



Revista Mexicana de Ciencias
Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
México

Martínez-Báez, Abdel Z.; Oranday-Cárdenas, Azucena; Verde-Star, Julia; Arévalo-Niño, Katiushka; Ibarra-Salas, Ma. de Jesús; González-González, Gloria María; Rodríguez-Garza, Ramón Gerardo

Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 47, núm. 2, abril-junio, 2016, pp. 36-44
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
.png, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956610004>

- [Cómo citar el artículo](#)
- [Número completo](#)
- [Más información del artículo](#)
- [Página de la revista en redalyc.org](#)



Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Trabajo científico

Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*

Preliminary study of the antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* and *Magnolia grandiflora*

Adbel Z. Martínez-Báez,^{1,2} Azucena Oranday-Cárdenas,¹ Julia Verde-Star,¹ Katiushka Arévalo-Niño,¹ Ma. de Jesús Ibarra-Salas,² Gloria María González-González,³ Ramón Gerardo Rodríguez-Garza¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

²Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León

³Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

En el presente estudio se evaluaron extractos metanólicos de la parte aérea de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*, los cuales contienen compuestos fitoquímicos con actividad biológica. Los estudios preliminares muestran a *Juglans regia* como una especie óptima para su estudio, ya que presentó una mejor actividad antioxidante, mostrando una CI_{50} menor (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en comparación con el resto de las especies estudiadas, así como la inhibición del crecimiento bacteriano de aislados clínicos de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, y por no ser tóxica al mostrar una DL_{50} mayor a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el ensayo con nauplios de *Artemia salina*.

Abstract

In the present study the methanolic extracts of the aerial parts *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* and *Magnolia grandiflora* were studied, which contained phytochemical compounds with biological activity. Preliminary studies showed *Juglans regia* as an optimum specie for further research, since it showed a better antioxidant activity, with a lower IC_{50} (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$), in comparison to the other investigated species. In addition, it showed an inhibition of bacterial growth from clinical isolates of *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli* and not be toxic to show a LD_{50} greater than 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the test with *Artemia salina* nauplii.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*, *Magnolia grandiflora*, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, toxicidad.

Key words: *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*, *Magnolia grandiflora*, antioxidant, antibacterial activity, toxicity.

Correspondencia:

Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Laboratorio de Biología Celular y Genética
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Pedro de Alba y Manuel Barragán S/N Cd.
Universitaria. San Nicolás de los Garza. N.L. México,
CP. 66455
Tel. 8329-4000 ext. 6468
Correo electrónico: ramon.rodriguezgrz@uanl.edu.mx

Fecha de recepción: 20 de junio de 2016

Fecha de recepción de modificaciones: 9 de agosto de 2016

Fecha de aceptación: 23 de agosto de 2016

Introducción

La medicina tradicional ha motivado y contribuido al desarrollo de investigaciones relacionadas con el tratamiento de una inmensa gama de enfermedades. Considerando que México es el segundo país con más ecosistemas, la diversidad botánica existente en la región demanda la necesidad de aprovechar los recursos naturales, como sustento para el desarrollo de innovaciones médicas a largo plazo en el ámbito de fitoterapia como alternativa natural para dar tratamiento a enfermedades.¹ De acuerdo a la Organización Mundial de Salud, las enfermedades infecciosas ocasionan más de una cuarta parte de las defunciones a nivel global. Recientemente se ha reconocido la importancia para la salud pública de las infecciones nuevas, reemergentes o resistentes a antimicrobianos cuya frecuencia ha aumentado de manera alarmante en las últimas dos décadas. La resistencia microbiana demanda la necesidad de utilizar tratamientos más complejos y de mayor costo.²

En México las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. El uso etnomédico de las especies vegetales, se da en nuestro país no solamente en el medio indígena y el rural, sino también entre poblaciones mestizas y en zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muchos padecimientos. En la medicina tradicional mexicana, se han utilizado tés, infusiones y soluciones de cocimiento de hojas, ramas, flores, frutos y corteza de las especies utilizadas en el presente estudio, de manera separada, para aliviar dolores (musculares y digestivos) y en algunas enfermedades crónicas como la diabetes, la farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, enlista a *Magnolia grandiflora*, *Azadirachta indica*, al género *Juglans sp.* y a *Tecoma stans* (L.) H.B.K como especies de uso etnobotánico en México.³⁻⁵ Por lo tanto estas especies ampliamente distribuidas en el país se convierten en plantas de gran interés de estudio, más aun evaluando su actividad sobre microorganismos que presentan cierto grado de resistencia farmacológica, como lo son los cepas de aislados clínicos utilizadas en este estudio.

