

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE TRES PLANTAS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

POR

LCA CATALINA LEOS RIVAS

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. DICIEMBRE 2010

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE TRES PLANTAS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

Por

LCA CATALINA LEOS RIVAS

Que presenta como requisito parcial  
para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

San Nicolás de los Garza, N.L. DICIEMBRE 2010

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE TRES  
PLANTAS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

Aprobación de la Tesis

---

Presidente: Dra. María Julia Verde Star

---

Secretario: Dra. María Porfiria Barrón González

---

Vocal: Dra. Catalina Rivas Morales

---

Vocal: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

---

Vocal: Dra. Delia Elva Cruz Vega

San Nicolás de los Garza, N.L.

Diciembre, 2010

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



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE TRES  
PLANTAS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE**

Por

**LCA CATALINA LEOS RIVAS**

Que presenta como requisito parcial  
para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química Analítica y Fotoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, y la división de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS, Monterrey, N.L. Bajo la dirección de:

---

Dra. María Julia Verde Star  
Director Interno

---

Dra. Delia Elva Cruz Vega  
Director Externo

---

Dra. Lidia Osuna  
Co-director Externo

*IN MEMORIAM*

Tu ausencia sigue doliendo con la misma intensidad que el día en que partiste y te extraño cada día más, pero eres mi motivación para seguir adelante porque sé que algún día volveremos a estar juntos... y Tú mi querido hijo “Don Chiquitinus” siempre estas presente en todo lo que hago, porque me guías y sé que en cada logro, en cada acierto, en cada triunfo estás Tú y que en cada fracaso, en cada error, en cada derrota también lo estás, siempre junto a mí en ese momento para alentar a mi alma a seguir luchando.

¡TE AMO!

## DEDICATORIA

A ti mi Marido, Juan Manuel Muñoz Domínguez, gracias por estar a mi lado, apoyarme, preocuparse por mí, pero principalmente Gracias Por Amarme.

A mi Princesa Mayor, Laura Catalina, eres lo más hermoso que tengo en la vida, llegaste en el momento justo para recordarme el sentido de la vida, tu eres y siempre serás mi orgullo.

A mi Princesita Menor, Adriana Paola, ese pedacito de cielo que Dios me envió para demostrarme que el Amor no tiene límites ni expectativas, Te Amo y en cada sonrisa tuya se regocija mi alma.

A mis Padres Manuel y Catalina principalmente por darme la vida y llenarla de amor y buenos ejemplos, gracias a ellos soy quien soy y estoy muy orgullosa de ello.

A mis hermanos Manuel y Francisco Fernando, siempre los tengo presentes y los amo mucho.

A mis suegros Juan y Minervas muchas gracias por acogerme y verme como su hija.

A mis cuñados Jaime, Lety, Adry y José; ser parte de su familia es muy divertido.

A mis sobrinos Ale, Axel, Ly, Lesly, Mimi, Mariangela, Diego y Edy los amo a todos por igual.

A Mi Tía Roció por ser una gran madre substituta con mis hijas, gracias por cuidar de lo más preciado que poseo y por hacerlo con tanto amor.

**AGRADECIMIENTOS A:**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología becario No. 204599.

Universidad Autónoma de Nuevo León Proyecto PAICYT: CA1502-07.



**AGRADECIMIENTOS**

Dra. Azucena y Dra. Julia gracias por toda su ayuda y consejos las quiero y las admiro, y doy gracias a Dios que las haya puesto en mi camino.

Dra. Adriana gracias por su compañerismo y amistad.

Dra. Delia gracias por tu amistad y por tu guía en todos los ensayos para obtener un trabajo de calidad.

Dr. Roberto Mercado mil gracias por toda su ayuda en el área de estadística, mi más profundo respeto y admiración.

Dra. Porfiria gracias por tu apoyo y tu paciencia a pesar de las desveladas y sobre todo por tu amistad.

Dr. Jaime gracias por ayudarme con la colecta de las especies vegetales, lo admiro y lo respeto.

Maestro Sergio gracias por toda su disposición para servir y por su ayuda con la fitoquímica, gracias por su amistad.

Ledy por tu amistad ha sido muy agradable trabajar hombro con hombro todo este tiempo.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacer ameno mi trabajo.

**TABLA DE CONTENIDO**

Agradecimientos	i
Tabla de contenido	iii
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Nomenclatura	x
Resumen y Abstract	xii

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. HIPÓTESIS</b>	4
<b>3. OBJETIVOS</b>	5
<b>4. ANTECEDENTES</b>	7
4.1 Actividad antimicrobiana de plantas en estudio	10
4.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	14
4.3 <i>Artemia Salina</i>	16

