonilo en $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$. En el espectro del sistema ChCl:Ur 1:2 M (Figura 11) se observó la conjunción y ensanchamiento de la banda correspondiente a los grupos hidroxilo y amino ($\sim 3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$) respecto a los componentes individuales, así como de la señal del carbonilo en $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, sugiriendo la formación de una red de puentes de hidrógeno.

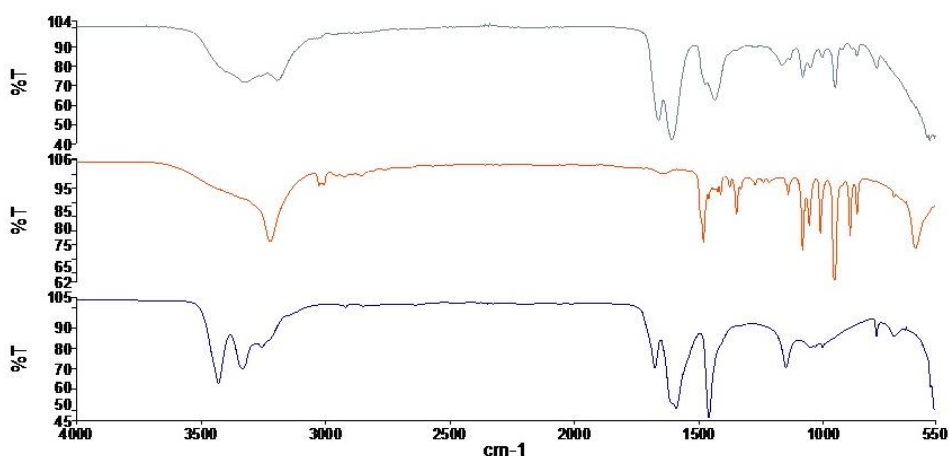


Figura 11. Espectro de IR del Cloruro de colina (naranja), Urea (azul) y NADES ChCl:Ur 1:2 M (verde).

El espectro de cloruro de colina presentó las señales anteriormente descritas, mientras que en el espectro de sorbitol se observó una señal intensa y ancha ($\sim 3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) correspondiente al grupo hidroxilo. En el espectro del NADES ChCl:Sor 1:1 M (Figura 12) se observó la conjunción de los espectros de los componentes individuales destacando la señal entre $\sim 3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ perteneciente al grupo hidroxilo.



Figura 12. Espectro de IR del Cloruro de colina (rosa), Sorbitol (morado) y NADES ChCl: Sor 1:1 M (amarillo).

Siguiendo el mismo patrón de señales que el NADES anterior, tanto en el espectro de cloruro de colina como el de fructosa se presentaron señales correspondientes al grupo hidroxilo entre $3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$. En el espectro del NADES ChCl:Fru 1:1 M (Figura 13) se observó una señal amplia y ensanchada entre 3500 y 3000 cm^{-1} perteneciente al grupo hidroxilo, observándose este espectro como una conjunción de los espectros de los componentes individuales.

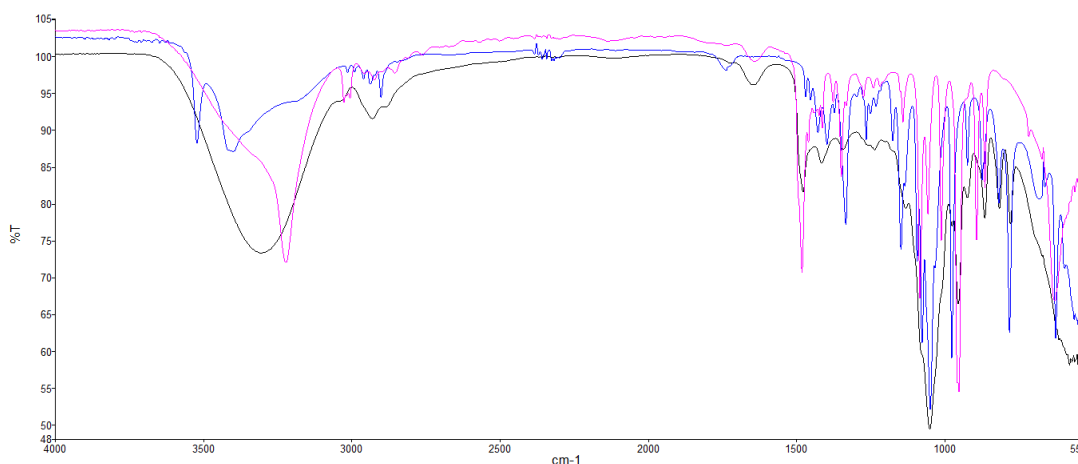


Figura 13. Espectro de IR del Cloruro de colina (rosa), Fructosa (azul) y NADES ChCl:Fru 1:1 M (negro).

En el espectro de ácido málico se observaron tanto señales correspondientes al grupo hidroxilo ($\sim 3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$), así como del grupo carbonilo ($\sim 1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$). En el espectro de cloruro de colina se presentaron las señales anteriormente descritas. En el espectro del NADES ChCl:AM 1:1 M (Figura 14) se observó la conjunción de los dos espectros, así como el ensanchamiento de la señal del grupo hidroxilo ($\sim 3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) y el ligero desplazamiento de la señal perteneciente al grupo carbonilo.

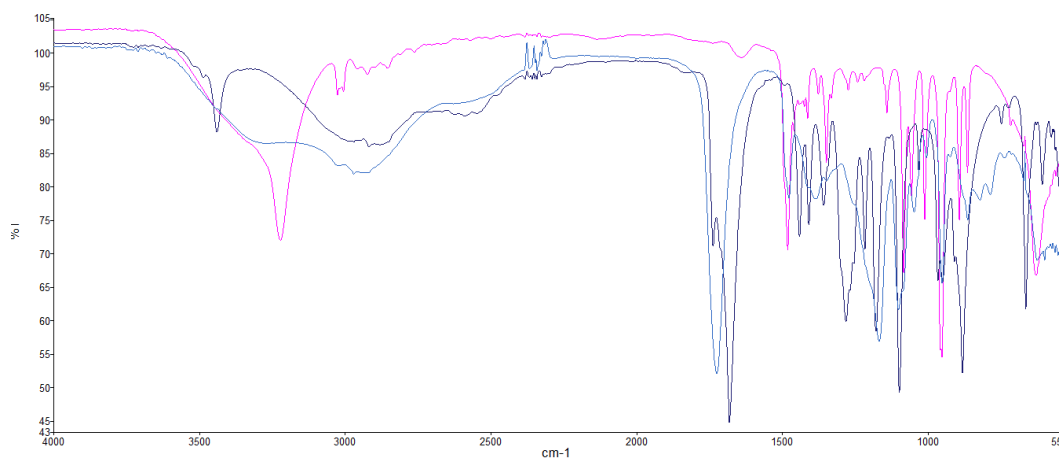


Figura 14. Espectro de IR del Cloruro de colina (rosa), Ácido málico (azul) y NADES ChCl:AM 1:1 M (celeste).

De forma similar al caso anterior, en el espectro de ácido cítrico se observaron tanto señales correspondientes del grupo carbonilo ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) y al grupo hidroxilo ($\sim 3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$). En el espectro de cloruro de colina se presentaron las señales anteriormente descritas. En el espectro del NADES ChCl:AC 1:1 M (Figura 15) se observaron estas señales de forma ensanchada y amplia.

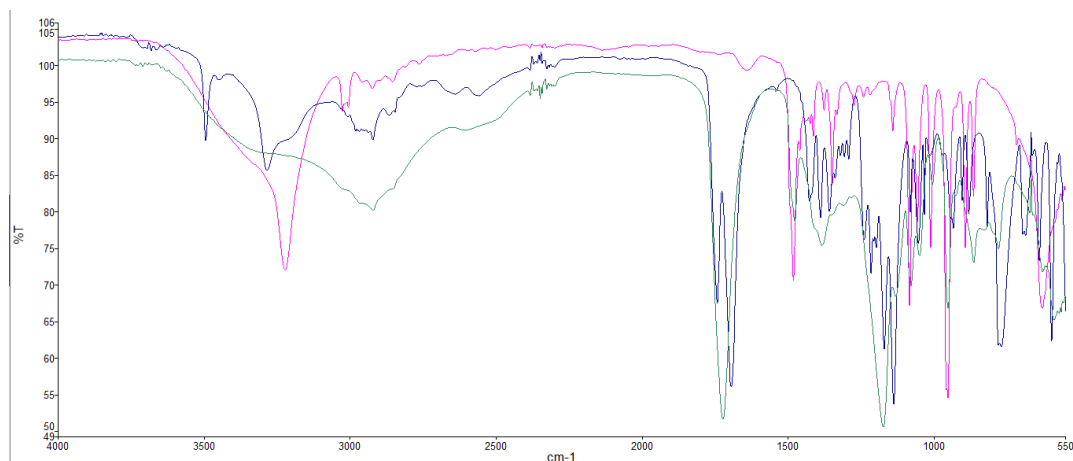


Figura 15. Espectro de IR del Cloruro de colina (rosa), Ácido cítrico (azul) y NADES ChCl:AC 1:1 M (verde).

En el espectro de betaína se observaron diversas señales correspondientes a los grupos hidroxilo ($\sim 3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$) y carbonilo ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$). Las señales en el espectro de urea se describieron anteriormente. Respecto al NADES Bet:Ur 1:2 M (Figura 16), se observaron las señales de los espectros individuales, con un ensanchamiento de las bandas en la región ($\sim 3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) correspondiente a los grupos hidroxilo y amino, así como de la señal en $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ del grupo carbonilo.



Figura 16. Espectro de IR de Betaína (rosa), Urea (magenta) y NADES Bet:Ur 1:2 M (naranja).

3.1.4 Espectros de ^1H -RMN de los NADES

Se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN de cada componente de los NADES, así como del NADES formado (Figura 17). En el espectro de cloruro de colina se observaron tanto las señales de los hidrógenos de la cadena alquílica (3 – 3.5 ppm), así como del grupo hidroxilo (5.6 ppm), en tanto que en la Urea se observó la señal del hidrógeno del grupo amino (5.5 ppm). También se observaron las señales del disolvente a aproximadamente 3.4 ppm. En el espectro del NADES ChCl:Ur 1:2 M aparecieron estas señales descritas, así como el desplazamiento de las señales correspondientes del grupo hidroxilo y amino, lo cual sugiere la formación de puentes de hidrógeno.

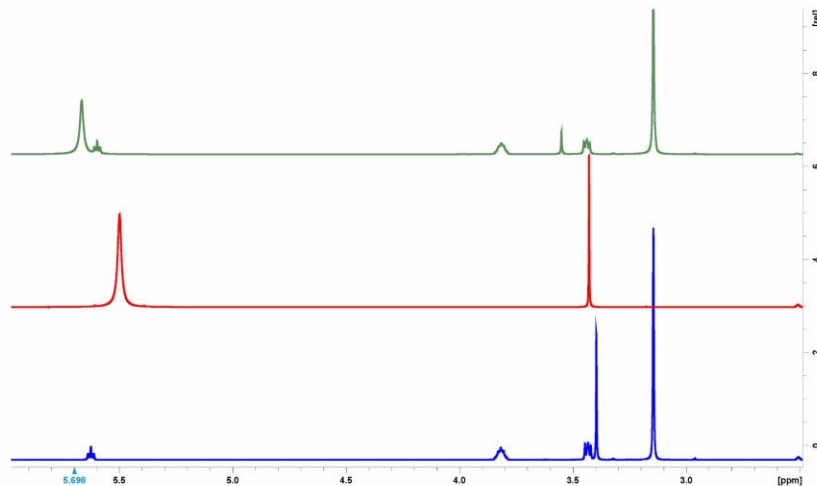


Figura 17. Espectro de ^1H -RMN de NADES ChCl:Ur 1:2 M (verde), Urea (rojo) y Cloruro de colina (azul).

3.2 Obtención de extractos

Se obtuvieron extractos del material vegetal empleando el NADES de ChCl:Ur 1:2 M y con adición de agua en un 20% y 40% para observar la diferencia en los procesos de extracción. Como controles de extracción se prepararon extractos utilizando metanol y metanol al 60%. Se obtuvieron cinco extractos de cada planta. Se obtuvieron extractos viscosos y de un color amarillo en el caso de las extracciones con el NADES, mientras que, al adicionar agua, la coloración de los extractos se tornó marrón y con una menor viscosidad. En el caso de las extracciones metanólicas, se observó un efecto similar, donde las extracciones con el disolvente puro presentaron un color verde que se tornó pardo en los extractos con agua adicionada.

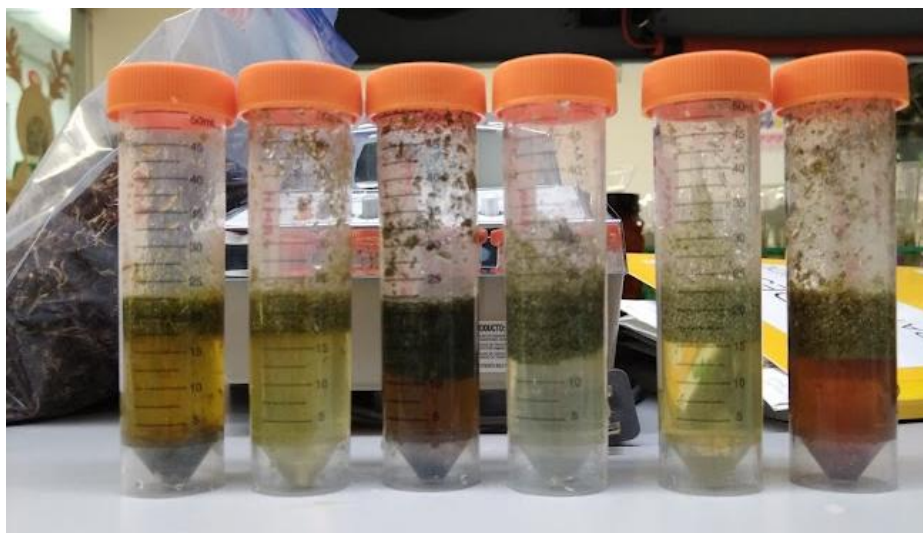


Figura 18. Extractos obtenidos con los diferentes NADES.

3.3 Análisis cromatográfico de los extractos

Los cromatogramas obtenidos permitieron comparar el perfil químico de los extractos preparados con los distintos sistemas extractantes.

En la comparación de los extractos metanólicos de *T. diffusa*, se observó una similitud entre los perfiles cromatográficos (Figura 19), la adición de agua al metanol permitió obtener una mayor intensidad de las señales al compararse con el metanol puro.

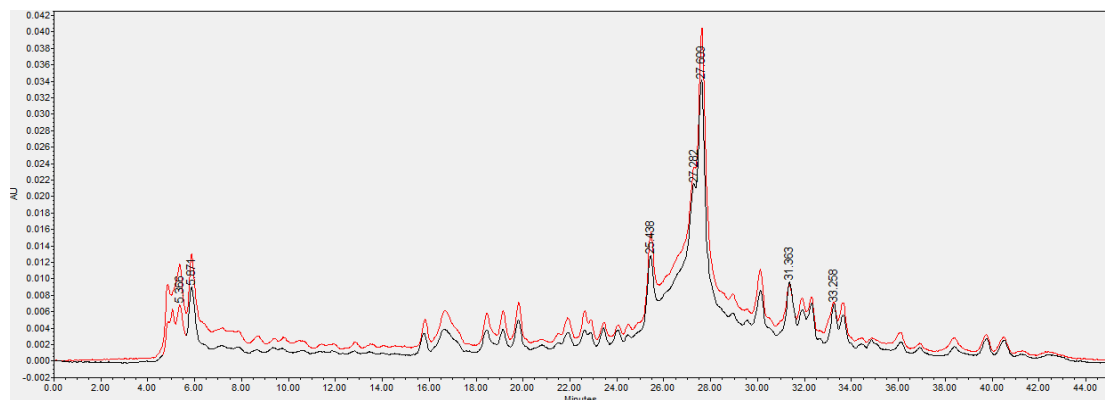


Figura 19. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Turnera diffusa* con metanol (negro) y metanol al 60% (rojo).

En el caso de *L. frutescens* se observó un efecto similar para la mayoría de las señales cromatográficas (Figura 20). Para esta planta, la intensidad de la señal principal disminuyó con la adición de agua, sin embargo, otras señales se observaron aumentadas en intensidad.

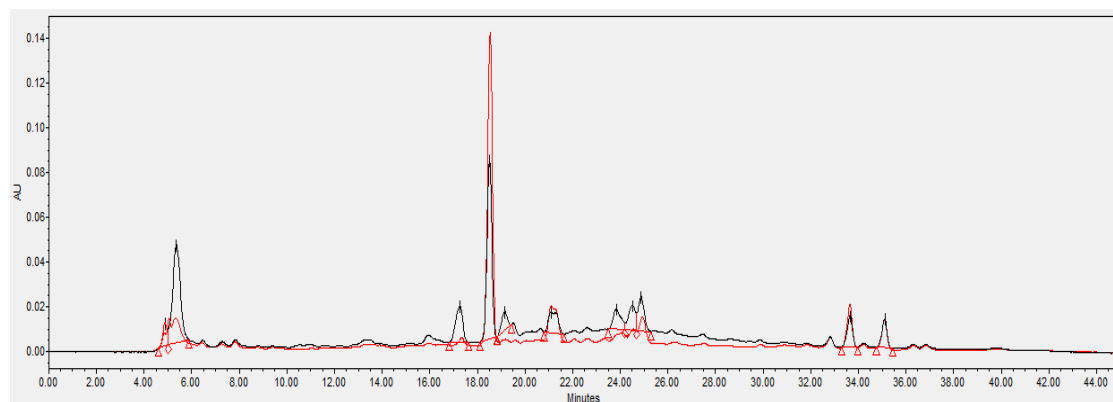


Figura 20. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Leucophyllum frutescens* con metanol (rojo) y metanol al 60% (negro).

Para *C. boissieri* se mantuvo la tendencia de observar una mayor intensidad de las señales cromatográficas con la adición de agua, al compararse con el

disolvente puro (Figura 21), no observándose la aparición de señales nuevas o una notoria diferencia en los perfiles cromatográficos.

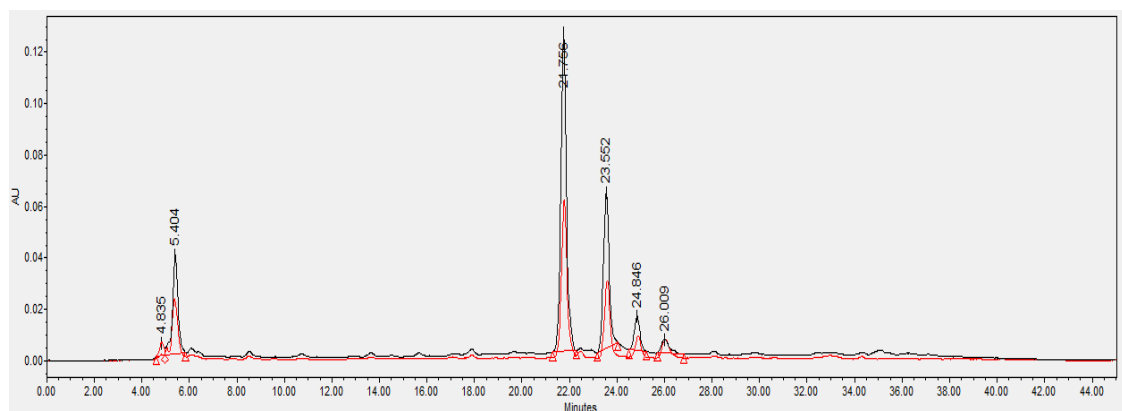


Figura 21. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Cordia boissieri* con metanol (rojo) y metanol al 60% (negro).