Azadirachta indica A. Juss pertenece a la familia Meliaceae y es conocida comúnmente como margosa, paraíso de la india, y como árbol de neem. Se ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios con actividad anticancerígena sobre diferentes líneas celulares,^{6,7} actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp.*⁸⁻¹²

actividad antioxidante de extractos obtenidos con diferentes solventes de las partes de la especie utilizando diferentes concentraciones,^{13,14} actividad antiinflamatoria de compuestos que han sido aislados comparándolos con la acción de fármacos antiinflamatorios,¹⁵⁻¹⁷ efecto hepatoprotector evaluado por medio de diferentes bioensayos,¹⁸⁻²¹ efecto cicatrizante,²²⁻²⁴ y actividad antidiabética.²⁵⁻²⁷ El principal compuesto que ha sido identificado es la azadiractina, así como la nimbolina, nimbina, nimbidina, nimbinato de sodio, gedunina, salannina, nimbaneno, 6 desacetilnimbaneno, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoicacadiradiona, nimbiol, quercetina, β sitosterol y flavonoides polifenólicos.²⁸ De la misma existen estudios que confirman que a 1500 mg/kg azaradictina, no se muestra toxicidad en modelos animales y otros demuestran toxicidad y efectos adversos a partir de la ingesta de 5 mL de aceite de semilla.²⁹⁻³³

Juglans regia L. (nuez de Castilla) árbol caducifolio de la familia de Juglandaceae, se ha demostrado que los compuestos de extractos acuosos presentan actividad antitumoral,³⁴ la alta capacidad antioxidante a partir de extractos crudos de metabolitos secundarios del fruto siendo los principales compuestos responsables: taninos, fenoles, isoflavonas, flavonoides³⁵⁻³⁸ estudios han revelado el efecto hepatoprotector de extractos con diferentes solventes,³⁹ actividad antibacteriana de amplio espectro sobre Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis* MTCC-435, *Bacillus subtilis* MTCC-441, *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas: *Proteus vulgaris* MTCC-321, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-1688, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*,^{40,41} los extractos en acetato de etilo de *J. regia* presentan una potente actividad antifúngica contra todas las cepas de *Candida spp.*^{42,43}

Tecoma stans (L.) Juss Ex Kunth perteneciente a la familia Bignoniaceae, árbol pequeño o arbusto bajo, sus hojas y raíces contienen compuestos bioactivos, obtenidos a partir de extracciones con solventes de diferentes polaridades. Se han aislado monoterpenos, flavonoides, lignanos y alcaloides con actividad antiinflamatoria.^{44,45} La tronadora, como es conocida comúnmente presenta actividad antidiabética reportada en un modelo murino y en adipocitos humanos,⁴⁶ de la misma forma existen estudios del efecto no tóxicos a 5000 mg/kg de extracto de acetato de etilo vía oral a ratas albinas⁴⁷, del efecto citotóxico sobre líneas de celular de fibroblastos a 100,000 $\mu\text{g/mL}$,⁴⁸ de la actividad antimicrobiana y efecto antioxidante de extractos obtenidos de manera continua con metanol y sus fracciones con acetato de etilo, cloroformo, n-butanol y acuosa de hojas y ramas por el método DPPH, siendo la fracción de acetato de etilo de hojas y ramas la que mostró el mayor porcentaje de inhibición con 83.4 ± 0.31 y $82.06 \pm 0.54\%$ respectivamente.^{49,50}

Magnolia grandiflora L. árbol monoico perennifolio de hasta 30 m de alto pertenece a la familia Magnoliaceae.⁵¹ Los principales compuestos que han sido aislados son los que contienen grupos bencenos, aceites esenciales, terpenoides, flavonoides, lignanos y neolignanos.^{52,53} Estudios demuestran que la presencia de lignanos como el Magnolol y aceites esenciales, extraídos con solventes de diferente afinidad polar, le atribuyen a la planta la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana.⁵⁴⁻⁵⁸

El proceso de oxidación y los agentes promotores son de suma importancia para la salud en la actualidad, ya que influyen considerablemente en la homeostasis celular en el organismo, asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido-reducción, cuando se pierde electrones de hidrógeno y ganancia de oxígeno en una molécula, mientras que otra molécula gana electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno. Este proceso es cotidiano en el organismo y representa balance redox o potencial redox. Un radical libre es aquella estructura química que presenta electrones no apareados, es altamente reactiva, a su vez forma otros radicales libres en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species), mismos que afectan a las células provocando estrés oxidativo. Múltiples estudios han relacionado este desbalance del sistema oxidativo, como también conocido como estrés oxidativo, con el que se relacionan alrededor de 100 enfermedades, entre las que se encuentran las cardiovasculares, cáncer, gástricas, infecciosas, neurológicas y del sistema endocrino.⁵⁹ La investigación basada en aprovechar el recurso natural con el que se cuenta, manifiesta la necesidad de buscar la presencia de metabolitos secundarios que presenten esa capacidad de estabilizar moléculas altamente reactivas. Estudios han reportado la presencia de moléculas con actividad antioxidante derivados de plantas utilizadas en la medicina tradicional o de algunos alimentos.^{60, 61}