4.4 Citotoxicidad	18
4.5 Familia Boraginaceae	20
4.5.1 Generalidades	20
4.5.2 Compuestos químicos encontrados con actividad biológica	20
4.5.3 Descripción Botánica de la Familia Boraginaceae	26
4.6 Plantas estudiadas	27
4.6.1 <i>Cordia morelosana</i> L	27
4.6.2 <i>Borago officinalis</i> L	28
4.6.3 <i>Heliotropium amlexicaule</i> Vahl	29
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	30
5.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio	30
5.2 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas	30
5.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.	32
5.3.1 Activación de bacterias	33
5.3.2 Cultivo de bacterias	33
5.3.3 Activación de hongos	33
5.3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana	34
5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que muestren actividad biológica relevante	35
5.5 Identificación de las fracciones con actividad antibacteriana y antifúngica relevante mediante la técnica de bioautografía	35
5.5.1 Cromatografía en capa delgada de los extractos con concentración mínima inhibitoria relevante para separación de	35

sus fracciones	
5.5.2 Identificación de las fracciones activas	36
5.6 Evaluación de la toxicidad de los extractos mediante el Ensayo de Letalidad sobre <i>Artemia salina</i>	37
5.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i>	38
5.7.1 Cinética de Crecimiento	38
5.7.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> )	39
5.8 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular normal Vero mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> )	41
5.8.1 Cultivo Celular	41
5.8.2 Cinética de Crecimiento de la línea celular Vero	41
5.8.3 Determinación de Citotoxicidad en Cultivo Celular	42
5.9 Identificación parcial de los componentes de los extractos	44
5.9.1 Identificación por medio de reacciones químicas	44
<b>6. RESULTADOS</b>	49
6.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio	49
6.1.1 <i>Cordia morelosana</i>	49
6.1.2 <i>Borago officinalis</i>	49
6.1.3 <i>Heliotropium amplexicaule</i>	49
6.2 Obtención de los extractos metanólicos	50
6.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	51
6.4 Evaluación de la toxicidad de los extractos mediante el	51

---

Ensayo de Letalidad sobre <i>Artemia salina</i>	
6.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i>	54
6.5.1 Cinética de Crecimiento	54
6.5.2 Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) de Extractos	55
6.6 Evaluación de la citotoxicidad en Cultivo Celular	59
6.6.1 Cinética de Crecimiento	60
6.6.2 Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) de Extractos	60
6.7 Identificación parcial de los compuestos de las plantas en estudio	64
6.7.1 Pruebas químicas	64
<b>7. DISCUSIÓN</b>	66
<b>8. CONCLUSIONES</b>	72
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	74
<b>10. APÉNDICES</b>	85
10.1 Resumen Curricular	86
10.2 Artículo	87

## LISTA DE FIGURAS

No.	FIGURA	Página
1	<i>Corida morelosana</i>	27
2	<i>Borago officinalis</i>	28
3	<i>Heliotropium amplexicaule</i>	29
4	Diagrama de obtención de extractos	31
5	Ensayo para la determinación de la actividad antimicrobiana	34
6	Ensayo de letalidad de los extractos sobre <i>A. salina</i>	38
7	Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos sobre <i>E. histolytica</i>	40
8	Ensayo de citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular Vero	43
9	Colecta de material vegetal	49
10	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de Hoja de <i>H. amplexicaule</i>	51
11	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de Tallo de <i>H. amplexicaule</i>	52
12	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de Raíz de <i>H. amplexicaule</i>	52
13	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de Flor de <i>H. amplexicaule</i>	53
14	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de corteza de <i>C. morelosana</i>	53
15	Porcentaje de viabilidad sobre <i>A. salina</i> del extracto metanólico de	54

	la parte aérea de <i>B. officinalis</i>	
16	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS propagada en condiciones axénicas <i>in Vitro</i>	55
17	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de Hoja de <i>H. amplexicaule</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	56
18	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de Tallo de <i>H. amplexicaule</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	56
19	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de Raíz de <i>H. amplexicaule</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	56
20	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de Flor de <i>H. amplexicaule</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	58
21	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de <i>C. morelosana</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	58
22	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico de corteza de <i>B. officinalis</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	59
23	Cinética de crecimiento de las células Vero	60
24	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de hoja de <i>H. amplexicaule</i>	61
25	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de <i>H. amplexicaule</i>	61
26	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de <i>H. amplexicaule</i>	62
27	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de <i>H. amplexicaule</i>	62
28	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de <i>C. morelosana</i>	63
29	Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de <i>B. officinalis</i>	63

**LISTA DE TABLAS**

<b>No.</b>	<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
<b>I</b>	Microorganismos utilizados	32
<b>II</b>	Rendimiento y parte utilizada de las plantas estudiadas	50
<b>III</b>	Cinética de crecimiento de las células Vero	60
<b>VI</b>	Grupos funcionales de los extractos metanólicos de la corteza de <i>C. morelosana</i> , parte aérea de <i>B. officinalis</i> y de hoja, tallo, raíz y flor de <i>H. amplexicaule</i> .	65



**NOMENCLATURAS**

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
ATCC	American Type Culture Collection
cel	Células
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria Media
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Días
g	Gramos
G	Tiempo de generación
h	Horas
IS	Índice de selectividad
m	Metros
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Mililitros
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetranolium bromuro

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/E	Penicilina/Estreptomicina
PAHO	Pan American Health Organization
RF	Ratio of Front
UFC	Unidades formadoras de colonias
WHO	World Health Organization
µg	Microgramos
µl	Microlitros