Al no haber diferencias visuales notorias en los cromatogramas de las extracciones empleando disolventes al 60%, se decidió continuar con las extracciones con el NADES al 60%.

Se obtuvieron los cromatogramas de los NADES, inyectados a modo de blanco (Figuras 22 a 27). Se observó en todos los casos que los NADES presentaron únicamente señales cercanas al tiempo muerto, sin la presencia de otros picos cromatográficos a lo largo de la corrida, lo que indica que los componentes de los NADES presentan una retención mínima o nula en la columna cromatográfica bajo las condiciones analíticas empleadas.

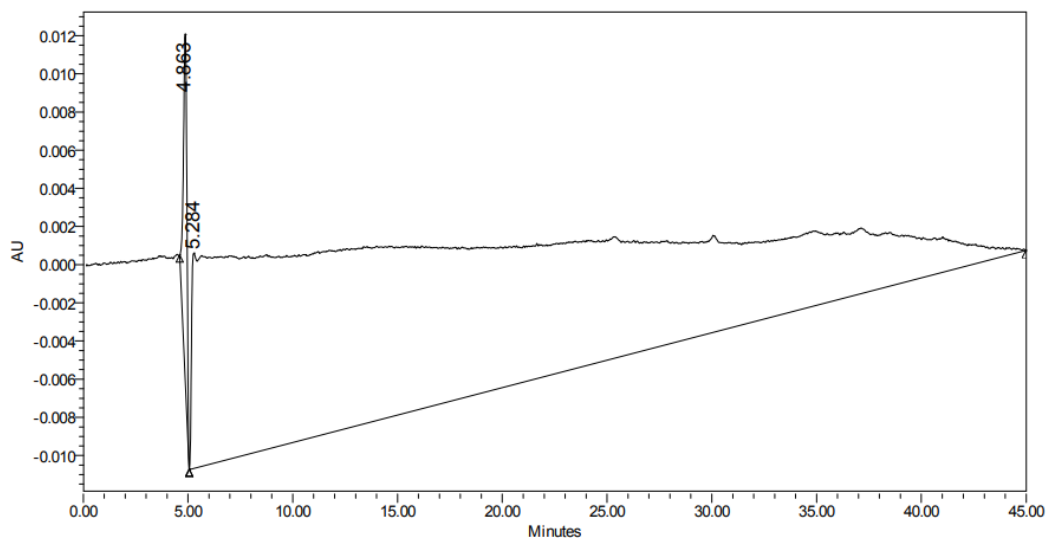


Figura 22. Cromatograma de NADES ChCl:Ur 1:2 M (NADES básico).

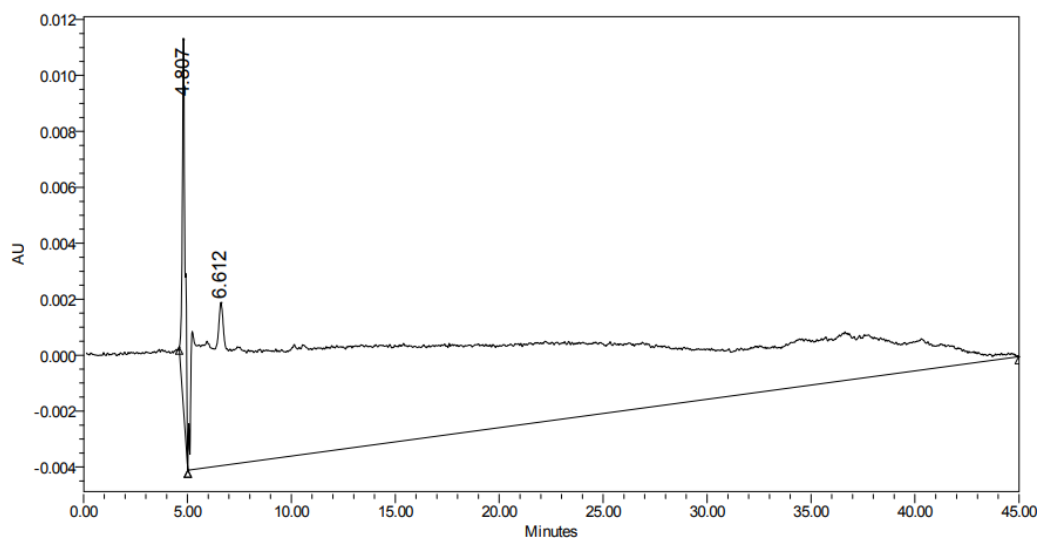


Figura 23. Cromatograma de NADES ChCl:Sor 1:1 M (NADES neutro).

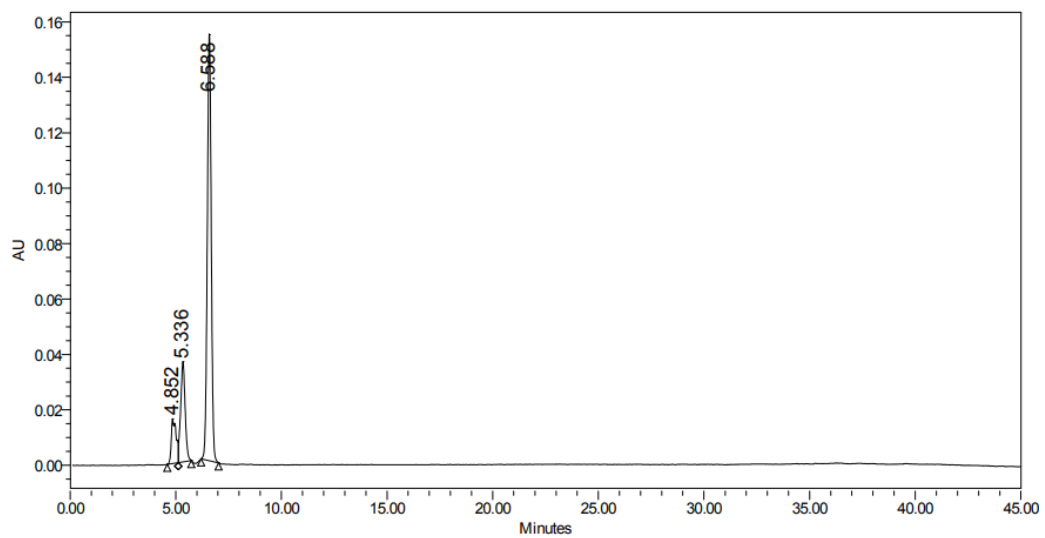


Figura 24. Cromatograma de NADES ChCl:Fru 1:1 M (NADES neutro).

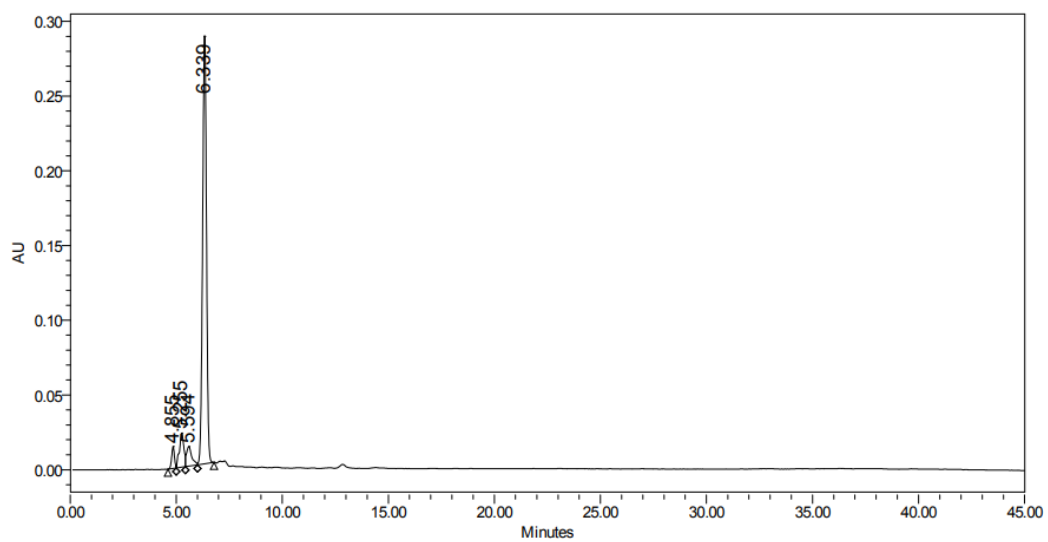


Figura 25. Cromatograma de NADES ChCl:AM 1:1 M (NADES ácido).

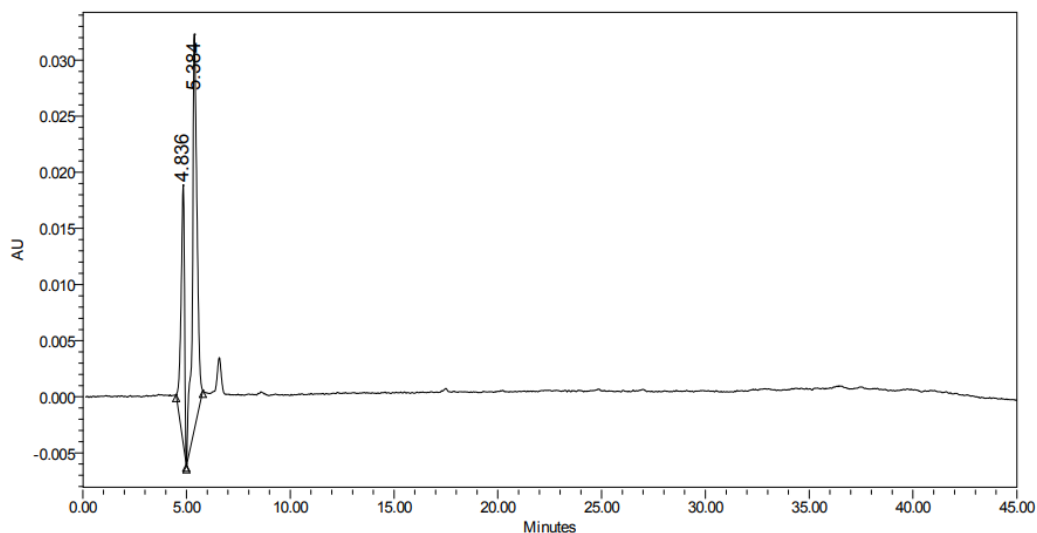


Figura 26. Cromatograma de NADES ChCl:AC 1:1 M (NADES ácido).

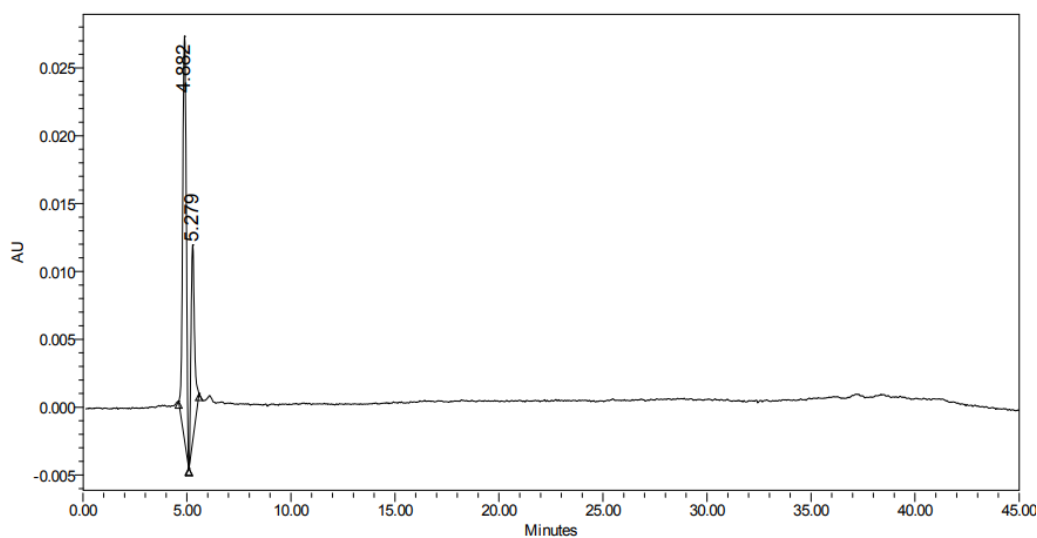


Figura 27. Cromatograma de NADES Bet:Ur 1:2 M (NADES básico).

Se analizaron los extractos obtenidos de cada material vegetal con los NADES al 60%. En el caso de *T. diffusa* se observaron diversas señales en el extracto metanólico, destacando un pico cromatográfico principal, el cual se observó en todos los extractos de NADES (Figura 28). En los extractos obtenidos con NADES básicos, dicho pico presentó una disminución en el tiempo de

retención respecto al extracto metanólico. Se comprobó la identidad de los picos cromatográficos mediante la comparación de los espectros ultravioleta.

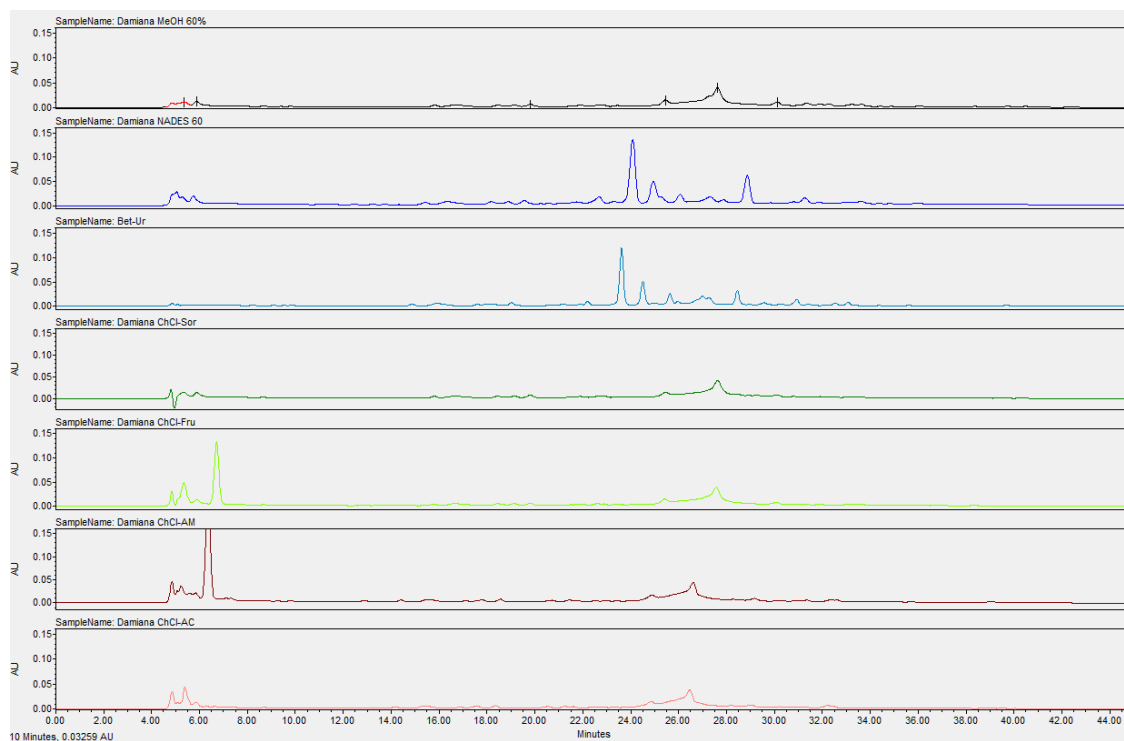


Figura 28. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Turnera diffusa*.

En el extracto metanólico de *T. diffusa*, el pico principal se observó no resuelto, con un tiempo de retención de 27.662 min y una altura de pico de aproximadamente 0.040 AU (Figura 29).

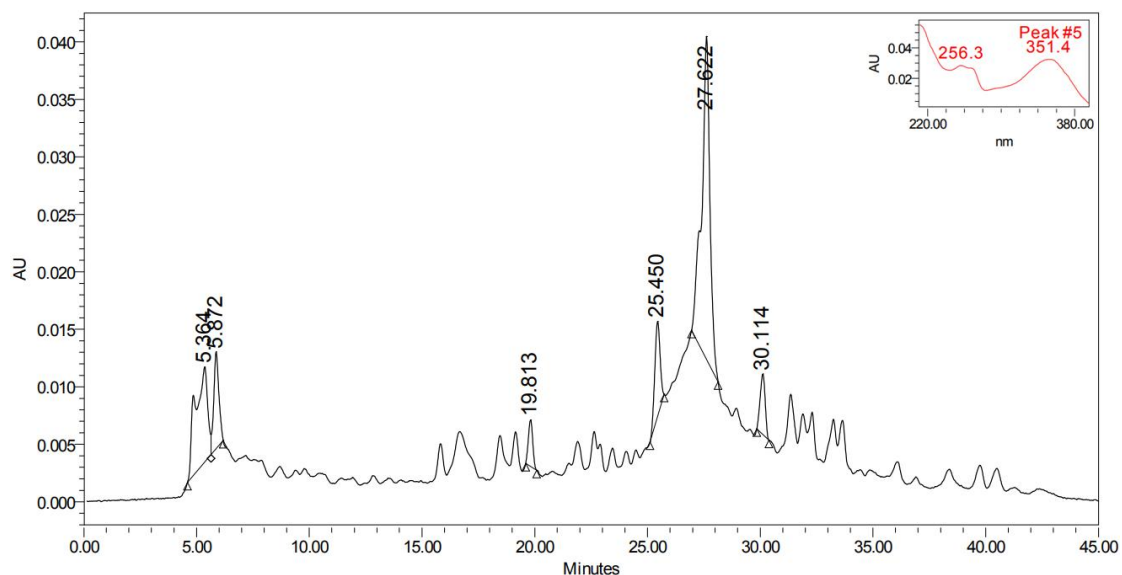


Figura 29. Cromatograma de extracto metanólico de *Turnera diffusa*.

En los extractos de NADES básicos de *T. diffusa*, el pico principal se observó resuelto, así como un desplazamiento a un tiempo de retención menor (24 min). Además, la altura del pico principal fue mayor en ambos casos, obteniéndose una altura de 0.135 AU en el extracto de ChCl:Ur 1:2 M (Figura 30) y de 0.240 AU en el extracto de Bet:Ur 1:2 M (Figura 31), lo cual corresponde a un incremento de 237 y 500% de altura respectivamente.