Es indispensable considerar que los metabolitos secundarios presentan actividades biológicas útiles para la salud, pero de la misma forma pueden manifestar eventos de toxicidad, asociado a su concentración, por tanto, es necesario determinar y conocer la DL₅₀ de un extracto, ya que se busca siempre el efecto biológico benéfico aunado al no tóxico.^{62,63} Las larvas de *Artemia salina* han sido utilizadas en bioensayos en numerosas investigaciones, publicando la DL₅₀ de metabolitos secundarios aislados o de extractos crudos, ya que desde el punto de vista ecotoxicológico los invertebrados acuáticos juegan un papel importante en la transferencia de alimentos o flujo de energía dentro de la cadena alimentaria de estos ecosistemas, por lo que las alteraciones originadas por la presencia de un agente tóxico en uno de estos grupos pueden en algún grado, interferir con

otros componentes interdependientes de la cadena trófica. La evaluación de la toxicidad en larvas de *Artemia salina* además de ser un bioensayo, práctico y económico nos permite realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones de concentración-respuesta bajo condiciones controladas.^{64,65}

Por lo anterior el objetivo principal del presente estudio es conocer la actividad antioxidante de las especies mencionadas, así como la actividad antibacteriana y toxicidad de las mismas de manera preliminar, como una forma práctica y selectiva del material a trabajar en un proyecto de investigación en el área de recursos naturales. Los estudios preliminares son útiles para direccionar y dimensionar otros ensayos biológicos enfocados al tratamiento de enfermedades que siguen afectando a la población en nuestro país.

Material y Métodos

Reactivos y materiales

Metanol (Sigma-Aldrich), 1,1-Difenil-2-picrihidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), Gentamicina (Sigma-Aldrich), Agar Infusión cerebro-corazón (ICC) (BBL, Becton Dickinson), Sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt).

Material biológico

Material vegetal

Se utilizaron partes aéreas (hojas-corteza) de las especies *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*, los ejemplares fueron depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Cepas bacterianas

Serratia marcescens, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus pyogenes* cepas de aislados clínicos conservadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Artemia salina

Huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), adquiridos en Pet Mart Co., USA.

Recolección e identificación del material vegetal

El material vegetal se colectó en municipios del estado de Nuevo León, México, durante el periodo de febrero a julio del 2015, según como lo marca la Norma Oficial Mexicana

NOM-018-RECNAT-1999. *Azadirachta indica* #027501, *Juglans regia* #027502 y *Magnolia grandiflora* #027506 en zonas rurales del municipio de Monterrey, en donde se presenta clima semicálido subhúmedo con lluvias escasas en el año, *Tecoma stans* #027503 en el municipio de Rayones, donde la temperatura media anual es de 21 °C y la precipitación media anual es de 693 mm. Las plantas fueron identificadas por el Dr. Marco Guzmán Lucio, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Secado y molienda del material vegetal

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, posteriormente ya seco se molió en un molino Industrial Thomas-Wiley Scientific, para obtener un polvo de 0.5 mm de tamaño de partícula.

Extracción del material vegetal

Se pesaron 100 gramos de material vegetal seco y se adicionaron 500 mL de metanol grado reactivo destilado, se dejó a temperatura ambiente por 72 h, el macerado se filtró utilizando papel filtro de poro grueso repitiendo el proceso seis veces utilizando solvente nuevo en cada ocasión. El filtrado del macerado se concentró en un Rotavapor Buchi modelo 215 para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en estufa de aire caliente a temperatura menor a 50 °C. El extracto seco se almacenó en refrigeración a 4 °C en frasco ámbar hasta su utilización.

Ensayo para la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos fue determinada por el método de DPPH,⁶⁶ el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picrilhidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran el reactivo DPPH, medida por absorbancia a 519 nm transcurridos 30 min, en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5. Se utilizó Vitamina C como control positivo. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes

Para desarrollar el método se preparó la concentración inicial de DPPH 4 mg/100 mL de metanol y los extractos a 50 mg/mL, se pusieron en contacto en una celda por 30 min y se midió su absorbancia, para posteriormente calcular el porcentaje de inhibición y determinar la CI_{50} .

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH causado por los extractos metanólicos.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs. Inicial} - \text{Abs. Final})}{(\text{Abs. Inicial})} (100)$$

Donde:

% inhibición: porcentaje de inhibición de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min.

Abs. Inicial: absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH antes de estar en contacto con el extracto evaluado.

Abs. Final: absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min.

Actividad Antibacteriana

Los microorganismos utilizados son aislados clínicos de cepas bacterianas. Las pruebas antibacterianas se realizaron por el método de difusión en placa, colocando 50 µl (5 mg) de cada uno de los extractos, los cuales se prepararon a una concentración de 100 mg/mL en metanol absoluto en discos de 7 mm de diámetro de papel Whatman No 1 sobre una placa solida de medio ICC, previamente inoculada con 100 µl de una suspensión bacteriana activa de 1×10^6 UFC. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h.

Previamente se realizó la cinética de crecimiento bacteriano para determinar el tiempo de incubación necesario para lograr que la suspensión bacteriana tuviera una concentración de 0.5% en la escala de McFarland, lo que representa 0.1 de absorbancia a 625 nm según lo indica el McFarland Standard (Catálogo No. TM50-TM60).⁶⁷

Se calcularon los porcentajes de inhibición en relación con el control positivo 50 µl (4 mg) de Gentamicina 80 mg/mL. Los experimentos se analizaron bajo un diseño completamente al azar con dos repeticiones, se realizó un ANOVA y una prueba de comparación múltiple de medias con el método de Tukey mediante el uso del programa estadístico (SPSS statistics 20).

Bioensayo de Toxicidad

Se preparó una solución salina artificial (3.8%, p/v) usando la sal del mar y agua destilada. En cada ensayo, se añadieron 10 nauplios para probar soluciones a diferentes concentraciones de los extractos y controles (500, 240, 120, 100, 80, y 60 µg/mL). Como control positivo se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 400 ppm y solución salina artificial como control negativo. Los ensayos fueron mantenidos bajo iluminación artificial durante 24 horas a 27 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo se contaron las larvas vivas y muertas, para cada concentración probada y por el método estadístico probit se determinaron las DL_{50} . Cada concentración se ensayó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes.

Resultados y discusión

Actividad antioxidante

La figura 1 muestra la CI_{50} para cada especie evaluada, todas presentaron CI_{50} mayor a la Vitamina C la cual presentó una CI_{50} de $7 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$, seguido por *T. stans* con CI_{50} de $29 \pm 4.16 \mu\text{g/mL}$, *J. regia* con una CI_{50} de $35 \pm 10.50 \mu\text{g/mL}$ y existiendo una diferencia mayor con *M. grandiflora* que presentó CI_{50} de $194 \pm 6.92 \mu\text{g/mL}$ y con *A. indica* con una CI_{50} de $362 \pm 11.79 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados concuerdan con lo reportado con Mohamed⁴⁹ y col. en el 2012 donde mencionan que *T. stans* presenta compuestos fenólicos y flavonoides a lo que se le atribuye una buena actividad antioxidante, lo que concuerda con el presente estudio al presentar la menor CI_{50} , así mismo lo reporta Yang H⁶⁸ y col. en el 2015 al evaluar dicha actividad con extractos etanólicos de hojas de *Juglans regia*, lo que pudiera indicar que el metanol es un solvente adecuado para extraer compuestos con potencial antioxidante de una forma práctica, sencilla y económica. Guerra⁵⁶ y col. en el 2013 reportan un efecto antioxidante a partir de aceites esenciales

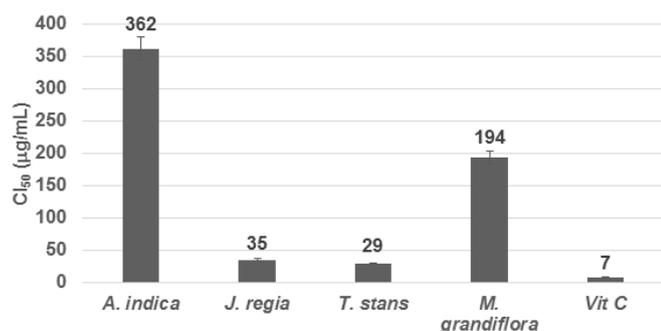


Figura 1. Actividad antioxidante de plantas en estudio (*A. indica*, *J. regia*, *T. stans* y *M. grandiflora*). n = 3 media de tres ensayos independientes.

de *M. grandiflora* compuestos que no se pueden extraer con el solvente utilizado, pero la actividad antioxidante de los extractos metanólicos sugiere la presencia de compuestos fenólicos antes mencionados. Por otra parte, Sithisarn¹³ y col. en el 2005 atribuyen a compuestos de extracciones acuosas, un potencial antioxidante lo que no concuerda con los resultados del presente trabajo posiblemente a razón de que la distribución de los compuestos bioactivos de las plantas es variable por diferentes factores ambientales. Los datos reportados sustentan el uso actual de las especies del estudio, en la medicina tradicional y resaltan la importancia del continuo estudio para combinar las especies, ya que contienen compuestos que pudieran ser utilizados como potentes agentes antioxidantes.