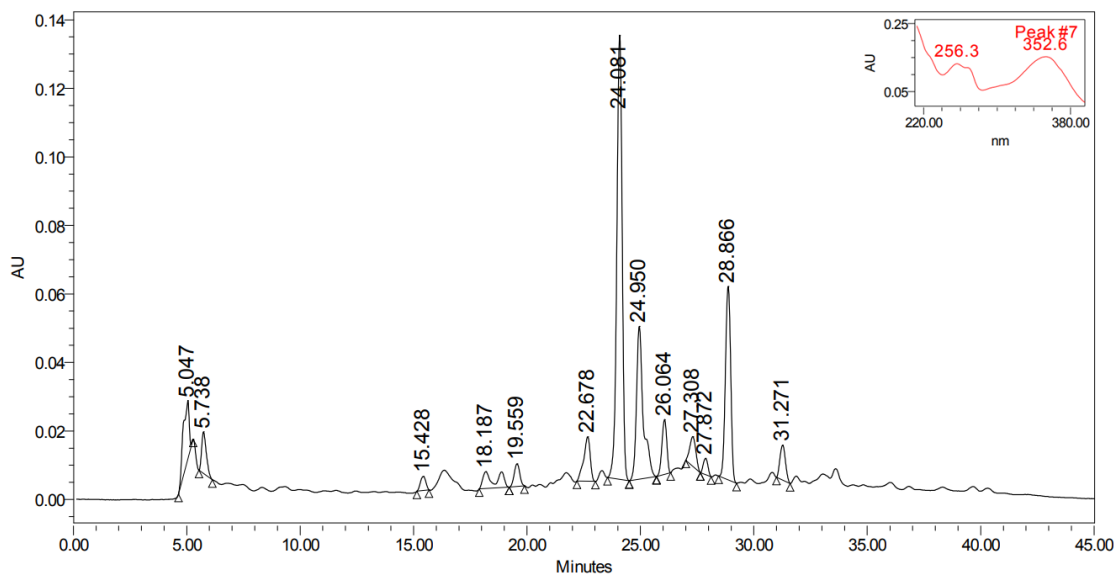


Figura 30. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con ChCl:Ur 1:2 M (NADES básico).

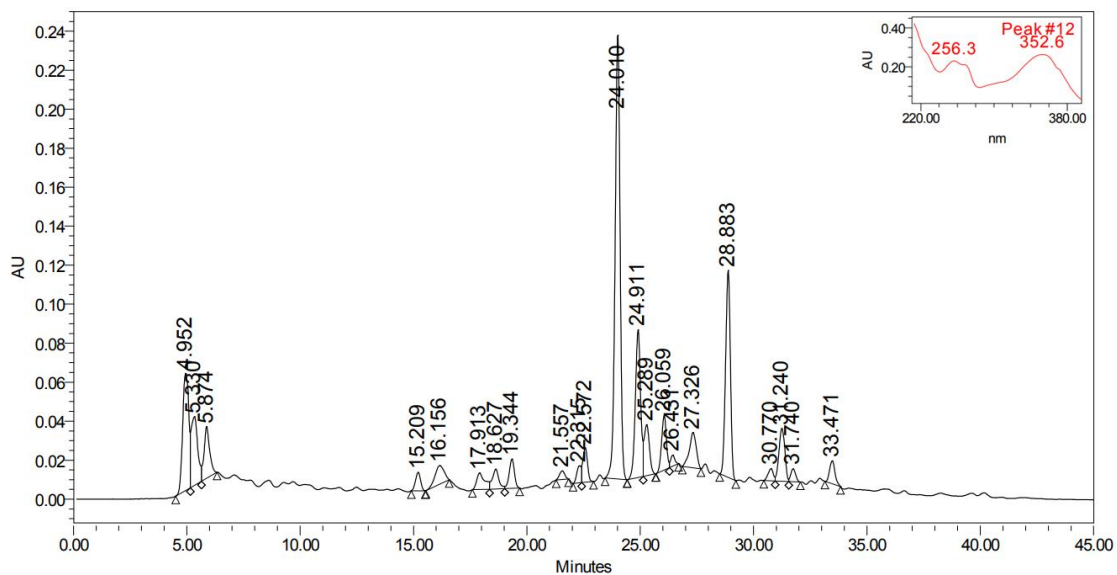


Figura 31. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con Bet:Ur 1:2 M (NADES básico).

En los extractos de NADES neutros de *T. diffusa*, no se observaron diferencias notables comparado con el extracto metanólico. El pico se observó no resuelto tanto con el sistema ChCl:Sur 1:1 M (Figura 32), como con el de ChCl:Fru 1:1 M

(Figura 33). Asimismo, la altura del pico principal fue similar a la obtenida empleando metanol.

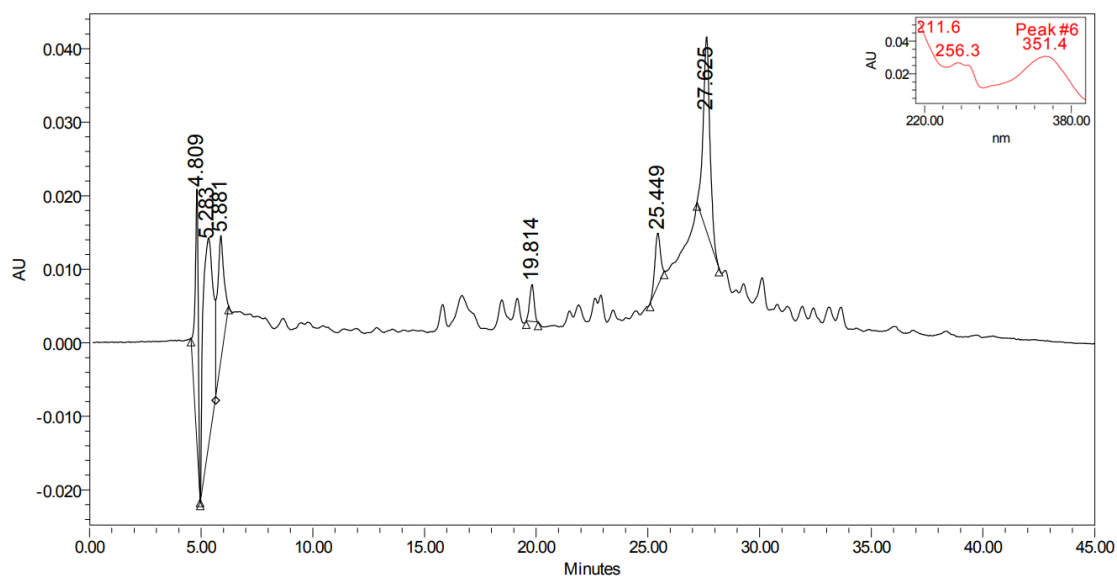


Figura 32. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con ChCl: Sor 1:1 M (NADES neutro).

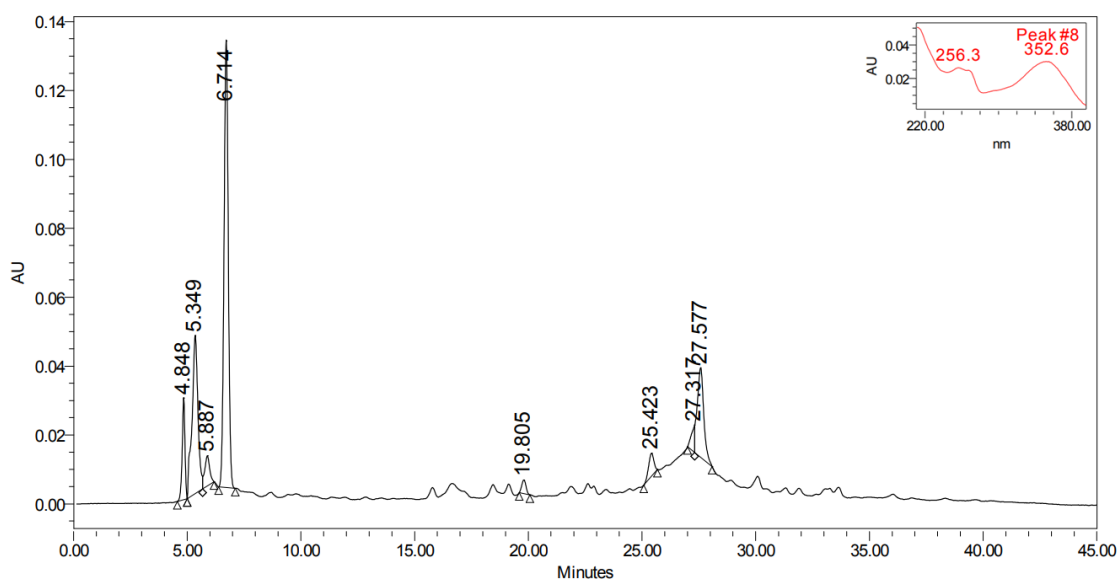


Figura 33. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con ChCl: Fru 1:1 M (NADES neutro).

Respecto a los extractos de NADES ácidos de *T. diffusa* (Figuras 34 y 35), el perfil cromatográfico fue muy similar al obtenido para el extracto metanólico, donde el pico principal se observó no resuelto y con una altura aproximada de 0.040 AU.

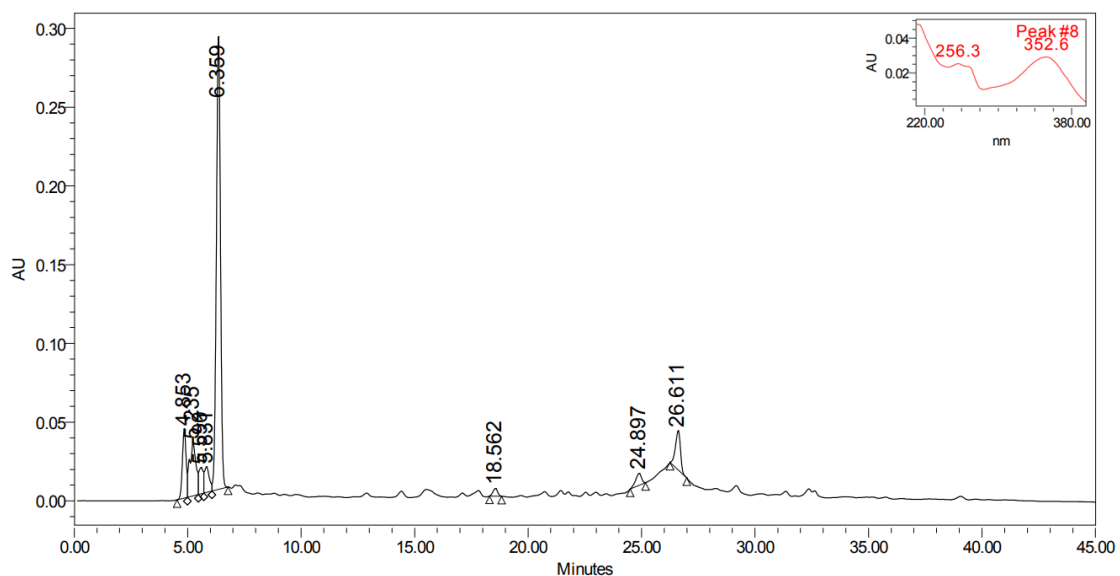


Figura 34. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con ChCl:AM 1:1 M (NADES ácido).

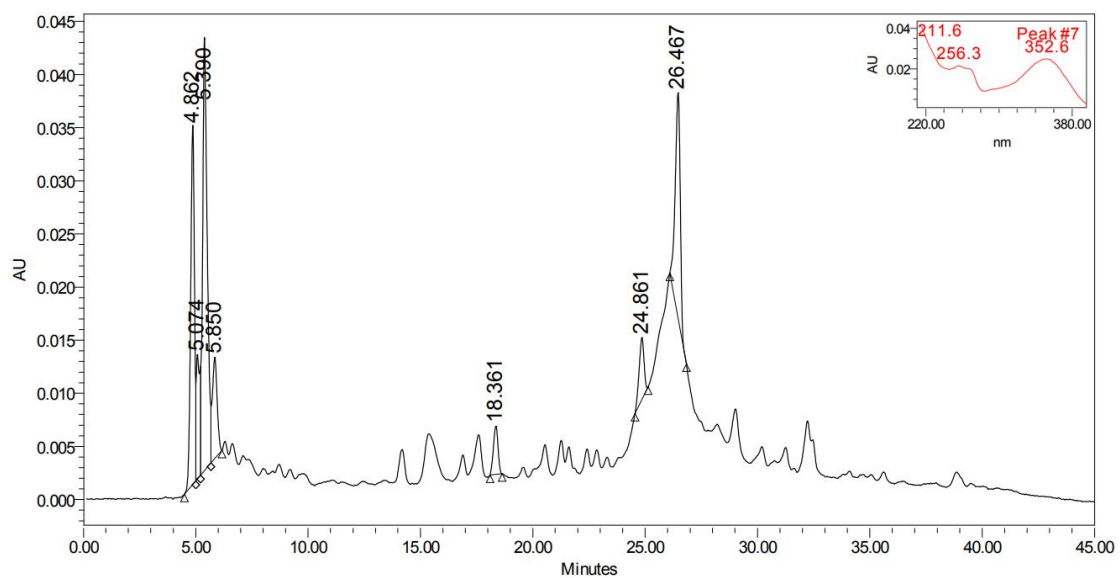


Figura 35. Cromatograma de extracto de *Turnera diffusa* con ChCl:AC 1:1 M (NADES ácido).

En el caso de *L. frutescens* se observó la presencia de una señal principal en el extracto metanólico, así como otras señales de menor intensidad. Dichas señales se mantuvieron en los extractos con los diferentes NADES (Figura 36). Se comprobó la identidad de este pico cromatográfico principal en los extractos a través de la comparación de su espectro de ultravioleta.

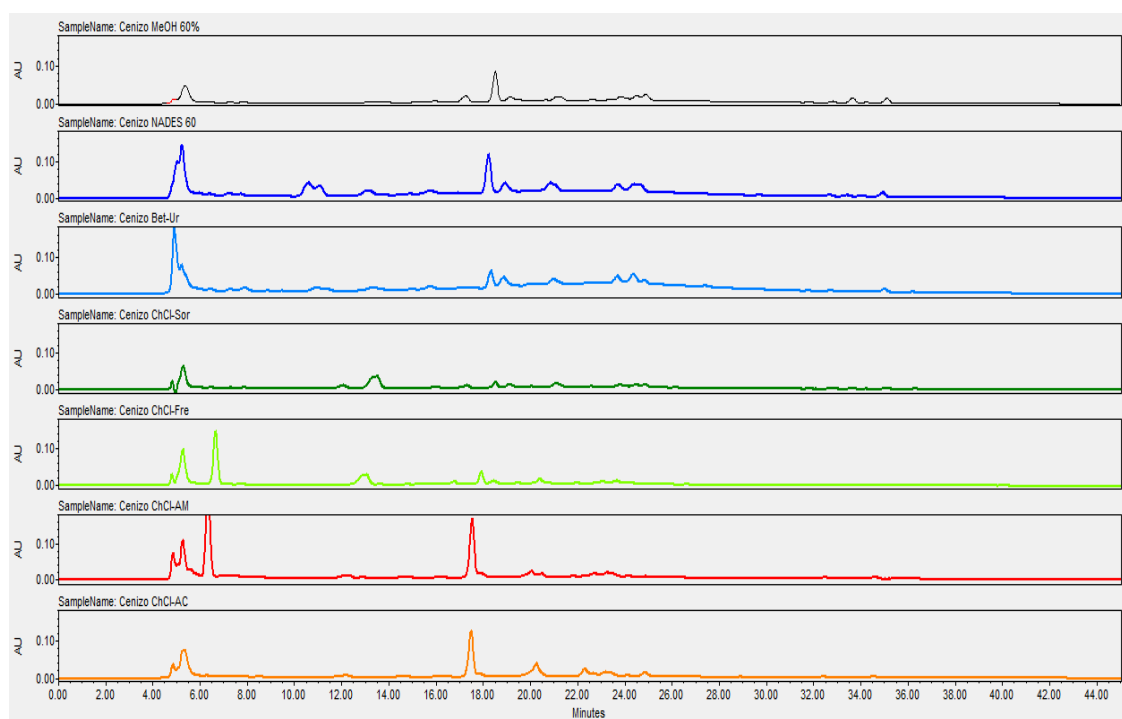


Figura 36. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Leucophyllum frutescens*.

En el extracto metanólico de *L. frutescens* (Figura 37) se presentó un pico cromatográfico principal, resuelto, con tiempo de retención de 18.511 min y una altura aproximada de 0.086 AU.

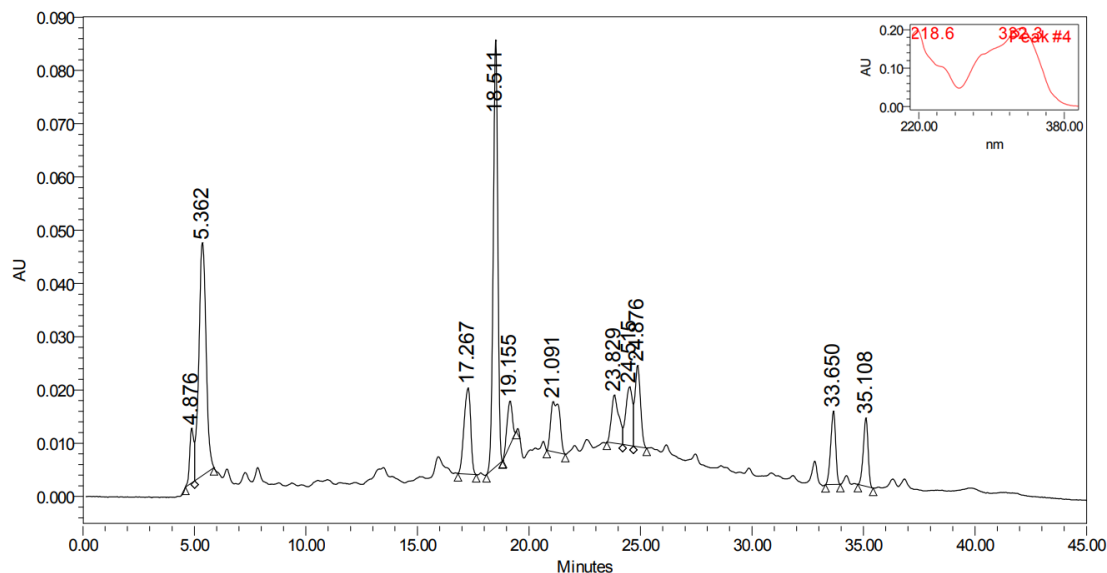


Figura 37. Cromatograma de extracto metanólico de *Leucophyllum frutescens*.

En el extracto de NADES de ChCl:Ur 1:2 M (Figura 38), se presentó un pico cromatográfico principal con tiempo de retención de 18.190 min y un área dos veces mayor comparado con el extracto metanólico.

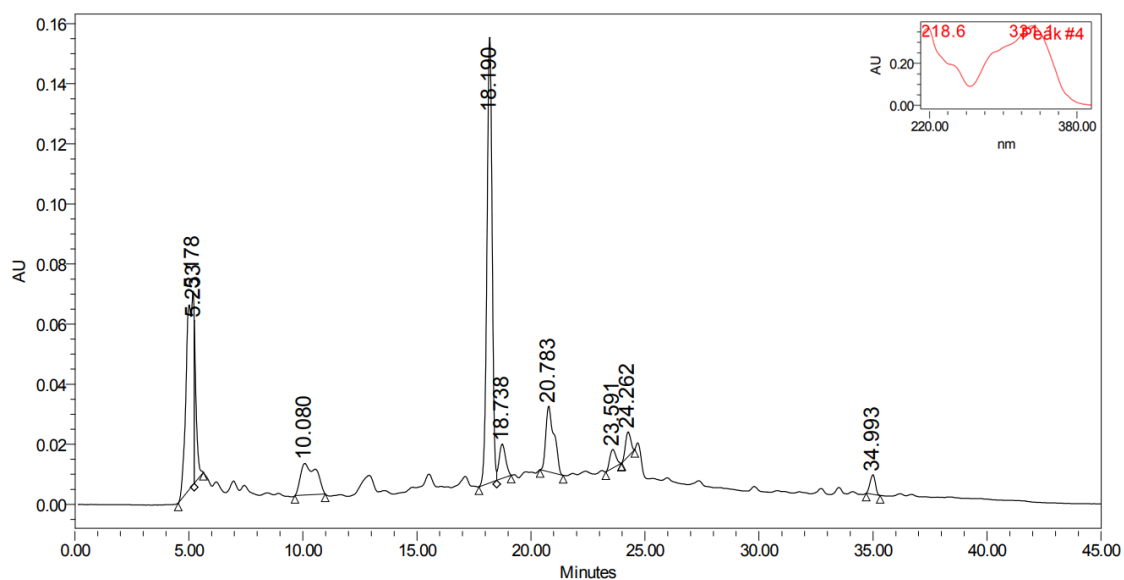


Figura 38. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con ChCl:Ur 1:2 M (NADES básico).

Por otra parte, en el extracto de NADES de Bet:Ur 1:2 M (Figura 39), se presentó un pico cromatográfico principal con tiempo de retención de 18.329 min. Sin embargo, al compararlo con el extracto metanólico, presentó una menor intensidad cromatográfica, observándose un área de pico 40% inferior a la obtenida en el extracto metanólico.

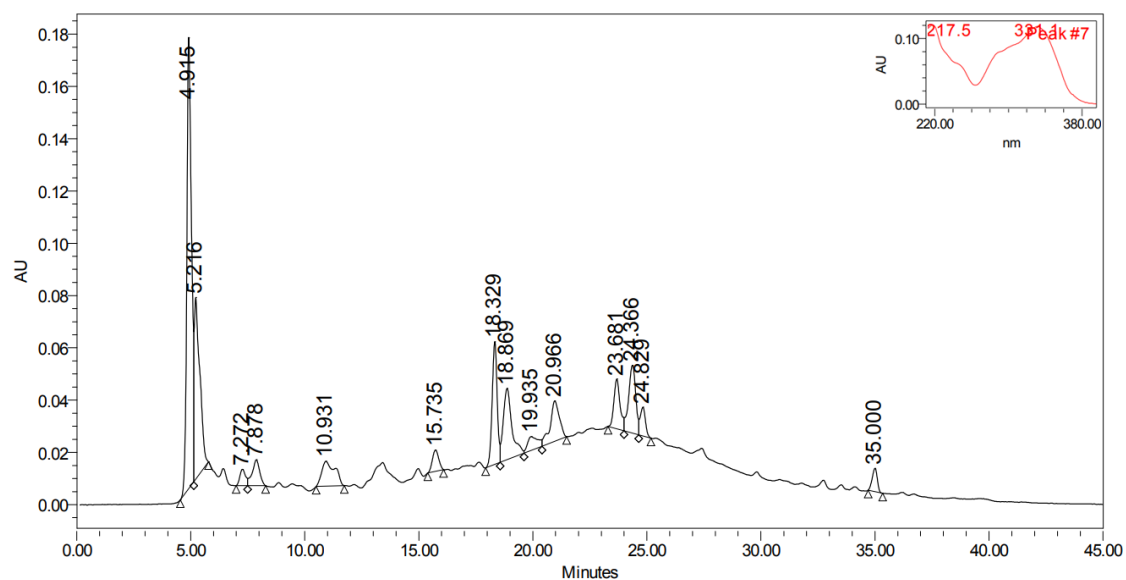


Figura 39. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con Bet:Ur 1:2 M (NADES básico).

Respecto a los extractos de *L. frutescens* con NADES neutros, la señal principal observada en el extracto metanólico fue de menor intensidad en estos extractos. Se observaron tiempos de retención de esta señal de 18.513 min para el NADES ChCl: Sor 1:1 M (Figura 40) y de 17.918 min para el NADES ChCl:Fru 1:1 M (Figura 41). Las áreas de estos picos, comparadas con el extracto de referencia fueron 80% y 60% menores para cada sistema, respectivamente.

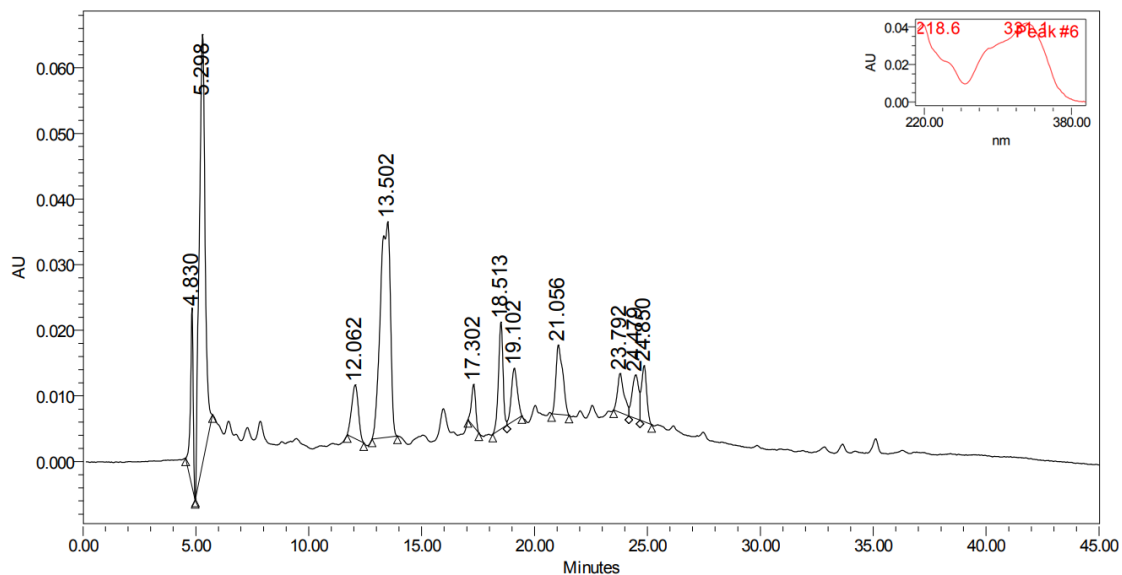


Figura 40. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con ChCl: Sor 1:1 M (NADES neutro).

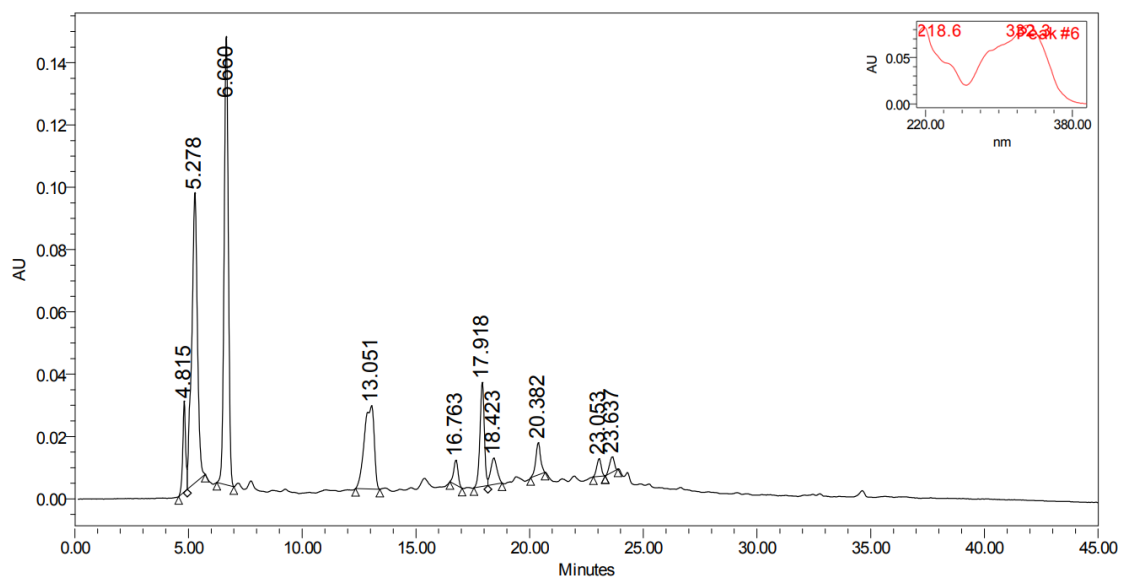


Figura 41. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con ChCl: Fru 1:1 M (NADES neutro).

En los extractos de *L. frutescens* con NADES ácidos, se presentó una señal principal, resuelta y con tiempo de retención aproximada de 17.5 min. En el caso del NADES ChCl:AM 1:1 M (Figura 42), el área de dicho pico fue

aproximadamente dos veces mayor que la observada en el extracto metanólico, mientras que para el NADES ChCl:AC 1:1 M (Figura 43) el área fue 45% mayor que la obtenida en el extracto metanólico.

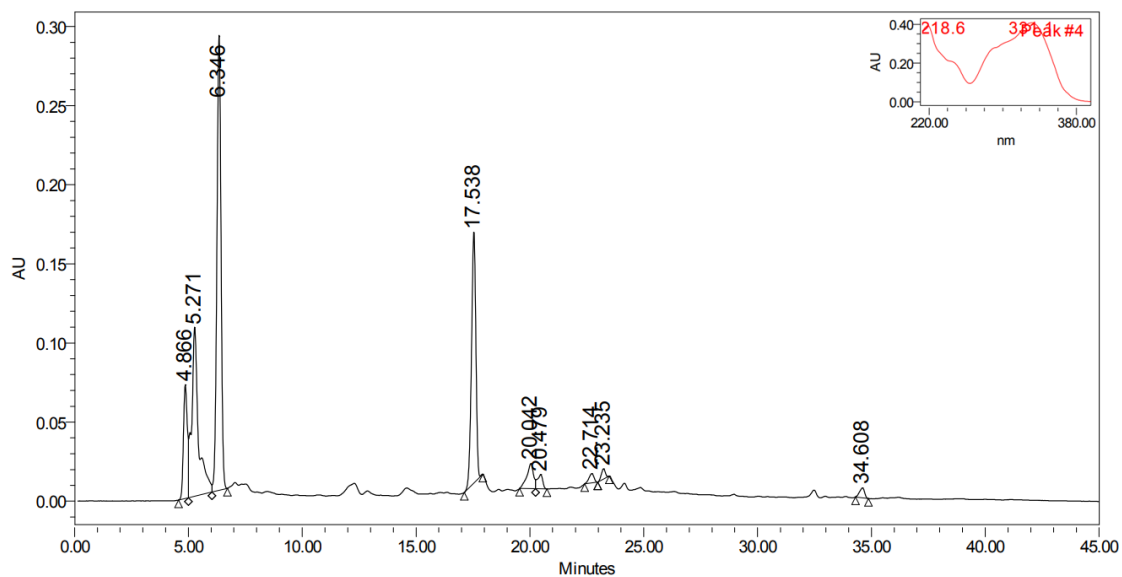


Figura 42. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con ChCl:AM 1:1 M (NADES ácido).

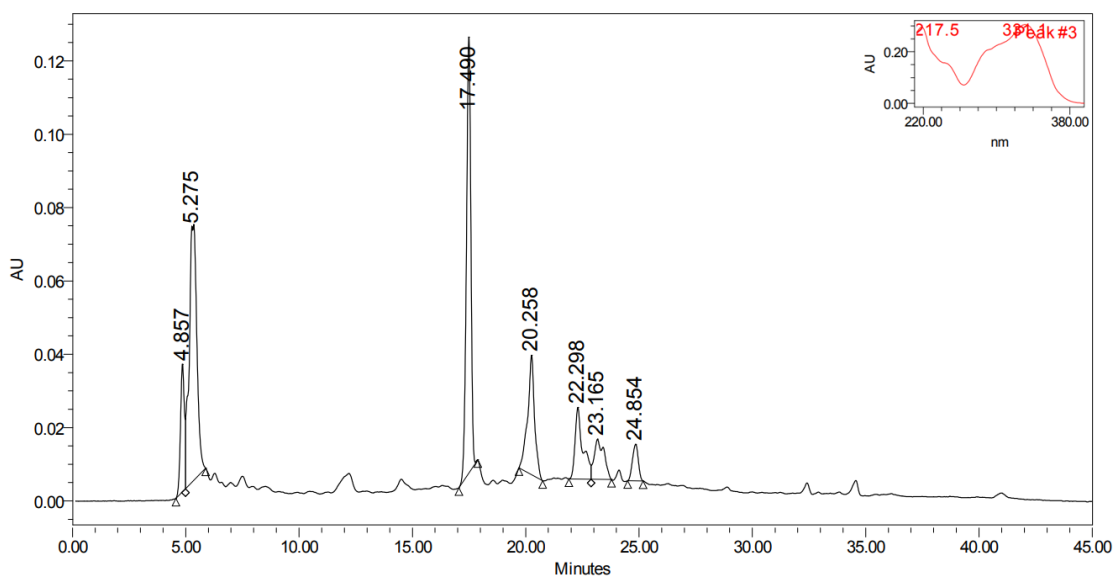


Figura 43. Cromatograma de extracto de *Leucophyllum frutescens* con ChCl:AC 1:1 M (NADES ácido).

Finalmente, en *C. boissieri* se observaron pocas señales cromatográficas, con dos señales principales, presentes en todos los extractos de NADES (Figura 44). Se verificó la identidad de estos picos cromatográficos a través de su espectro de UV.

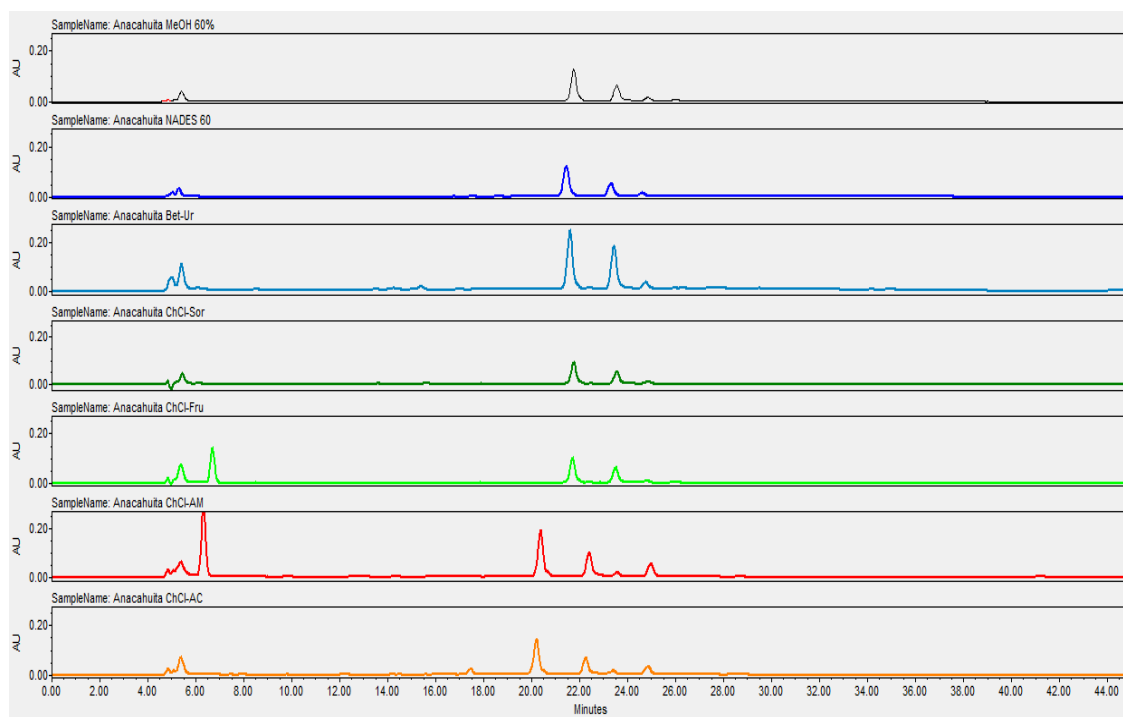


Figura 44. Comparación de los cromatogramas de los extractos de *Cordia boissieri*.

En el caso del extracto metanólico estas dos señales principales tuvieron tiempos de retención de 21.756 y 23.552 min, así como alturas de pico de 0.125 y 0.065 AU, respectivamente.

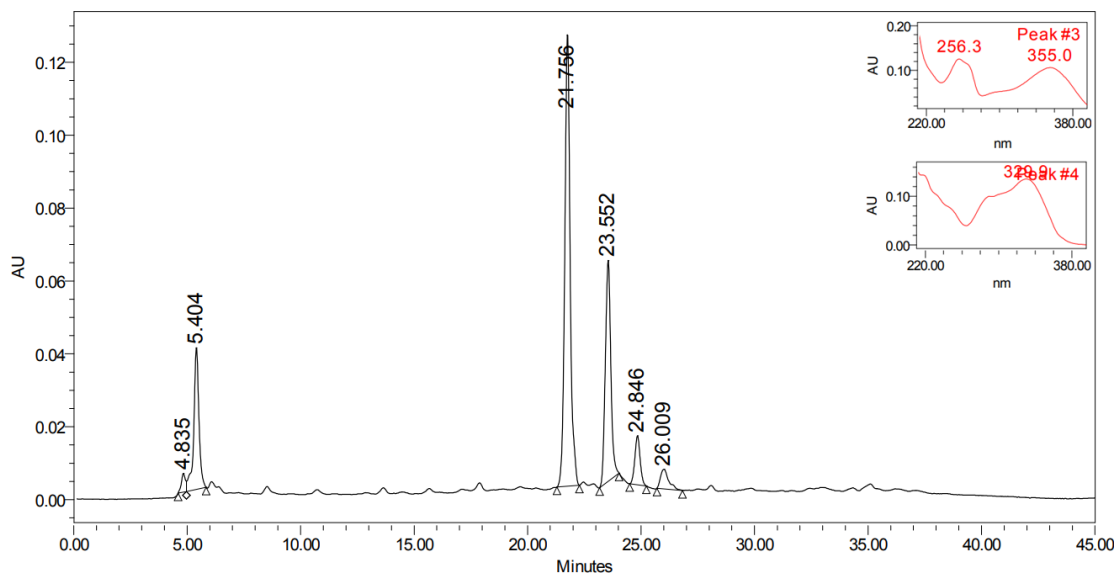


Figura 45. Cromatograma de extracto metanólico de *Cordia boissieri*.

En las extracciones de *C. boissieri* con NADES básicos, se presentaron dos señales principales, con tiempos de retención de 21 y 23 minutos respectivamente. En el NADES ChCl:Ur 1:2 M (Figura 46), el área del primer pico fue 5% mayor que la observada en el extracto metanólico, mientras que el segundo se extrajo 10% menos.