Actividad antibacteriana

Para el caso de la actividad antibacteriana la Tabla 1 muestra el porcentaje de inhibición al compararlo con el control positivo, en donde se observa que el extracto metanólico de *M. grandiflora* no muestra actividad sobre ninguna de las cepas en estudio; el extracto metanólico de *A. indica* muestra un porcentaje de inhibición de 12.16% solo sobre *S. epidermidis*, los extractos de *T. stans* y *J. regia* tienen potencial antibacteriano similar mostrando un porcentaje de 21.98% y 22.15% sobre *E. coli* respectivamente y *J. regia* además mostró un porcentaje de 23.10% para *E. cloacae*. Estos datos sugieren que los compuestos contenidos en los extractos metanólicos o la sinergia de los mismos, fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en las concentraciones utilizadas, resultados que concuerdan con lo publicado por Farooqui A.⁶⁹ y col. en el 2015 que trabajaron con extractos etanólicos de *J. regia* así como Amad M.⁷⁰ y col. en el 2012 con extractos acuosos de *T. stans*. Lo que pudiera indicar que la actividad antibacteriana la presentan compuestos fenólicos, mismos que generan cambios en la morfología celular

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los extractos (%) de inhibición.

Cepa	<i>A. indica</i>	<i>J. regia</i>	<i>T. stans</i>	<i>M. grandiflora</i>	Control (-) Metanol	Control (+) Gentamicina
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	100
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	100
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	-	100
<i>E. cloacae</i>	-	23.10	-	-	-	100
<i>E. coli</i>	-	22.15	21.98	-	-	100
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	100
<i>S. epidermidis</i>	12.16	20.25	-	-	-	100
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	100

Los resultados muestran el porcentaje (%) de inhibición con respecto al control positivo. n = 3 media de tres ensayos independientes.

bacteriana, siendo el punto de acción la pared celular y que pueden ser extraídos con el tipo de solvente utilizado.

Toxicidad

La Tabla 2 muestra la DL₅₀ de las especies en estudio, *J. regia* y *A. indica* no mostraron toxicidad por presentar una DL₅₀ mayor a 1000 (µg/ml), a diferencia de los extractos de *T. stans* y *M. grandiflora* que se consideraron moderadamente tóxicos por presentar una DL₅₀ entre 100-500 (µg/ml), esto con base a la clasificación de toxicidad establecida por CYTED.⁷¹ Matlawska I⁷² y col. en el 2015 mencionan que los extractos metanólicos de hojas de *J. regia* presentan cantidades (9.9±0.2 mg/100g) de juglona una quinona con antecedentes de toxicidad, actividad biológica que no concuerda con lo reportado en el presente estudio. Raizada RB³³ y col. en el 2001 reportan que en un modelo animal, 1500 mg/kg de azaradictina metabolito secundario principal de *A. indica* no muestra grados de toxicidad determinado por métodos histopatológicos, lo que concuerda con los resultados que muestra este estudio. La moderada toxicidad de los extractos de *T. stans* no concuerda con lo reportado por Raju S⁴⁷ y col. en el 2012 que mencionan un efecto no tóxico a 5000 mg/kg de extracto de acetato de etilo vía oral a ratas albinas. Para *M. grandiflora* existe poca información sobre su toxicidad, sin embargo, Dong L⁵⁸ y col. en el 2013 mencionan que compuestos fenólicos como el magnolol tienen efectos citoprotector. Lo anterior indica que los reportes de actividad biológica de plantas varían según los factores que pudieran modificar la concentración y distribución de los metabolitos secundarios en la planta, como lo son el clima, la zona, la temporada de recolección, maduración entre otros. De la misma forma los resultados resaltan la importancia de utilizar el método de toxicidad sobre larvas de *Artemia salina* en estudios preliminares, no solo por ser un bioensayo práctico, sencillo y económico, sino porque la información obtenida de este, ayuda a direccionar de manera importante bioensayos posteriores.

Tabla 2. Actividad de los extractos metanólicos sobre la letalidad de *Artemia salina*.

Extracto metanólicos	DL ₅₀ (µg/mL)
<i>A. indica</i>	>1000
<i>T. stans</i>	362
<i>J. regia</i>	>1000
<i>M. grandiflora</i>	400
Control (+) Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	12.5
Control (-) Solución salina 40 g/L	0

DL₅₀: concentración letal 50. Interpretación: DL₅₀ <100 µg/mL: tóxico. n = 3 media de tres ensayos independientes.