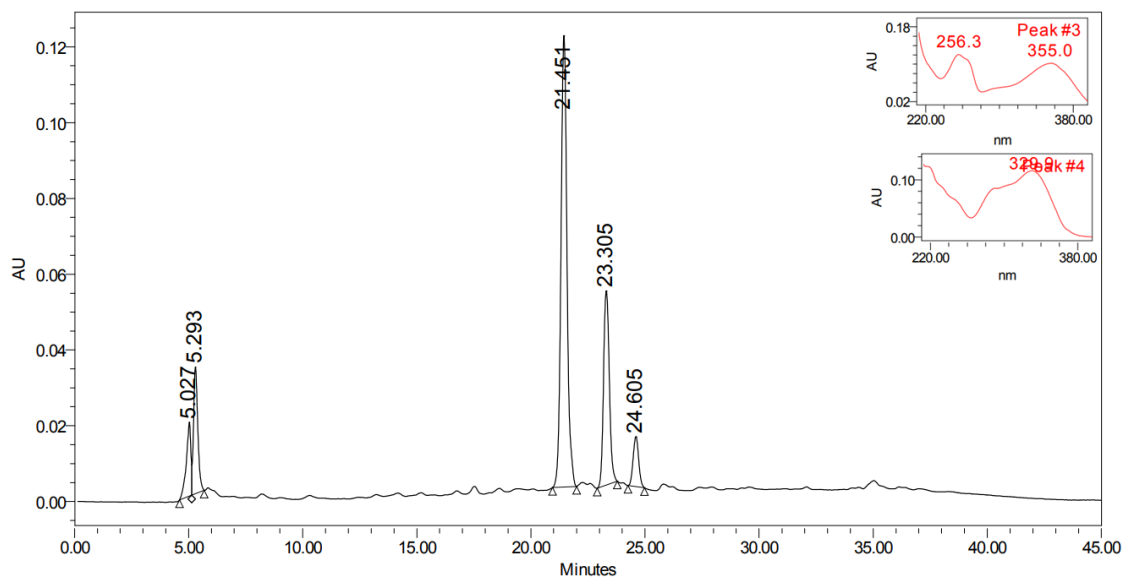


Figura 46. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con ChCl:Ur 1:2 M (NADES básico).

Por otra parte, en el NADES Bet:Ur 1:2 M (Figura 47), el área del primer pico fue 90% superior, mientras que el del segundo se extrajo fue aproximadamente el doble de la observada en el extracto metanólico.

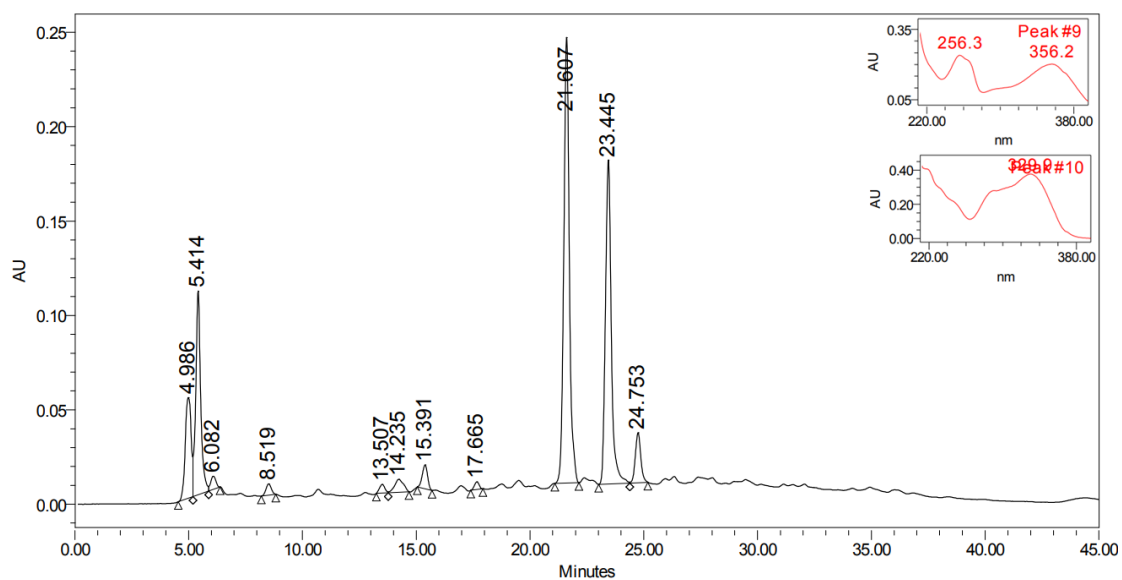


Figura 47. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con Bet:Ur 1:1 M (NADES básico).

Respecto a los NADES neutros, se observaron estas mismas señales mayoritarias, aunque con menor intensidad. Comparando las áreas de los picos con las señales del extracto metanólico, en el NADES ChCl: Sor 1:1 M (Figura 48), el primer compuesto se extrajo 30% menos, mientras que el segundo 20% menos. De la misma forma, el NADES ChCl:Fru 1:1 M (Figura 49), extrajo 21% menos y del segundo se extrajo 4% menos.

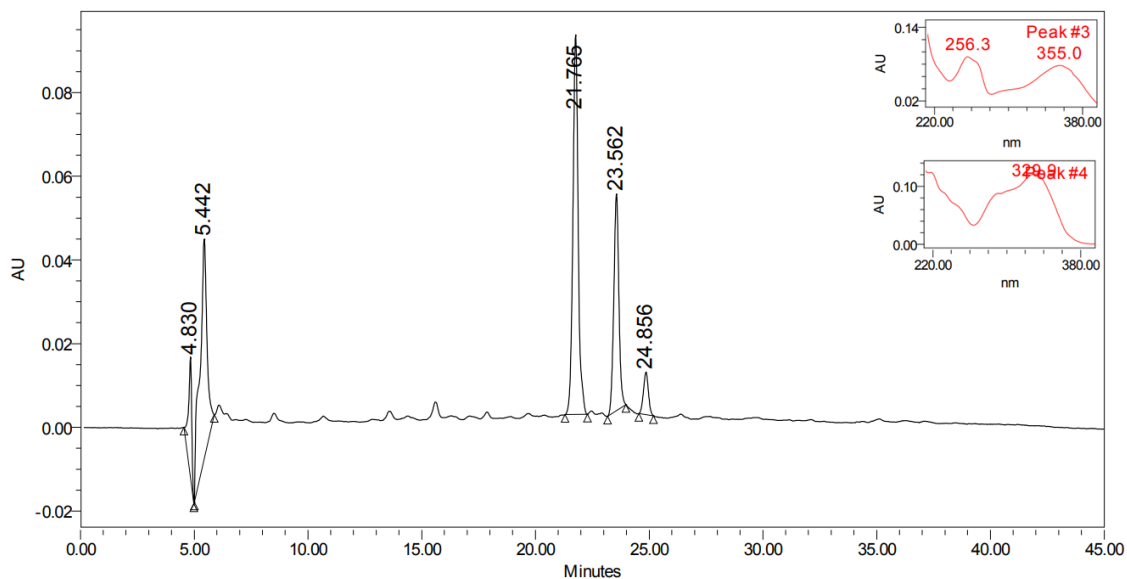


Figura 48. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con ChCl: Sor 1:1 M (NADES neutro).

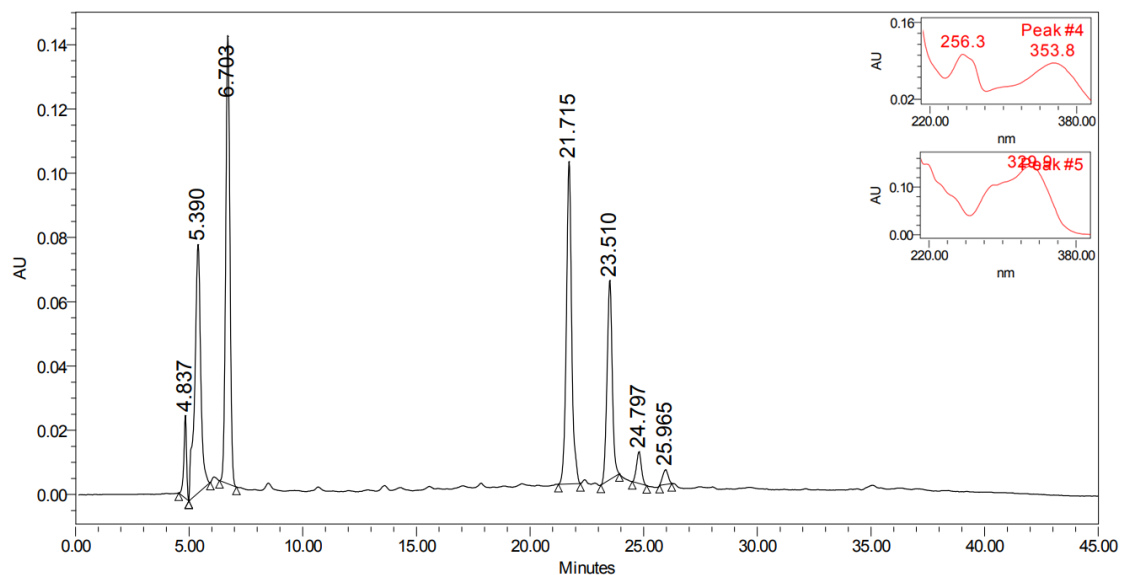


Figura 49. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con ChCl:Fru 1:1 M (NADES neutro).

Finalmente, en los NADES ácidos, las dos señales mayoritarias, presentaron una mayor intensidad, aunque con una ligera disminución del tiempo de retención (20 y 22 min). Al comparar las áreas de los picos con las del extracto metanólico, en el NADES ChCl:AM 1:1 M (Figura 50), los compuestos se extrajeron 50% y 80% más. De la misma forma, el NADES ChCl:AC 1:1 M (Figura 51), extrajo 14% más del primer compuesto, pero 2% menos del segundo.

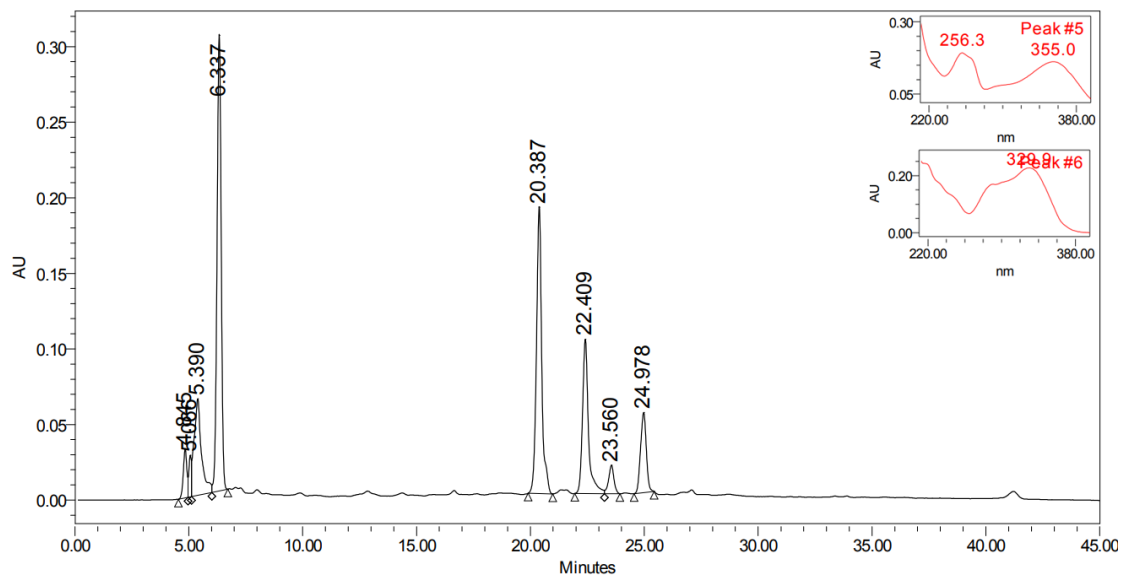


Figura 50. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con ChCl:AM 1:1 M (NADES ácido).

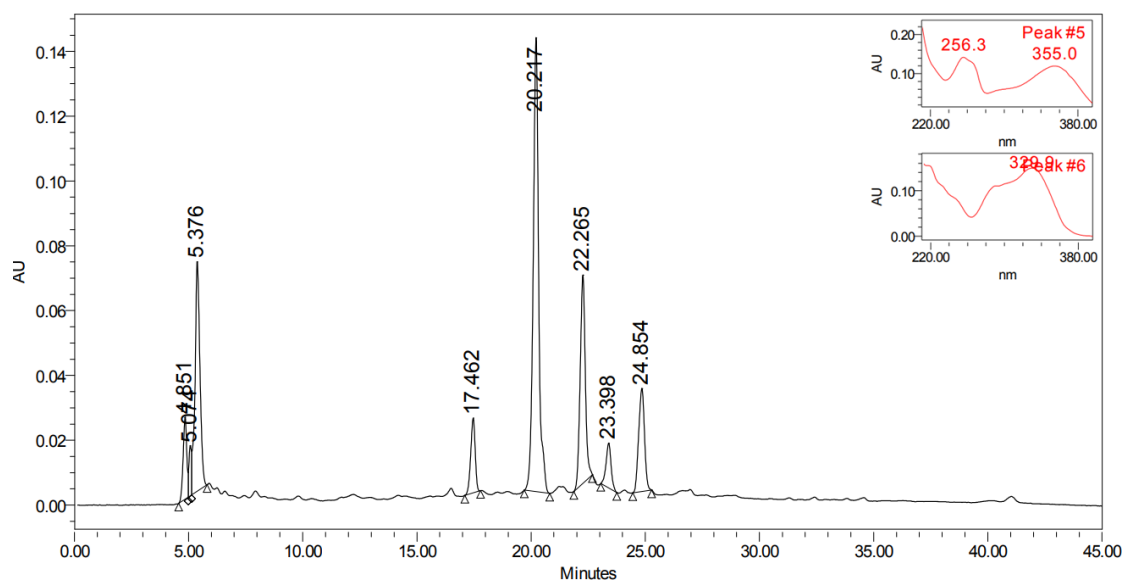


Figura 51. Cromatograma de extracto de *Cordia boissieri* con ChCl:AC 1:1 M (NADES ácido).

3.4 Pruebas fitoquímicas de los extractos

3.4.1 Terpenos

Se realizó la prueba de vainillina – ácido sulfúrico en los extractos obtenidos para comprobar la presencia de terpenos. Los resultados se resumen en la Tabla VI. No se encontró un resultado positivo de esta prueba en ninguno de los extractos de *C. boissieri*. Respecto a *T. diffusa* se obtuvieron resultados positivos para terpenos en el extracto metanólico y en el extracto de ChCl:Ur 1:2 M. En el caso de *L. frutescens* solamente se observó la presencia de terpenos en el extracto metanólico, mientras que ninguno de los extractos obtenidos con NADES presentó una respuesta positiva a la prueba.

Tabla VI. Resultados de la prueba de terpenos en los extractos obtenidos.

NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	+	-	-
ChCl:Sor	-	-	-
ChCl:Fru	-	-	-
ChCl:AM	-	-	-
ChCl:AC	-	-	-
Bet:Ur	-	-	-
MeOH	+	-	+
Control positivo: Geraniol	+++		

3.4.2 Flavonoides

Se realizó la prueba de $AlCl_3$ para flavonoides en cada extracto de NADES de las tres plantas. Los resultados se resumen en la Tabla VII. En el caso de *T. diffusa* se observó que todos los extractos presentaron este tipo de compuestos, observándose una respuesta más intensa en los extractos obtenidos con ChCl:Ur 1:2 M y con los NADES neutros. En *C. boissieri* se observó presencia de estos compuestos tanto en el extracto metanólico como en los de NADES básicos y neutros. Por otra parte, en el caso de *L. frutescens* se observó la extracción de flavonoides solo en el caso de los NADES neutros. En todos los casos los extractos obtenidos con NADES ácidos presentaron una menor intensidad de reacción para flavonoides.

Tabla VII. Resultados de la prueba de flavonoides en los extractos obtenidos.

NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	+++	+	-
ChCl:Sor	+++	++	+
ChCl:Fru	+++	++	+
ChCl:AM	+	-	-
ChCl:AC	+	-	-
Bet:Ur	++	+	-
MeOH	+++	++	-
Control positivo: Rutina	+++		

3.4.3 Taninos

Se realizó la prueba de FeCl_3 para la determinación de taninos en los extractos. Los resultados se resumen en la Tabla VIII. Se observó la presencia de estos compuestos en los extractos metanólicos de todas las plantas, así como en los extractos de NADES básicos y neutros. No se observaron resultados positivos en los extractos de NADES ácidos.

Tabla VIII. Resultados de la prueba de taninos en los extractos obtenidos.

NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	+	+	+
ChCl:Sor	+	+	+
ChCl:Fru	+	+	+
ChCl:AM	-	-	-
ChCl:AC	-	-	-
Bet:Ur	+	+	+
MeOH	+	+	+
Control positivo: Ácido gálico	++		

3.4.4 Alcaloides

Se realizó a prueba de Dragendorff para observar la presencia de alcaloides en los extractos. Los resultados se presentan en la Tabla IX. Ninguno de los extractos analizados presentó una respuesta positiva para alcaloides.

Tabla IX. Resultados de la prueba de alcaloides en los extractos obtenidos.

NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	-	-	-
ChCl:Sor	-	-	-
ChCl:Fru	-	-	-
ChCl:AM	-	-	-
ChCl:AC	-	-	-
Bet:Ur	-	-	-
MeOH	-	-	-
Control positivo: Cafeína	++		

3.4.5 Azúcares

Se realizó la prueba de fenol - ácido sulfúrico para la determinación de azúcares en los extractos. Los resultados se resumen en la Tabla X. Debido a que algunos NADES estaban constituidos por azúcares, la detección de carbohidratos se realizó mediante cromatografía en capa fina seguida de revelado con fenol – ácido sulfúrico, con el fin de minimizar interferencias

derivadas de los componentes del disolvente. Se utilizó una fase Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S y una fase móvil de metanol:agua (50:50). Debido a la alta polaridad de los componentes de los NADES, estos presentan valores de R_f y migran cerca del frente del disolvente.

En el caso de *T. diffusa* se observó la extracción de estos compuestos en los extractos de NADES neutros en proporción similar al extracto metanólico. Se observó una mayor respuesta en los extractos de NADES ácidos. Resultados similares se observaron en el caso de *C. boissieri*, donde los extractos de NADES ácidos extrajeron una mayor proporción de estos compuestos. Finalmente, en el caso de *L. frutescens*, los extractos obtenidos con NADES ácidos mostraron las respuestas más intensas para azúcares.

Tabla X. Resultados de la prueba de azúcares en los extractos obtenidos.

NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	-	-	-
ChCl:Sor	+	+	-
ChCl:Fru	+	+	-
ChCl:AM	+++	++	++
ChCl:AC	+++	++	++
Bet:Ur	-	-	-
MeOH	+	+	+
Control positivo: Sacarosa	+++		

3.5 Actividades biológicas de los extractos

3.5.1 Actividad antioxidante de los extractos

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos. Debido a que los componentes de los NADES pueden presentar actividad antioxidante intrínseca, se evaluó la capacidad antioxidante de cada NADES sin material vegetal, empleándolos como controles de referencia, como se describe en la sección 2.8.1. Posteriormente, se realizó la determinación de la actividad antioxidante en los extractos de NADES y metanólico de cada una de las plantas. Los resultados, resumidos en la Tabla XI, se expresan en % del extracto original, considerando las diluciones debido a la metodología.

Tabla XI. Actividad antioxidante de los extractos, expresado como CE₅₀ (%).

	NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	> 25	0.23 ± 0.01	1.45 ± 0.27	0.50 ± 0.01
Bet:Ur	> 25	0.48 ± 0.04	3.29 ± 0.11	1.07 ± 0.06
ChCl:Sor	> 25	0.49 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.45 ± 0.03
ChCl:Fru	> 25	< 0.20	0.34 ± 0.01	0.48 ± 0.01
ChCl:AM	13.69 ± 0.17	< 0.20	0.22 ± 0.01	0.36 ± 0.02
ChCl:AC	9.58 ± 0.11	< 0.20	0.40 ± 0.02	0.48 ± 0.01

MeOH	> 25	0.26 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.23 ± 0.01
Control positivo: Quercetina		0.000597 ± 0.000020 (5.97 ± 0.20 µg/mL)		

n=3. Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar

Los NADES básicos y neutros no presentaron actividad antioxidante detectable dentro del intervalo de concentraciones evaluado ($CE_{50} > 25\%$). Por el contrario, los NADES ácidos mostraron actividad antioxidante propia, particularmente ChCl:AC 1:1 M, que presentó una CE_{50} de $9.58 \pm 0.11\%$.

En *T. diffusa*, los extractos preparados con ChCl:Fru 1:1 M, ChCl:AM 1:1 M y ChCl:AC 1:1 M presentaron las menores CE_{50} ($<0.20\%$), indicando una mayor capacidad antioxidante que la observada para el extracto metanólico.

Para *C. boissieri*, el extracto obtenido con ChCl:AM 1:1 M presentó la mayor actividad antioxidante (CE_{50} : $0.22 \pm 0.01\%$), mientras que los NADES básicos mostraron menor actividad.

En *L. frutescens*, el extracto obtenido con ChCl:AM 1:1 M presentó la menor CE_{50} ($0.36 \pm 0.02\%$). En general, todos los extractos presentaron menor actividad antioxidante comparados con el extracto metanólico.

3.5.2 Citotoxicidad de los extractos

Se determinó la citotoxicidad de los extractos a través de la prueba de viabilidad celular por reducción de MTT. Inicialmente se evaluó la citotoxicidad de

los NADES en ambas líneas celulares para determinar su contribución al efecto biológico observado en los extractos, lo anterior siguiendo la metodología establecida en la sección 2.8.3. Se realizó el ensayo usando los extractos en ambas líneas celulares siguiendo la metodología previamente descrita. Los resultados se resumen en la Tabla XII para las células HepG2 y en la Tabla XIII para las células Vero. En ambos casos se expresa como CC₅₀ en porcentaje del extracto original.

Tabla XII. Citotoxicidad celular de los extractos en células HepG2, CC₅₀ (%).

	NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	3.59 ± 0.05	3.72 ± 0.60	1.47 ± 0.47	0.99 ± 0.29
Bet:Ur	4.47 ± 0.13	1.80 ± 0.08	0.99 ± 0.04	3.76 ± 0.62
ChCl:Sor	3.75 ± 0.15	3.49 ± 0.70	2.11 ± 0.25	2.68 ± 0.15
ChCl:Fru	5.95 ± 0.28	4.12 ± 0.60	2.12 ± 0.59	1.93 ± 0.28
ChCl:AM	1.19 ± 0.03	> 25	0.48 ± 0.04	0.57 ± 0.03
ChCl:AC	1.00 ± 0.05	> 25	0.38 ± 0.05	0.44 ± 0.01
MeOH	> 25	13.41 ± 0.39	11.91 ± 0.27	9.59 ± 0.13
Control positivo: Doxorrubicina		0.000518 ± 0.000073 (5.18 ± 0.73 µg/mL)		

n=3. Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar

Tabla XIII. Citotoxicidad celular de los extractos en células Vero, CC₅₀ (%).

	NADES	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cordia boissieri</i>	<i>Leucophyllum frutescens</i>
ChCl:Ur	2.57 ± 0.10	2.56 ± 0.20	1.90 ± 0.11	4.19 ± 0.07
Bet:Ur	3.83 ± 0.18	2.00 ± 0.12	1.02 ± 0.06	5.29 ± 0.12
ChCl:Sor	3.58 ± 0.24	2.90 ± 0.08	3.11 ± 0.13	3.22 ± 0.16
ChCl:Fru	4.40 ± 0.16	3.40 ± 0.10	3.45 ± 0.13	3.63 ± 0.02
ChCl:AM	0.94 ± 0.01	> 25	0.57 ± 0.01	0.56 ± 0.02
ChCl:AC	0.52 ± 0.02	> 25	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.01
MeOH	> 25	7.42 ± 0.41	9.82 ± 0.58	7.79 ± 0.29
Control positivo: Doxorrubicina		0.000518 ± 0.000073 (5.18 ± 0.73 µg/mL)		

n=3. Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar

Los NADES ácidos presentaron la mayor citotoxicidad intrínseca en ambas líneas celulares, observándose valores de CC₅₀ cercanos al 1% o menores. Por el contrario, los NADES basados en urea y azúcares presentaron menor citotoxicidad, con valores de CC₅₀ entre 3 y 6%.

Los extractos metanólicos de las tres especies mostraron una baja citotoxicidad, con valores de CC₅₀ superiores a 7% en ambas líneas celulares.

En general, los extractos preparados con NADES presentaron una mayor citotoxicidad que sus equivalentes metanólicos, aunque parte de este efecto puede atribuirse a la toxicidad propia de los sistemas eutécticos utilizados.

En los extractos de *T. diffusa* obtenidos con los NADES ácidos se observó un incremento en la señal de reducción de MTT respecto al control celular. Este comportamiento sugiere un posible efecto proliferativo o un aumento de la actividad metabólica celular. Dicha observación fue consistente con la mayor densidad celular observada mediante microscopía óptica invertida (Figura 52). Sin embargo, serían necesarios ensayos específicos de proliferación celular para confirmar este efecto.

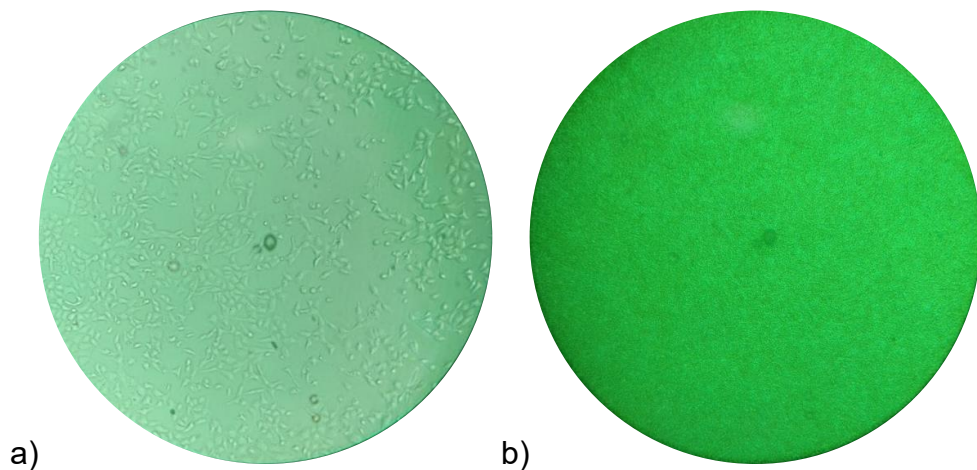


Figura 52. Fotografías representativas de células HepG2 tratadas con extractos de *T. diffusa*. a) Extracto metanólico resuspendido en PBS. b) Extracto obtenido con el sistema ChCl:AM 1:1 M. Se observa una mayor densidad celular aparente en el tratamiento con el NADES ácido.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La medicina herbolaria basa sus tratamientos en el uso de plantas o sus derivados para el tratamiento de las enfermedades que aquejan al ser humano (Guzmán, 2017). En la región noreste de México existen múltiples reportes acerca del uso de plantas nativas en el manejo de diferentes afecciones, entre ellas se encuentran *Turnera diffusa*, *Leucophyllum frutescens* y *Cordia boissieri*. A partir de cada una de estas plantas se han aislado compuestos que presentan actividad biológica: de *T. diffusa* se han aislado el hepatodamianol y la teuhetenona A, compuestos con actividad hepatoprotectora e hipoglucemiante respectivamente (Parra-Naranjo, 2023). De *L. frutescens* se han aislado compuestos como la diayangambina, un furano citotóxico (Rimando, 2009) y el leubetanol, un terpeno con actividad antimicobacteriana (Molina-Salinas, 2011). Por otra parte, de *C. boissieri* se han aislado el quebrachitol y la alantoína, compuestos con actividad hipoglucemiante (Mendoza, 2007).

De esta forma, la actividad biológica de las plantas proviene principalmente de los metabolitos secundarios del material vegetal: compuestos formados como mecanismo de defensa y protección de la planta contra cualquier factor ambiental adverso que se pueda presentar (Patil, 2020). Debido a que estos metabolitos son sintetizados por vías metabólicas específicas, éstos se encuentran restringidos a familias, géneros o incluso especies únicas, por lo que su extracción se vuelve difícil (Patil, 2020).

Convencionalmente, estos metabolitos secundarios se extraen con disolventes orgánicos (Jain, 2019), sin embargo, se ha intentado reemplazar esto con nuevas alternativas más ecológicas, incluyendo los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) (Zuo, 2023). Estas mezclas eutécticas están formadas por metabolitos de plantas, generalmente sales de amonio cuaternarias en combinación con ácidos carboxílicos, azúcares y alcoholes (Pereira, 2025). Además, existen reportes de su uso para la extracción de metabolitos secundarios donde no solo se mejora la extracción de dichos compuestos, sino que se mejora su actividad biológica al compararse con la extracción convencional con disolventes orgánicos (Koh, 2023; Hao, 2023; Aktaş, 2024; Pereira, 2025).

Debido a lo anterior, se consideró explorar la capacidad de extracción de diferentes NADES de metabolitos secundarios a partir de tres plantas de la región que presentan actividades biológicas reportadas. Esta exploración obedece entre otros factores a la descripción de un primer acercamiento del uso de estas

mezclas eutécticas en plantas de la zona y la migración a prácticas más amigables con el medio ambiente.

En primera instancia se estudiaron diferentes NADES reportados en la literatura para la extracción de metabolitos secundarios a partir de material vegetal. Como se observa en la Tabla IV, solamente seis mezclas eutécticas pudieron ser formadas en el laboratorio bajo las condiciones experimentales descritas. Los NADES obtenidos se clasificaron, dependiendo de la molécula empleada como HBD, en tres grupos: NADES ácidos (formados por ácidos orgánicos), NADES básicos (formados por urea) y NADES neutros (formados por azúcares).

Posterior a su preparación se procedió a su caracterización fisicoquímica. Los resultados de la medición de pH (Tabla V) mostraron resultados variables. Por un lado, los NADES ácidos mostraron un pH bajo esperado, puesto que en la literatura se encuentran reportes de valores de pH menores a 1 en NADES basados en ácido cítrico y ácido málico (Mitar, 2019). De la misma forma, los NADES básicos mostraron un pH de dicha naturaleza, superior a valores de 9, lo cual también se encuentra reportado en la literatura (Radošević, 2018).

Sin embargo, los NADES neutros mostraron un valor de pH ligeramente más ácido de lo esperado para las mezclas eutécticas basadas en azúcares, donde se espera un valor de pH cercano a la neutralidad (Koh, 2023), aunque también existen reportes de valores cercanos a 4.5 (Radošević, 2018). Una explicación de una disminución en el pH esperado se encuentra en el método de preparación de los NADES debido a que un calentamiento por encima de los 50°C favorece

la ionización de los grupos hidroxilo de los azúcares, liberando protones al medio que se traduce en un ligero descenso del pH (Koh, 2023).

Respecto a la caracterización espectroscópica, se obtuvieron los espectros de infrarrojo de los NADES, así como de las sustancias que lo conformaron. Se compararon los espectros (Figuras 11 a 16) y se analizaron esperando que el espectro del NADES sea una conjunción de los espectros de HBA y HBD. En el caso de los ácidos málico y cítrico, así como en la betaína y urea se observó la presencia de una señal alrededor de $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, característica del enlace C=O. La señal del estiramiento de O-H del grupo hidroxilo se observó tanto en el sorbitol y fructosa, así como en los ácidos carboxílicos y el cloruro de colina hacia $3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$. En el caso de la urea, se observó además de la señal del grupo carbonilo, el estiramiento del enlace N-H entre $3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$.

Esta caracterización se emplea para determinar la formación de puentes de hidrógeno entre el HBA y HBD (Sakurai, 2024). En general, se espera que no aparezcan señales nuevas y que no desaparezcan las señales ya existentes (Ma, 2025). Esto como un indicador de la ausencia de reacción y sustentando la idea de que en la formación del NADES solo ocurren interacciones intermoleculares. Asimismo, también se espera que las señales de los grupos funcionales que participan en la formación de puentes de hidrógeno se ensanchen (Sakurai, 2024). Estos resultados son consistentes con la formación de los NADES y respaldan la existencia de interacciones intermoleculares entre sus componentes.

Con los NADES formados se procedió a realizar las extracciones del material vegetal. Uno de los principales inconvenientes observados fue la alta viscosidad de los NADES, lo cual dificultó la recuperación de los extractos. Diversos estudios han demostrado que la adición de agua reduce la viscosidad de estas mezclas eutélicas y favorece la transferencia de masa entre el material y el disolvente, mejorando así la eficiencia de extracción (Zuo, 2023). Un punto importante es evitar la pérdida de la condición eutélica debido a la adición de agua por arriba del 50% (Pereira, 2025). En este caso se analizó la adición de agua en un 20 y 40%, de manera que los NADES quedaron al 80 y 60% respectivamente. Las extracciones del material vegetal se realizaron con estas preparaciones, así como el NADES. Para realizar una correcta comparación con la extracción con disolventes orgánicos, la extracción se realizó tanto con metanol puro como al 60%.

En todos los casos fue posible obtener extractos del material vegetal, destacando la dificultad para recuperar el extracto con NADES debido a su alta viscosidad. Este efecto no fue observado en los extractos con NADES con agua adicionada, siendo más fácil su recuperación con el NADES al 60%.

Al comparar los cromatogramas obtenidos, se observó en el caso de los extractos metanólicos de las tres plantas (Figuras 19 a 21) que las señales se encontraron en su mayoría aumentadas con la adición de agua. En el caso de los extractos de NADES, se observaron señales aumentadas debido a la adición de agua, así como un ligero aumento en el número de señales. Por estas

razones, se decidió realizar la extracción con los disolventes al 60%, así como realizar las siguientes pruebas con dichos extractos.

Los cromatogramas obtenidos de cada extracto de NADES se compararon con el obtenido para el extracto metanólico para observar diferencias en el número e intensidad de señales.

En la comparación de cromatogramas de *T. diffusa* (Figura 28) se observó en el extracto metanólico un pico principal con tiempo de retención de 27.66 min. En los NADES básicos se observó que el componente mayoritario presentó un movimiento en el tiempo de retención (cercano a los 24 min), un aumento en la señal, así como una mejora en la resolución del pico. Se observó además la mayor presencia de otros compuestos de menor polaridad. Respecto a los NADES neutros se observó un perfil cromatográfico similar al extracto metanólico, caso que se repitió con los NADES ácidos, aunque en este último caso los tiempos de retención también presentaron un ligero movimiento. Estos resultados sugieren que los NADES básicos constituyen una alternativa prometedora para la extracción del componente principal de *T. diffusa*, ya que en ambos sistemas probados dicho componente presentaba un área relativa del pico superior a la obtenida en el extracto metanólico.

Al comparar los cromatogramas de *C. boissieri* (Figura 44) se observaron dos señales cromatográficas principales en el extracto metanólico: una con un tiempo de retención de 21.75 min y otra con un tiempo de 23.55 min. Para los NADES básicos se observó una mayor extracción de dichos componentes principales comparado con el metanólico, especialmente por parte del sistema Bet:Ur 1:2 M,

así como de algunos componentes minoritarios de mayor polaridad. Por su parte, los NADES neutros presentaron un perfil cromatográfico similar al extracto metanólico, mientras que los NADES ácidos extrajeron en mayor proporción a los componentes mayoritarios y minoritarios. De este modo, los NADES básicos se posicionan como una mejor alternativa para la extracción de los componentes mayoritarios.

Respecto a la comparación de cromatogramas de *L. frutescens* (Figura 36) se observó un pico principal con tiempo de retención de 18.51 min en el extracto metanólico. Con los NADES básicos se observó una mayor extracción de componentes: ChCl:Ur 1:2 M extrajo en mayor proporción al componente mayoritario, mientras que Bet:Ur 1:2 M extrajo más componentes minoritarios de menor polaridad. Los NADES neutros no extrajeron al componente principal mejor que el metanol, pero extrajeron componentes minoritarios de menor tiempo de retención, no apreciables en el extracto metanólico. Finalmente, los NADES ácidos extrajeron de una mejor forma al componente mayoritario, presentando una ligera disminución en los tiempos de retención. Esto coloca a los NADES ácidos como una alternativa para la extracción del compuesto mayoritario de esta planta. Asimismo, los NADES neutros son una opción para la extracción de componentes minoritarios.

El análisis fitoquímico permitió determinar la composición de los extractos de cada una de las plantas. La determinación de alcaloides se realizó a través de la prueba de Dragendorff, empleando un reactivo de tetrayodobismutato de potasio. La reacción se realiza en medio ácido, por lo que el nitrógeno de los alcaloides

se encuentra ionizado, generalmente en forma de amina cuaternaria. La reacción del tetrayodobismutato con el amonio cuaternario forma una sal compleja insoluble de color amarillo-naranja o rojo-marrón (Vargas-Mamani, 2024). Se observó, en todos los extractos la ausencia de terpenoides y alcaloides, lo cual puede deberse principalmente a la naturaleza de los NADES empleados en las extracciones, puesto que se han reportado NADES de tipo hidrofóbicos para la óptima recuperación de este tipo de compuestos, empleando moléculas como mentol, timol y alcanfor (Viñas-Ospino, 2023; Casado-Hidalgo, 2024). En este trabajo se emplearon NADES de tipo hidrofílico, usando moléculas como ácidos orgánicos, azúcares y amidas como HBD.

La determinación de flavonoides totales se llevó a cabo a través del método de tricloruro de aluminio, donde los flavonoides reaccionan con dicha sustancia formando un complejo de color amarillo (Poggi, 2026). Dicha reacción es específica respecto a otros compuestos polifenólicos, al interaccionar con los grupos cetona e hidroxilo de los flavonoides (Figura 53) (Makuasa, 2020).