Conclusiones

Los extractos de *T. stans* y *J. regia* presentaron mayor actividad antioxidante, en cuanto a la actividad antibacteriana ambas especies mostraron inhibición sobre *E. coli*, *J. regia* mostró actividad inhibitoria sobre *E. cloacae* y *S. epidermidis*, *A. indica* solo mostro actividad contra *S. epidermidis*. En general las especies evaluadas no presentaron toxicidad en el ensayo sobre larvas de *A. salina*. De acuerdo a los resultados obtenidos, *J. regia* es una especie ideal para un estudio biodirigido, con el objeto de determinar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana y antioxidante.

Agradecimientos

Al Apoyo CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) Becario 514679.

Referencias

- Mabit J. Articulación de las Medicinas Tradicionales y Occidentales El Reto de la Coherencia. Memorias: Seminario Taller regional sobre políticas y experiencias de salud e interculturalidad. Quito, Ecuador: Centro Takiwasi. 2004. p 3-42.
- Programa Universitario México, Nación Multicultural-UNAM. Medicina Tradicional Mesoamericana en el contexto de la migración a los EUA. México. 2008. p 3-17.
- Secretaría de Salud en México. Farmacopea Herbolaria De los Estados Unidos mexicanos. México D.F. 2001. p 15-50.
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>. Acceso 28 Jul. 2016.
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/alfa.php?opcion=D&p=a>. Acceso 28 Jul. 2016.
- Roma A, Ovadje P, Steckle M, Nicoletti L, Saleem A, Pandey S. Selective Induction of Apoptosis by *Azadirachta indica* Leaf Extract by Targeting Oxidative Vulnerabilities in Human Cancer Cells. J Pharm Sci. 2015; 18(4):729-46.
- Morris J, Fang Y, De Mukhopdhyay K, Wargovich MJ. Natural Agents Used in Chemoprevention of Aerodigestive and GI Cancers. Curr Pharmacol Rep. 2016; 2(1):11-20.
- Ali W, Sultana P, Joshi M, Rajendran S. A solvent induced crystallisation method to imbue bioactive ingredients of

- neem oil into the compact structure of poly (ethylene terephthalate) polyester. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016; 1(64):399-406.
9. Kankariya AR, Patel AR, Kunte SS. The effect of different concentrations of water soluble azadirachtin (neem metabolite) on *Streptococcus mutans* compared with chlorhexidine. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2016; 34(2):105-10.
 10. Vennila K, Elanchezhiyan S, Ilavarasu S. Efficacy of 10% whole *Azadirachta indica* (neem) chip as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. Indian J Dent Res. 2016; 27(1):15-21.
 11. Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde DD. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. faecalis* - An *in vitro* study. J Int Oral Health. 2013; 5(6):61-6.
 12. Gonçalves FA, Andrade NM, Bezerra JN, Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, Vieira RH. Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008; 50(1):11-5.
 13. Sithisarn P, Supabphol R, Gritsanapan W.J Ethnopharmacol. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). 2005; 13 (99):109-12.
 14. Priyadarsini RV, Manikandan P, Kumar GH, Nagini S. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. Free Radic Res. 2009; 43(5):492-504.
 15. Kumar S., Agrawal D., Patnaik J., Patnaik S. Analgesic effect of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on albino rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2012, 3 (2):222-5.
 16. Naik M. R., Bhattacharya A., Behera R., Agrawal D., Dehury S., Kumar S. Study of anti-inflammatory effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on infected albino rats. Journal of Health Research and Reviews. 2014; 1(3): 66-9.
 17. Ilango K., Maharajan G., Narasimhan S. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Azadirachta indica* fruit skin extract and its isolated constituent azadiradione. Natural Product Research. 2013; 27 (16):1463-7.
 18. Baligar N. S., Aladakatti R. H., Ahmed M., Hiremath M. B. Hepatoprotective activity of the neem-based constituent azadirachtin-A in carbon tetrachloride intoxicated Wistar rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2014; 92 (4):267-7.
 19. Baligar N. S., Aladakatti, M R., Ahmed H., Hiremath M. B. Evaluation of acute toxicity of neem active constituent, nimbolide and its hepatoprotective activity against acute dose of carbon tetrachloride treated albino rats. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2014; 5 (8):3455-66.
 20. Bhanwra S. Effect of *Azadirachta indica* (neem) leaf aqueous extract on paracetamol induced liver damage in rats. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 2000, 44 (1):64-8.
 21. Kale B. P., Kothekar M. A., Tayade H. P., Jaju J. B., Mateenuddin M. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. Indian Journal of Pharmacology. 2003; 35:177-80.
 22. Ofusori D. A., Falana B. A., Ofusori A. E., Abayomi T. A., Ajayi S. A., Ojo B. Gastroprotective effect of aqueous extract of neem *Azadirachta indica* on induced gastric lesion in rats. International Journal of Biological and Medical Research, 2010; 1:219-22.
 23. Barua C. C., Talukdar A., Barua A. G., Chakraborty A., Sarma R.K., Bora R. S. Evaluation of the wound healing activity of methanolic extract of *Azadirachta Indica* (Neem) and *Tinospora cordifolia* (Guduchi) in rats. Pharmacologyonline. 2010;1:70-7.
 24. Osunwoke E. A., Olotu E. J., Allison T. A., Onyekwere J. C. The wound healing effects of aqueous leaf extracts of *azadirachta indica* on wistar rats. Journal of Natural Science and Research. 2013. 3 (6).
 25. Patil P. R., Patil S. P., Mane A., Verma S. Antidiabetic activity of alcoholic extract of Neem (*Azadirachta indica*) root bark. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. 2013; 3 (2):142-6.
 26. Dholi S. K., Raparla R., Mankala S. K., Nagappan K. *In vivo* antidiabetic evaluation of Neem leaf extract in alloxan induced rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011; 1 (4)100-5.
 27. Joshi B. N., Bhat M., Kothiwale S. K., Tirmale A. R., Bhargava S. Y. Antidiabetic properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: *In vivo* studies in murine diabetes model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011. doi: 10.1093/ecam/nep033.
 28. Alzohairy Hindawi. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016. doi: 10.1155/2016/7382506.
 29. Sinniah D., Baskaran G. Margosa oil poisoning as a cause of Reye's syndrome. The Lancet. 1981; 317 (8218):487-9.