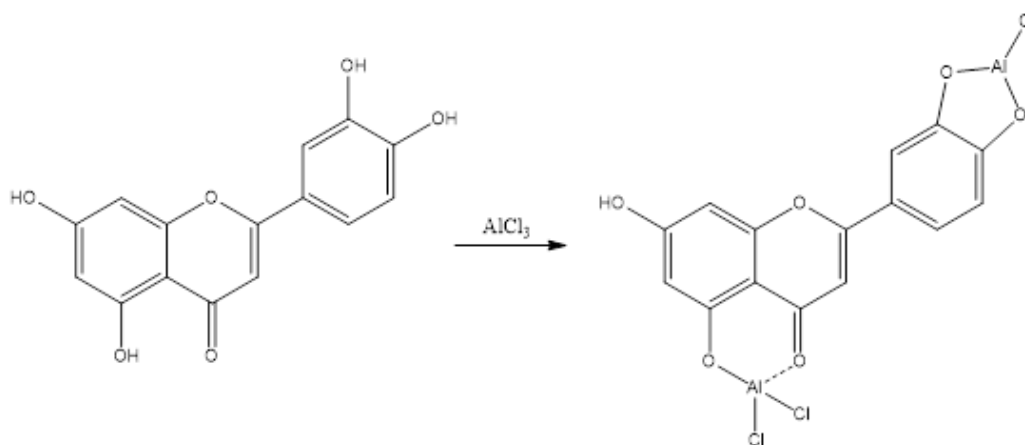


Figura 53. Reacción de formación del complejo entre un flavonoide y AlCl₃.

Respecto a los flavonoides se extrajeron de una mejor forma por los NADES neutros en todas las plantas. En el caso de *T. diffusa*, se extrajeron con todos los disolventes, aunque los NADES neutros y básicos presentaron una respuesta similar al extracto metanólico, mientras que los NADES ácidos presentaron una respuesta más baja. Para *C. boissieri* se obtuvo respuesta con los NADES neutros similar al extracto metanólico y una menor respuesta en los NADES básicos. No hubo respuesta en los extractos de NADES ácidos. Con *L. frutescens* se observó que solo los NADES neutros extrajeron este tipo de compuestos.

La extracción de estos compuestos empleando NADES a base de azúcares está ampliamente reportada, empleándose glucosa, sacarosa, fructosa y xilitol (Koh, 2023). Sin embargo, la baja respuesta de la prueba en los NADES ácidos fue inesperada, puesto que hay reportes de una mayor extracción de estos compuestos con NADES de ese tipo (Koh, 2023). No obstante, es posible que, debido al ambiente muy ácido, favoreciera la protonación de los grupos hidroxilo y, por lo tanto, una reducción en la estabilidad de los flavonoides, junto a una afectación a la respuesta de los ensayos para su determinación (Nguyen, 2025).

Este mismo efecto fue visualizado en la prueba de taninos, considerando que estos son compuestos polifenólicos que también presentan grupos hidroxilo sensibles al pH del medio. La determinación de taninos se realizó por el método de tricloruro férrico, donde el hierro es reducido por los taninos dando como resultado una coloración azul verdosa (Sandoval, 2005; Görög, 2018).

En este caso, se observó que todos los extractos de las plantas presentaron un resultado similar en la prueba, a excepción de aquellos de NADES ácidos, donde no se observó un resultado positivo.

La determinación de azúcares totales se realizó por el método de fenol – ácido sulfúrico. Tanto los azúcares simples y complejos, como sus derivados, son hidrolizados en el ambiente fuertemente ácido, formando derivados de furano, los cuales se condensan con el fenol para formar un complejo de color amarillo-naranja (Patil, 2020). La coloración es directamente proporcional a la cantidad de azúcares totales presentes en la muestra (Patil, 2020).

Para la extracción de azúcares se obtuvo un resultado positivo principalmente con los NADES ácidos. En el caso de *T. diffusa* y *C. boissieri* se extrajeron de forma menor con los NADES neutros y en ninguna planta se extrajeron con los NADES básicos. Este resultado concuerda con un reporte de la extracción de azúcares solubles a partir de plátano, donde un NADES de ácido málico, alanina y agua (1:1:3 M) presentó una mejor extracción de estos metabolitos (Gómez, 2019).

Con estos resultados, es posible determinar que los NADES neutros permiten una mejor extracción de flavonoides y taninos; los NADES básicos pueden extraer taninos y en menor medida flavonoides; mientras que los NADES ácidos extraen en mayor medida azúcares.

Por último, respecto a las actividades biológicas se determinaron tanto la actividad antioxidante como la citotoxicidad de los extractos y los NADES.

La actividad antioxidante de los NADES se determinó considerando que algunas de las moléculas que conformaron las mezclas eutécticas presentan actividad antioxidante. Se determinó la concentración efectiva 50 (CE₅₀) de cada extracto primario para reducir el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) por espectrofotometría UV-Vis a una λ de 540 nm. Los antioxidantes presentes en el extracto reducen el radical DPPH (de coloración morado), a una forma reducida (de color amarillo) (Figura 54) por lo que el cambio de color es proporcional a la actividad antioxidante del extracto.

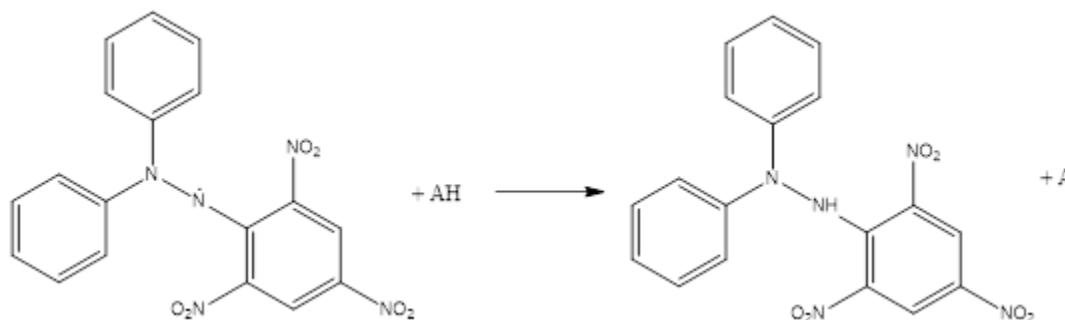


Figura 54. Reacción de reducción del DPPH por un antioxidante (AH).

En este caso, los NADES básicos y neutros no presentaron actividad antioxidante, ya que ni la urea ni los azúcares tienen la capacidad de reducir el radical DPPH (Radošević, 2018). Solamente los NADES ácidos presentaron dicha capacidad de reducción del radical, lo cual concuerda con lo reportado tanto para los NADES formados con ácido málico y cítrico, moléculas comúnmente empleadas como aditivos en los alimentos debido a esta propiedad (Radošević, 2018).

Respecto a los extractos, se observó en el caso de *T. diffusa* que las actividades fueron similares a las obtenidas por el extracto metanólico, incluso mayores para el caso de ChCl: Sor 1:1 M y Bet:Ur 1:2 M. Destacó el aumento de la actividad antioxidante por parte del extracto con ChCl:Fru 1:1 M los NADES ácidos. En el caso de *C. boissieri* se observó que los extractos de NADES neutros igualaron el nivel antioxidante del extracto metanólico, mientras que el de ChCl:AM 1:1 M fue ligeramente mayor. En los demás casos se perdió la actividad antioxidante. Para *L. frutescens* ningún extracto de NADES logró igualar la capacidad del extracto metanólico, aunque sí presentó actividad antioxidante.

Estos resultados pueden entenderse por la composición de los extractos, dado por el análisis fitoquímico. Donde en la mayoría de estos se presentaron compuestos con actividad antioxidante, como los flavonoides y taninos, que pueden tomar el radical del reactivo y estabilizarse por resonancia (Cosme, 2025). Además, en el caso de los extractos de NADES ácidos de *T. diffusa*, se observó un efecto aumentado debido a la propia actividad del disolvente.

El MTT es reducido a formazán (cristales violetas) en una reacción catalizada por la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo funciona en células vivas, empleando como cofactor el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) (Figura 55). Los cristales se acumulan dentro de la célula, y se liberan al medio cuando ésta es lisada, permitiendo su disolución y cuantificación a través de espectrofotometría. La absorbancia del producto se mide a λ de 570 nm.

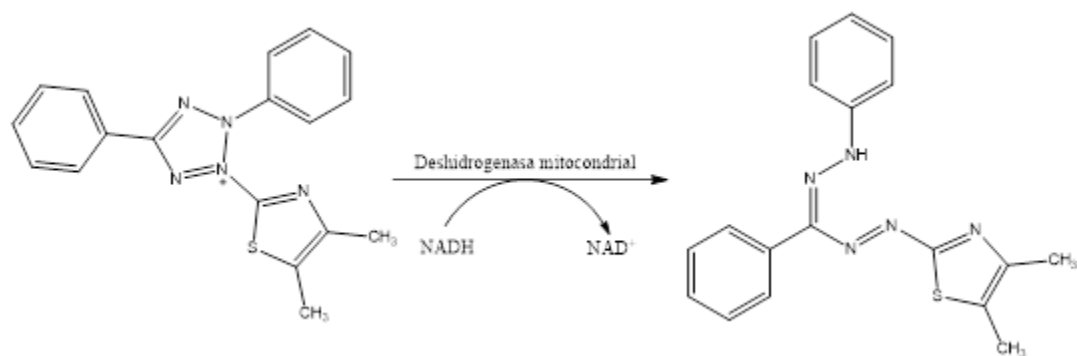


Figura 55. Reacción de reducción del MTT a formazán.

Para la prueba, los extractos de NADES se analizaron de forma directa, donde se consideró al extracto como un 100% y a partir de este se consideraron las diluciones en la metodología para reportarlo como un porcentaje con base en dicho 100%. Por otro lado, a una alícuota de los extractos metanólicos se les eliminó el disolvente y posteriormente se resuspendieron en el mismo volumen con PBS. También se consideró dicho extracto como el 100% y se le dio el mismo tratamiento que a los extractos de NADES.

La citotoxicidad de los NADES está dada por diversos factores, incluyendo las propiedades de sus componentes, propiedades fisicoquímicas, cantidad de agua y las características de la línea celular empleada (Zuo, 2021). En general, los NADES formados por ácidos orgánicos presentan una mayor citotoxicidad comparada con los NADES a base de azúcares, debido al descenso en el pH, dificultando la compatibilidad con el desarrollo celular (Koh, 2023).

De los NADES a base de cloruro de colina se han reportado CC_{50} para células Caco-2, HT-29, MCF-7 y MRC-5, donde se observaron diferencias en la citotoxicidad debido a la concentración y composición de los NADES probados.

En dicho reporte de Popović y colaboradores (2023), los NADES a base de azúcares presentaron la menor citotoxicidad (ChCl: Sor 1:1 M CC₅₀: 2.97%; ChCl:Fru 1:1 M CC₅₀: 4.42%), mientras que los NADES a base de ácidos presentaron la mayor citotoxicidad (ChCl:AC 1:1 M CC₅₀: 0.88%; ChCl:AM 1:1 M CC₅₀: 0.94%). Estos resultados pueden entenderse desde la composición del NADES, puesto que los azúcares son carbohidratos empleados en el metabolismo celular para obtener energía, por lo que su presencia es aprovechada por las células para su suministro de energía (Hayyan, 2016).

A pesar de esta citotoxicidad reportada, algunos NADES han sido probados en modelos *in vivo*, sin embargo, es importante optimizar la concentración y viscosidad del NADES para su consumo seguro (Koh, 2023). Se han administrado a ratones extractos de raíz de *Glycyrrhiza* usando Sorbitol – Ácido láctico (3:1 M) por vía tópica y peroral (Shikova, 2025); extractos de *Carthamus tinctorius* L. usando un NADES de Prolina y acetamida (1:1 M) (Tong, 2021); extractos de cúrcuma en polvo con ChCl – propilenglicol (1:1 M) (Abouheif, 2022); y extractos de arándanos con ChCl – glicerol – ácido cítrico (0.5:2:0.5 M) (da Silva, 2021).

Al comparar los resultados de viabilidad celular (Tabla XIII y XIV), se observa que los NADES presentan valores similares a lo reportado en la literatura (Popović, 2023): los NADES neutros presentan CC₅₀ entre 2 y 4%, los NADES ácidos una CC₅₀ menor a 1% y los NADES básicos con valor cercano al 2%. Además, debido a que los extractos se evaluaron sin eliminar el NADES, la respuesta biológica observada corresponde al efecto combinado del sistema

eutético y de los metabolitos extraídos, por lo que no es posible atribuir el efecto exclusivamente a los compuestos vegetales. Otro punto importante es la magnitud de los valores. De acuerdo con clasificaciones de extractos naturales (Anywar, 2022), un valor de CC_{50} superior a 500 $\mu\text{g/mL}$ (o equivalente a 0.05%) indicaría una baja citotoxicidad del extracto. Al comparar dicho valor con los obtenidos por los extractos se determina que los extractos no presentan una citotoxicidad relevante.

Finalmente, un resultado inesperado fue el efecto de proliferación encontrado en los extractos de *T. diffusa* con los NADES ácidos. Aunque este efecto se observó en el NADES de Betaína – Ácido málico – Prolina, donde se determinó un posible efecto sinérgico entre la betaína y prolina que concluía en la protección de la célula del daño por parte del ácido málico (Radošević, 2018), la ausencia de este efecto en los NADES ácidos por sí solos, implica la presencia de compuestos en el extracto que cumplen esta función. Existen reportes acerca del papel que juegan los metabolitos secundarios en procesos de regulación celular, incluso favoreciendo la proliferación y diferenciación celular (Saud, 2019). Sin embargo, no se ha encontrado hasta el momento reportes de extractos vegetales obtenidos con NADES que produzcan un efecto proliferativo atribuible a un posible efecto sinérgico entre el extracto y el sistema eutético.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se caracterizaron seis NADES fisicoquímica y espectroscópicamente.
- Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los extractos de las tres plantas con los NADES, observándose diferencias en las áreas relativas y tiempos de retención de los picos cromatográficos con relación con sus respectivos extractos metanólicos.
- En cuanto al análisis fitoquímico, la extracción de flavonoides y taninos de las plantas se vio favorecida con NADES neutros, mientras que la extracción de azúcares aumentó con los NADES ácidos.
- Se observó una actividad antioxidante mayor en el caso de los extractos de *T. diffusa* con NADES ácidos y de ChCl:Fructosa comparado con los

extractos metanólicos. En los otros extractos de NADES el efecto fue similar al extracto metanólico.

- Se observó un efecto de proliferación celular con los extractos de *T. diffusa* con NADES ácidos. En el caso de las otras plantas, la viabilidad celular fue ligeramente menor sin ser significativa.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Ampliar la diversidad química de los componentes de los NADES y evaluar su desempeño en la extracción de metabolitos secundarios de las plantas estudiadas.
- Identificar los compuestos extraídos por los diferentes NADES.
- Realizar análisis cuantitativo de los metabolitos secundarios extraídos.
- Probar los NADES utilizados en la extracción de otras plantas de la región.
- Probar los NADES ácidos en la obtención de extractos de otras plantas con actividad antioxidante.

- Determinar el mecanismo de proliferación celular producido por los extractos de *T. diffusa* por NADES ácidos.

REFERENCIAS

- Abouheif, S. A., Sallam, S. M., El Sohafy, S. M., Kassem, F. F., & Shawky, E. (2022). A green extraction approach using natural deep eutectic solvents enhances the in-vivo bioavailability of curcuminoids from turmeric extracts. *Industrial Crops and Products*, 189, 115790.
- Adame, J. y Adame, H. (2000) *Plantas curativas del Noreste Mexicano*. 1ª ed. México: Editorial Castillo.
- Aguirre, M. (2024) Evaluación del efecto de terpenos aislados a partir de *Turnera diffusa* en un modelo de captación de glucosa en células HepG2 resistentes a insulina [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- Ahmad, I., Ahmed, S., Akkol, E. K., Rao, H., Shahzad, M. N., Shaukat, U. y Fatima, M. (2022) GC–MS profiling, phytochemical and biological investigation of aerial parts of *Leucophyllum frutescens* (Berl.) IM Johnst.(Cenizo). *South African Journal of Botany*, 148, 200-209.
- Aktaş, H., y Kurek, M. A. (2024) Deep eutectic solvents for the extraction of polyphenols from food plants. *Food chemistry*, 444, 138629. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138629

- Alanís, G., Cano, G. y Rovalo, M. (1996) *Vegetación y flora de Nuevo León, una guía botánicoecológica*. México: Patronato Monterrey 400, Consejo Consultivo para la Preservación y Fomento de la Flora y Fauna Silvestre de Nuevo León, CEMEX.
- Anywar, G., Kakudidi, E., Oryem-Origa, H., Schubert, A. y Jassoy, C. (2022) Cytotoxicity of Medicinal Plant Species Used by Traditional Healers in Treating People Suffering From HIV/AIDS in Uganda. *Front. Toxicology* 4:832780.
- Avelino-Flores, M. del C., Cruz-López, M. del C., Jiménez-Montejo, F. E., y Reyes-Leyva, J. (2015) Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on breast cancer cells. *Journal of medicinal food*, 18(3), 299–305. DOI: 10.1089/jmf.2013.0055
- Baez-Parra, K., Soto-Beltran, M., López-Cuevas, O., Basilio Heredia, J., Alcaraz-Melendez, L. y Angulo-Escalante, M. (2019) *In Vitro* Antimicrobial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of *Turnera diffusa* Against Common Urinary Pathogens. *Rev. Bio. Cienc.* 6(70) e670:1–e670.
- Balderas-Renteria, I., del Rayo Camacho-Corona, M., Carranza-Rosales, P., Lozano-Garza, H. G., Castillo-Nava, D., Álvarez-Mendoza, F. J. y Tamez-Cantú, E. M. (2007) Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Annals of hepatology*, 6(4), 251-254.

- Braun, L., Cohen, M. (2015) *Herbs and Natural Supplements, Volume 2: An Evidence-Based Guide*. 4ª ed. Australia: Elsevier; pp. 270 – 272
- Bustamante, C. (2013) Etnobotánica de tres municipios del norte del estado de Nuevo León, México [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- Campos-Navarro, R. (2016) *Antropología médica e interculturalidad*. México: McGraw-Hill
- Casado-Hidalgo, G., Cordo, R., Pérez-Quintanilla, D., Morante-Zarcelero, S., Gómara, B., Ramos, L., y Sierra, I. (2024) Fast and green methodology based on miniaturised liquid–liquid extraction with a hydrophobic natural deep eutectic solvent of opium alkaloids from poppy seed beverages. *Microchemical Journal*, 207, 111954.
- Chaisawat, T., Wongprasopchai, P., Kaopaiboon, S., Leema, W., Kantakapun, K., y Somsiripan, T. (2024) Ultrasound-assisted polyphenols extraction with deep eutectic solvent and ethanol-based from *Baccaurea macrocarpa* pericarp and kinetic model. *Microchemical Journal*, 207, 111644.
- Cheng, Y., Zhao, H., Cui, L., Hussain, H., Nadolnik, L., Zhang, Z. y Wang, D. (2024) Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from peanut leave and stem using deep eutectic solvents and its molecular mechanism. *Food Chemistry*, 434, 137497.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (2021) Listados de Registros Sanitarios de Medicamentos. *Gobierno de México*.

<https://www.gob.mx/cofepris/documentos/registros-sanitarios-medicamentos>

Congreso de los Estados Unidos Mexicanos (2021) Ley General de Salud.

Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.

Cosme, F., Aires, A., Pinto, T., Oliveira, I., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2025). A

Comprehensive Review of Bioactive Tannins in Foods and Beverages: Functional Properties, Health Benefits, and Sensory Qualities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 30(4), 800.

Covarrubias-Gómez, A. y Guevara-López, U. (2009) Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 32(3), 156 – 162.