30. Lai S. M., Lim K. W., Cheng H. K. Margosa oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy. *Singapore Medical Journal*. 1990; 31 (5):463-5.
31. Kumar S, Kumar N. Neem oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy in an infant. *Indian J Pediatric*. 2014; 81(9):955.
32. Jaiswal A. K., Bhattacharya S. K., Acharya S. B. Anxiolytic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1994; 32, (7):489-91.
33. Raizada R. B., Srivastava M. K., Kaushal R. A., Singh R. P. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001; 39 (5):477-83.
34. Dzidziguri D, Rukhadze M, Modebadze I, Bakuradze E, Kurtanidze M, Giqoshvili V. The study of the immune corrective properties of greek walnut (*Juglans regia* L.) septa on the experimental model of leukopenia. *Georgian Med News*. 2016; (252):84-9.
35. Yin TP, Cai L, Chen Y, Li Y, Wang YR, Liu CS, Ding ZT. Tannins and Antioxidant Activities of the Walnut (*Juglans regia*) Pellicle. *Nat Prod Commun*. 2015; 10(12):2141-4.
36. Ahmad H, Khan I, Wahid A. Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. *J Tradit Chin Med*. 2012; 32(3):411-4.
37. Chen N, Yang H, Sun Y, Niu J, Liu S. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*. 2012; 38(2):344-9.
38. Akbari V, Jamei R, Heidari R, Esfahlan AJ. Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chem*. 2012, 15; 135(4):2404-10.
39. Eidi A, Moghadam JZ, Mortazavi P, Rezazadeh S, Olamafar S. Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Pharm Biol*. 2011; 51(5):558-65.
40. Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. *PLoS One*. 2015, 26; 10(2):e0118431.
41. Zakavi F, Golpasand H L, Daraeighadikolaei A, Farajzadeh S A, Daraeighadikolaei A, Leilavi S Z. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria. *nt J Dent*. 2013. doi: 10.1155/2013/854765.
42. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(1):81-8.
43. Sharma RS, Mishra V, Singh R, Seth N, Babu CR. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants and cultivated ornamental species. *Fitoterapia*. 2008 Dec; 79(7-8):589-91.
44. Kameshwaran S, Suresh V, Arunachalam G, Frank PR, Manikandan V. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory potential of flower extract *Tecoma stans*. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44(4): 543-544.
45. Lovely T, Neha S., Navin S. Identification and standardization of *Tecoma stans* (L.) through transverse section, phytochemical investigation and powder characteristics determination of roots. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 3(3): 484-6.
46. Alonso AJ, Zapata R, Romo J, Camarillo P, Gómez M, Salazar LA. The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes *J Ethnopharmacol*. 2010 8;127(1):1-6.
47. Raju S, Kavimani S, Maheshwara Rao VU, Reddy KS, Kumar GV. Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity in vivo. *Asian Pac J Trop Med*. 2012; 4(9):680-5.
48. Al-Azzawi AM. Genotoxic and cytotoxic study of *Tecoma stans* Bignoniaceae. *Pak J Biol Sci*. 2012; 15(2):92-7.
49. Mohamed ZM, Yousry MG, Camacho LM, Nader AE, Salem AZ. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. *Phytomedicine*. 2012; 19(13):1185-90.
50. Anburaj G., Marimuthu M., Sobiyana P., Manikandan R. A review on *Tecoma stans*. *International Journal of Engineering Research and Modern Education*. 2016, 1 (1), ISSN (online): 2455-4200
51. González CM, *Especies vegetales de importancia económica en México*. Ed. Porrúa: México, D.F; 1984 p. 149.
52. Hiroshi A., Thien LB y Kawano S. Floral scents, leaf volatiles and thermogenic flowers in Magnoliaceae. *Plant Species Biology*. 2008. doi: 10.1046/j.1442-1984.1999.00015.x
53. Wen L.K., Ching Y.Ch., Tsong. L.H., Jih J.Ch. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities. *Photochemistry*. 2013. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.08.014
54. Hu Y, Qiao J, Zhang X, Ge C. Antimicrobial effect of *Magnolia officinalis* extract against *Staphylococcus aureus*. *Journal of the science of food and Agriculture* 2011; 91(6):1050-6.
55. Luo J., Xu Y., Zhang M., Gao L., Fang C., Zhou C.

- Magnolol Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response in Uterine Epithelial Cells : Magnolol Inhibits LPS-Induced Inflammatory response. *Inflammation* 2013; 36(5):997-1003.
56. Guerra B. L., Alvarez R. R., Salazar A. R., Torres C. A., Rivas G.V. Waksman T. N., Gonzalez G.G., Perez L.L. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. 2013 *Natural Products communications* 8(1):135-8.
 57. Bajpai, V. Yoon J., Kang S. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(10):2606-12.
 58. Dong L, Zhou S, Yang X, Chen Q, He Y, Huang W. Magnolol Protects Against Oxidative Stress-Mediated Neural Cell Damage by Modulating Mitochondrial Dysfunction and PI3K/Akt Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2013; 50(3):469-81.
 59. Coronado M., Vega s., Gutiérrez L.R., Vázquez M., Radilla C. V Antioxidants: present perspective for the human health .*Rev Chil Nutr*. 2015; 42 (2).
 60. Treviño N.F., Rodríguez G.R., Verde S.J, Morales R.M., Garza P.R., Rivas M.C., Oranday C.A. Actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinoereus stramineus*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2012,43 (1).
 61. Kakuta K, Baba M, Ito S, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K. New triterpenoid saponins from cacti and anti-type I allergy activity of saponins from cactus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012; 15,22(14):4793-800.
 62. Lagarto P.A., Silva Y.R., et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 2001, 8 (5): 395-400.
 63. Gonzalez P.Y., Aportela G. P. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*.2001; 1 (1):104-8.
 64. Sanchez L.N. Bioensayo General de letalidad en *Artemia Salina* a las fracciones del extracto etanolico de *P. guajaba* L y *P. guineese*. Sw. 2005 www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/download/76/72 Acceso 20 Mayo 2016
 65. Guṭu CM, Olaru OT, Purdel NC, Ilie M, Neamṭu MC, Dănciulescu Miulescu R, Avramescu ET., Margină DM. Comparative evaluation of short-term toxicity of inorganic arsenic compounds on *Artemia salina*. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(3):1091-6
 66. García C.L., Salinas-M. Y.,Valle-G. S. Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en potaya de mayo (*Stenocereus griseus*. H.) *Rev. Fitotec. Mex*. 2012; 35 (5): 1-5.
 67. McFarland J. Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc* 1907; 14:1176-8.
 68. Yang H, Sung SH, Kim YC. The ethanolic extract of *Juglans sinensis* leaves and twigs attenuates CCl₄-induced hepatic oxidative stress in rats. *Pharmacogn Mag*. 2015; 11(43):533-9.
 69. Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. *PLoS One*. 2015; 26; 10(2).
 70. Amad M. Al-Azzawi, Ekbal Al-Khateeb, Kulood Al-Sameraei, and Alyaa G Al-Juboori. Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from *Tecoma stans Bignoniaceae* in Iraq. *Pharmacognosy Res*. 2012; 4(1): 37–43.
 71. Pinzón R y Sánchez, C. 1995. Manual de técnicas de investigación: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). p 63-70.
 72. Matlawska I, Bylka W, Widy-Tyszkiewicz E, Stanis B. Determination of the juglone content of *Juglans regia* leaves by GC/MS. *Nat Prod Commun*. 2015;10:(7):1239-42.
 73. Burboa, Edgardo A. Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos de residuos de candelilla. *Rev. mex. cienc. farm*. 2014, vol.45, n.1, pp.51-56.
 74. Avalos JS, Treviño NJ, Verde SM, Rivas MC, Oranday CA, Moran MJ, Serrano GB, Morales RM. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Rev. mex. cienc. Farm*. 2014, vol.45, n.3, pp.39-44.