Cuevas, A. (2018) *Cultura científica y cultura tecnológica*. Actas del IV Congreso Iberoamericano de Filosofía de la Ciencia y la Tecnología. España: Universidad de Salamanca.

da Silva, D. T., Rodrigues, R. F., Machado, N. M., Maurer, L. H., Ferreira, L. F., Somacal, S., da Veiga, M. L., Rocha, M. I. U. M. D., Vizzotto, M., Rodrigues, E., Barcia, M. T. y Emanuelli, T. (2020) Natural deep eutectic solvent (NADES)-based blueberry extracts protect against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 138(Pt A), 109718. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109718

da Silva, D. T., Smaniotto, F. A., Costa, I. F., Baranzelli, J., Muller, A., Somacal, S., ... & Emanuelli, T. (2021). Natural deep eutectic solvent (NADES): A strategy to improve the bioavailability of blueberry phenolic compounds in a ready-to-use extract. *Food Chemistry*, 364, 130370.

Dai, Y., Witkamp, G., Verpoorte, R. y Choi, Y. (2013) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L.. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6272–6278.

De la Rosa, M. y Castillo, G. (2022) Análisis de compuestos fitoquímicos. En J. Morales (Ed.), *Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas* (pp. 77 – 106). Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes.

De León, E. J., Olmedo, D. A., Solís, P. N., Gupta, M. P., y Terencio, M. C. (2002) Diayangambin exerts immunosuppressive and anti-inflammatory effects in vitro and in vivo. *Planta medica*, 68(12), 1128–1131. DOI: 10.1055/s-2002-36355

de Lima, N. D., da Silva Monteiro Wanderley, B. R., Andrade Ferreira, A. L., Pereira-Coelho, M., da Silva Haas, I. C., Vitali, L., Dos Santos Madureira, L. A., Müller, J. M., Fritzen-Freire, C. B., y de Mello Castanho Amboni, R. D. (2024) Green extraction of phenolic compounds from the by-product of purple araçá (*Psidium myrtoides*) with natural deep eutectic solvents assisted by ultrasound: Optimization, comparison, and bioactivity. *Food*

research international (Ottawa, Ont.), 191, 114731. DOI:
10.1016/j.foodres.2024.114731

Delgado-Montemayor, C., Cordero-Pérez, P., Torres-González, L., Salazar-Cavazos, M., Saucedo, A., Paniagua-Vega, D., y Waksman-Minsky, N. (2022) Development of a Hepatoprotective Herbal Drug from *Turnera diffusa*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 5114948. DOI: 10.1155/2022/5114948

Dorantes-Barron, A., Viguera Villaseñor, R., Mayagoitia-Novales, L., Martínez-Mota, L., Gutiérrez-Pérez, O. y Estrada-Reyes, R. (2019) Neurobehavioral and toxicological effects of an aqueous extract of *Turnera diffusa* Willd (Turneraceae) in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 236, 50-62.

Estrada, A., Villarreal, J., Delgado, A., Encina, J., Salinas, M. y Cuéllar, L. (2022) *Arbustos y Árboles Silvestres de las Planicies Bajas y Laderas de Montaña en Nuevo León, México*. México: Instituto de Biología UNAM.

Fonnegra, R. (2023) Plantas medicinales y otros recursos naturales aprobados en Colombia con fines terapéuticos. Colombia: Universidad de Antioquía.

Gómez, A. V., Tadini, C. C., Biswas, A., Buttrum, M., Kim, S., Boddu, V. M., & Cheng, H. N. (2019). Microwave-assisted extraction of soluble sugars from banana puree with natural deep eutectic solvents (NADES). *Lwt*, 107, 79-88.

- Görög, S. (2018) *Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis*. Estados Unidos: CRC Press.
- Hao, Y., Pei, F., Huang, J., Li, G., y Zhong, C. (2024) Application of deep eutectic solvents on extraction of flavonoids. *Journal of separation science*, 47(9-10), e2300925. DOI: 10.1002/jssc.202300925
- Hayyan, M., Mbous, Y. P., Looi, C. Y., Wong, W. F., Hayyan, A., Salleh, Z., & Mohd-Ali, O. (2016). Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus*, 5(1), 913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2575-9>
- Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., y Mun'im, A. (2021) Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2091. DOI: 10.3390/plants10102091
- Hikmawanti, N. P. E., Saputri, F. C., Yanuar, A., Jantan, I., Ningrum, R. A., Juanssilfero, A. B., y Mun'im, A. (2024) Choline chloride-urea-based natural deep eutectic solvent for highly efficient extraction of polyphenolic antioxidants from *Pluchea indica* (L.) Less leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(2), 105537.
- Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables (1964) *Las zonas áridas del centro y noreste de México y el aprovechamiento de sus recursos*.

Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México: Ediciones de I.M.R.N.R., A.C.

- Jain, C., Khatana, S., y Vijayvergia, R. (2019) Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(2), 494-504.
- Jaramillo-Morales, O. A., Díaz-Cervantes, E., Via, L. D., Garcia-Argaez, A. N., Espinosa-Juárez, J. V., Ovando-Zambrano, J. C., ... y Bautista, M. (2023) Hepatoprotective activity, in silico analysis, and molecular docking study of verbascoside from *Leucophyllum frutescens* in rats with post-necrotic liver damage. *Scientia Pharmaceutica*, 91(3), 40.
- Jiménez-Ortega, L. A., Kumar-Patra, J., Kerry, R. G., Das, G., Mota-Morales, J. D., y Heredia, J. B. (2024) Synergistic antioxidant activity in deep eutectic solvents: extracting and enhancing natural products. *ACS Food Science & Technology*, 4(12), 2776-2798.
- Koh, Q. Q., Kua, Y. L., Gan, S., Tan, K. W., Lee, T. Z. E., Cheng, W. K., y Lau, H. L. N. (2023) Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): Physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 35, 101218.
- Krishnaswamy, N. (2012) *Chemistry of Natural Products*. 2ª ed. India: CRC Press LLC.

- Kua, Y. y Gan, S. (2019) Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) as a Greener Alternative for the Extraction of Hydrophilic (Polar) and Lipophilic (Non-Polar) Phytonutrients. *Key Engineering Materials*, 797, 20–28.
- Lawal, O. A., Avoseh, O. N., Tinubu, O. J., Ogunwande, I. A., Ascrizzi, R., Flamini, G. y Mtunzi, F. M. (2020) Anti-nociceptive Property, Anti-inflammatory Activity and Constituents of Essential Oils from the Leaves and Stem Bark of *Turnera diffusa* Wild (Passifloraceae) Growing in Nigeria. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(6), 473–483. DOI: 10.1080/22311866.2020.1865837
- Loukri, A., Sarafera, C., Goula, A. M., Gardikis, K., y Mourtzinou, I. (2022) Green extraction of caffeine from coffee pulp using a deep eutectic solvent (DES) *Applied Food Research*, 2(2), 100176.
- Ma, W., Tang, M., Li, S., Ma, Y., Ling, M., y Sheng, W. (2025) The effect of hydrogen bonding strength in natural deep eutectic solvents on the extraction efficiency of polyphenols. *Microchemical Journal*, 208, 112379.
- Makuasa, D. y Ningsih, P. (2020) The Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Using UV-Vis Spectrophotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology and Education*, 2(1), 11-17.
doi.org/10.35877/454RI.asci2133
- Martínez-Adriano, C. A., Jurado, E., Flores, J., González-Rodríguez, H., y Cuéllar-Rodríguez, G. (2016) Flower, fruit phenology and flower traits in

Cordia boissieri (Boraginaceae) from northeastern Mexico. *PeerJ*, 4, e2033.

Martínez-Ávila, G. C. G., Aguilar-Zarate, P., y Rojas, R. (2021) Currently Applied Extraction Processes for Secondary Metabolites from *Lippia turbinata* and *Turnera diffusa* and Future Perspectives. *Separations*, 8(9), 158. DOI: 10.3390/separations8090158

Mavai, S., Bains, A., Sridhar, K., Chawla, P., y Sharma, M. (2025) Emerging deep eutectic solvents for food waste valorization to achieve sustainable development goals: Bioactive extractions and food applications. *Food chemistry*, 462, 141000. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.141000

Mendoza, M. (2017) Aislamiento de compuesto(s) a partir de *Cordia boissieri* con potencial actividad antidiabética. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León].

Mitar, A., Panić, M., Prlić Kardum, J., Halambek, J., Sander, A., Zagajski Kučan, K., y Radošević, K. (2019). Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 33(1), 1-18.

Molina-Salinas, G. M., Rivas-Galindo, V. M., Said-Fernández, S., Lankin, D. C., Muñoz, M. A., Joseph-Nathan, P., Pauli, G. F., y Waksman, N. (2011) Stereochemical analysis of leubethanol, an anti-TB-active serrulatane, from *Leucophyllum frutescens*. *Journal of natural products*, 74(9), 1842–1850. DOI: 10.1021/np2000667

- Morales, G. (19 de septiembre de 2021) *Regulación de Medicamentos Herbolarios, Remedios Herbolarios, Homeopáticos, Medicamentos Vitamínicos*. 16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales 2021. Zacatecas, Zac. México.
- Nguyen, T. T. H., Lieu, L., Dao, D. T. P. Q., Pham, V. Y. N., & Nguyen, D. Q. (2025). Homogenization-Assisted Extraction of Antioxidants from *Centella asiatica* Using a Natural Deep Eutectic Solvent (NADES): Optimization and Evaluation . *Trends in Sciences*, 23(3), 11303.
- Organización Mundial de la Salud (2015) The use of herbal medicines in primary health care. Oficina Regional para Sureste de Asia. (16 de noviembre de 2025) <https://apps.who.int/iris/handle/10665/206476>
- Owis, A. I. (2014) Composition of essential oil from flowers of *Cordia boissieri* A. DC. and revision on the use of sesquiterpenes as taxonomic markers for genus *Cordia*. *World. J Pharm Pharm Sci*, 3, 133-141.
- Owis, A. I., Abo-youssef, A. M., y Osman, A. H. (2016) Protective effect of *Cordia boissieri* A. DC.(Boraginaceae) on metabolic syndrome. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 083-089.
- Oxford, G. (2013) *Landscaping with Native Plants*. 2ª ed. Estados Unidos: Voyageur Press; p. 118.
- Oza, M. J., y Kulkarni, Y. A. (2017) Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia*

(Boraginaceae). *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 69(7), 755–789. DOI: 10.1111/jphp.12715

Parra-Naranjo, A., Delgado-Montemayor, C., Fraga-López, A., Castañeda-Corral, G., Salazar-Aranda, R., Acevedo-Fernández, J. y Waksman, N. (2017) Acute Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Teuhetenone A Isolated from *Turnera diffusa*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(4), 599. DOI: 10.3390/molecules22040599

Parra-Naranjo, A., Delgado-Montemayor, C., Salazar-Aranda, R. y Waksman-Minsky, N. (2023) Bioactivity of the Genus *Turnera*: A Review of the Last 10 Years. *Pharmaceuticals*, 16, 1573. DOI: 10.3390/ph16111573

Patil, A. (2020) *Plant Secondary Metabolites*. India: Studera Press.

Peng, Z., Wang, Y., Li, W., Zhan, B., Zhu, L., Yang, D., ... y Zhao, Z. (2025) Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Amomum villosum* Lour. Using natural deep eutectic solvent: Process optimization, comparison, identification, and bioactivity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 116, 107304.

Peña, E. y Hernández, L. (2020) Recursos curativo y patrimonio biocultural en Suchitlán, Comala, Colima. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia.

Pereira, T. C., Souza, V. P., Padilha, A. P. F., Duarte, F. A., y Flores, E. M. (2025) Trends and perspectives on the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds using natural deep eutectic solvents. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 47, 101088.

- Poggi, G. M., Conti, V., Piana, L., Rudelli, C., Isani, G., Parrotta, L., & Del Duca, S. (2026) Influence of conventional and organic beekeeping on the nutraceutical properties of Italian honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 109057.
- Poonam, S. y Priya, S. (2016) Foliar appendages and phytochemical constituents of *Leucophyllum frutescens*. *International Journal of Research in Botany*.
- Popović, B. M., Gligorijević, N., Arandelović, S., Macedo, A. C., Jurić, T., Uka, D. y Serra, A. T. (2023). Cytotoxicity profiling of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *RSC advances*, 13(6), 3520-3527.
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Bubalo, M. C., Frece, J. y Redovniković, I. R. (2018). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 14188-14196.
- Rajha, H. N., Mhanna, T., El Kantar, S., El Khoury, A., Louka, N., & Maroun, R. G. (2019) Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvents and a new infrared technology. *Lwt*, 111, 138-146.
- Rimando, A. M., Dayan, F. E., Mikell, J. R., y Moraes, R. M. (1999) Phytotoxic lignans of *Leucophyllum frutescens*. *Natural toxins*, 7(1), 39-43.
- Sakurai, Y. C. N., Pires, I. V., Ferreira, N. R., Moreira, S. G. C., Silva, L. H. M. d., y Rodrigues, A. M. d. C. (2024) Preparation and Characterization of

Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs): Application in the Extraction of Phenolic Compounds from Araza Pulp (*Eugenia stipitata*). *Foods*, 13(13), 1983. DOI: 10.3390/foods13131983

Salazar, R., Pozos, M., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M. y Waksman, N. (2008) Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico, *Pharmaceutical Biology*, 46:3, 166-170. DOI: 10.1080/13880200701498952

Sandoval, E. (2005) *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. 1ª ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Santos-Martín, M., Cubero-Cardoso, J., González-Domínguez, R., Cortés-Trivino, E., Sayago, A., Urbano, J., & Fernández-Recamales, Á. (2023) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from blueberry leaves using natural deep eutectic solvents (NADES) for the valorization of agrifood wastes. *Biomass and Bioenergy*, 175, 106882.

Saud, B., Malla, R., & Shrestha, K. (2019). A review on the effect of plant extract on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Stem cells international*, 2019(1), 7513404.

Secretaría de Medio Ambiente del Estado de Nuevo León (2025) *Listado de árboles y plantas nativas del estado de Nuevo León*. Gobierno de Nuevo León.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2021) Plantas medicinales de México. Gobierno de México.

<https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico>

Sharma, V. (2025) *Physical Pharmaceutics*. Estados Unidos: JES Publication; p. 62

Shikova, V. A., Pozharitskaya, O. N., Flisyuk, E. V., Ivkin, D. Y., Borovikov, D. N., Balabanova, O. L., & Shikov, A. N. (2025). Safety of NADES Extract of *Glycyrrhiza* Roots After Topical Application and Peroral Administration to Mice. *Molecules*, 30(24), 4704.

Siddiqui, S. A., Ali Redha, A., Salauddin, M., Harahap, I. A., y Rupasinghe, H. P. V. (2025) Factors Affecting the Extraction of (Poly)Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction. *Critical reviews in analytical chemistry*, 55(1), 139–160. DOI: 10.1080/10408347.2023.2266846

Silva-Trujillo, L., Quintero-Rueda, E., Stashenko, E. E., Conde-Ocazonez, S., Rondón-Villarreal, P., & Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: Antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, in vitro and in silico analyses. *Molecules*, 27(20), 6844.

Soromou, L. W., Jiang, L., Wei, M., Chen, N., Huo, M., Chu, X. y Feng, H. (2013) Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion.

Journal of Immunotoxicology, 11(1), 56–61 DOI:

10.3109/1547691X.2013.792886

Szewczyk, K. y Zidorn, C. (2014) Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 424–443. DOI:

10.1016/j.jep.2014.01.019

Teoh, E. S. (2016) Secondary metabolites of plants. *Medicinal orchids of Asia*. Cham: Springer International Publishing, pp. 59-73.

Thabet, A. A., Ayoub, I. M., Youssef, F. S., Al Sayed, E., y Singab, A. N. B.

(2021) Essential oils from the leaves and flowers of *Leucophyllum frutescens* (Scrophulariaceae): phytochemical analysis and inhibitory effects against elastase and collagenase in vitro. *Natural Product Research*, 36(18), 4698–4702. DOI: 10.1080/14786419.2021.2000981

Research, 36(18), 4698–4702. DOI: 10.1080/14786419.2021.2000981

Tong, X., Yang, J., Zhao, Y., Wan, H., He, Y., Zhang, L., ... & Li, C. (2021).

Greener extraction process and enhanced in vivo bioavailability of bioactive components from *Carthamus tinctorius* L. by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 348, 129090.

Torres-González, L., Muñoz-Espinosa, L., Rivas-Estilla, A., Trujillo-Murillo, K.,

Salazar-Aranda, R., Waksman De Torres, N. y Cordero-Pérez, P. (2011)

Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of hepatology*, 10(1), 73–79.

- Tousson, E., Hafez, E., Zaki, S., Gad, A. y Elgharabawy, R. (2020) Evaluation of the testicular protection conferred by damiana (*Turnera diffusa* Willd.) against amitriptyline-induced testicular toxicity, DNA damage and apoptosis in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 132, 110819. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110819
- Ulloa, C. et al (2017) An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*, 358, 1614 – 1617. DOI:10.1126/science.aao0398
- Vargas-Mamani, J. J. (2024) El reactivo de Dragendorff:: origen, historia e importancia. *Revista Médica Basadrina*, 18(1), 52-57.
- Viñas-Ospino, A., Panić, M., Radojčić-Redovniković, I., Blesa, J., & Esteve, M. J. (2023). Using novel hydrophobic deep eutectic solvents to improve a sustainable carotenoid extraction from orange peels. *Food bioscience*, 53, 102570.
- Viveros-Valdez, E., Jaramillo-Mora, C., Oranday-Cárdenas, A., Morán-Martínez, J., y Carranza-Rosales, P. (2016) Antioxidant, cytotoxic and alpha-glucosidase inhibition activities from the Mexican berry Anacahuita (*Cordia boissieri*). *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(3), 211-218.
- Vo, T. P., Ho, M. T., Nguyen, P. U. N., Pham, N. D., Truong, K. V., Nguyen, T. H. Y., ... y Vo, T. T. H. (2024) Extracting phenolics, flavonoids, and terpenoids from *Codonopsis pilosula* using green solvents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 37, 101395.

- Wang, J. Y., Yu, H., Li, R. Y., Wang, R. Q., Wang, R. J., Zhang, Z. R., & Jiang, G. Q. (2024). Green and efficient extraction of polyphenols from *Aronia melanocarpa* using deep eutectic solvents. *Microchemical Journal*, *207*, 112228.
- Wang, Z., Wang, D., Fang, J., Song, Z., Geng, J., Zhao, J., Fang, Y., Wang, C., y Li, M. (2024) Green and efficient extraction of flavonoids from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves based on natural deep eutectic solvents: Process optimization, component identification, and biological activity. *Food chemistry*, *452*, 139508. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.139508
- Xu, L., Liaqat, F., Khazi, M. I., Sun, J., y Zhu, D. (2024) Natural deep eutectic solvents-based green extraction of vanillin: optimization, purification, and bioactivity assessment. *Frontiers in nutrition*, *10*, 1279552. DOI: 10.3389/fnut.2023.1279552
- Zhao, J., Dasmahapatra, A., Khan, S. y Khan, I. (2008) Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of ethnopharmacology*, *120*(3), 387-393.
- Zuo, J., Geng, S., Kong, Y., Ma, P., Fan, Z., Zhang, Y., y Dong, A. (2023) Current Progress in Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Active Components from Plants. *Critical reviews in analytical chemistry*, *53*(1), 177–198. DOI: 10.1080/10408347.2021.1946659