## RESUMEN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria, así mismo el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos patógenos ha provocado que muchos investigadores impulsen la búsqueda de actividad biológica en plantas medicinales. En este trabajo se evaluó la actividad bactericida, fungicida, amebicida, tóxica y citotóxica, también se identificó parcialmente la presencia de compuestos químicos de los extractos metanólicos, previamente desgrasados con hexano y cloroformo, de plantas de la familia Boraginaceae: *Cordia morelosana*, *Borago officinalis* y *Heliotropium amplexicaule*. Los extractos no mostraron actividad bactericida ni fungicida contra los microorganismos evaluados por la técnica de difusión en placa, estos extractos mostraron actividad amebicida contra *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*, siendo el más activo el extracto de raíz de *H. amplexicaule* con una  $IC_{50}$  de 2  $\mu\text{g/ml}$ , además este extracto presentó una menor citotoxicidad sobre células normales Vero de mamífero con una  $IC_{50}$  mayor a 250  $\mu\text{g/ml}$  mediante el ensayo de Cell-Titer Blue; no mostraron actividad bactericida ni fungicida contra los microorganismos evaluados por la técnica de difusión en placa, todos los extractos de las plantas evaluadas no mostraron toxicidad mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*. Entre los metabolitos secundarios identificados podemos destacar la presencia de alcaloides ya que estos fueron encontrados en todos los extractos y estos pudieran ser los responsables de la actividad amebicida.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), approximately 80% of the world's population depends on traditional medicine for primary care, likewise the development of resistance by pathogenic microorganisms encouraged many researchers to look for biological activity in medicinal plants. In this study we have evaluated the bactericidal, fungicidal, amebicide, toxic and cytotoxic activity. We also identified partially the presence of chemical compounds from methanol extracts, previously defatted with hexane and chloroform, from Boraginaceae plants'family: *Cordia morelosana*, *Borago officinalis* and *Heliotropium amplexicaule*. These extracts did not show antibacterial nor antifungal activity against microorganisms tested by the diffusion disk technique, these extracts showed amebicide activity against *E. histolytica* HM1-IMSS under axenic conditions *in vitro*, being the root extract of *H. amplexicaule* the most active with a  $CI_{50}$  of 2  $\mu\text{g/ml}$ , this extract also showed less cytotoxicity on normal Vero mammalian cells with a  $CI_{50}$  major to 250  $\mu\text{g/ml}$  by testing Cell-Titer Blue; they did not show bactericidal or fungicidal activity against microorganisms tested by the disk diffusion technique, all tested plant extracts did not show toxicity by lethality test on *Artemia salina*. Among the secondary metabolites identified we can highlight the presence of alkaloids since they were found in all extracts and could be responsible for the amebicide activity.

## 1 INTRODUCCIÓN

No es posible definir una fecha ni un lugar en donde se da el inicio del uso de las plantas para tratar enfermedades, esto seguramente inició cuando el hombre dejó de ser nómada y se volvió sedentario, este simple cambio le dio la oportunidad de observar, experimentar y de cierta forma documentar por tradición oral todo lo que pasaba a su alrededor, iniciando así la aplicación del método científico. Existen documentos que prueban que las plantas se utilizan para tratar diversas enfermedades desde hace miles de años. Muchas de las drogas convencionales provienen de fuentes vegetales: hace cien años, la mayor parte de las pocas drogas efectivas derivaban de las plantas (Vickers y Zollman, 1999)

El término antibiótico fue utilizado por primera vez en 1942 por Selman Waksman, con este término describía todas las formulaciones que fueran antagonistas al crecimiento de organismos y derivadas de otros organismos vivos, en la actualidad este término se utiliza indistintamente para referirse también a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos. La revolución de los antibióticos se inicia en los años 40's gracias a la producción a gran escala de la penicilina, este antibiótico se empezó a administrar a

cerdos en dosis subterapéuticas como promotor del crecimiento. Cuando se creía que se había ganado la batalla contra los microorganismos, se empezó a observar el fenómeno de resistencia, que se debe en gran medida, a la introducción de gran cantidad de antibióticos, aunado a esquemas incompletos y posiblemente a los antibióticos introducidos en dietas animales, la resistencia de las cepas bacterianas ha dado por resultado un aumento en los índices de morbilidad y mortalidad, así mismo, un incremento en la duración de los tratamientos y las dosis efectivas aumentando los costos en el Sector Salud; otro problema de gran importancia para este sector son las enfermedades parasitarias, principalmente la amibiasis, la cual es la responsable de 40 000 a 100 000 muertes anualmente a nivel mundial, en México se presentaron 550 muertes entre los años 2004 y 2008 así como un promedio de 978 mil nuevos casos reportados entre el 2000 y el 2006, aunado a esto el parásito *Entamoeba histolytica* (responsable de la enfermedad) ha desarrollado resistencia a la droga utilizada comúnmente para tratar dicho padecimiento. Por tal motivo, en la actualidad se están buscando sustancias de origen natural que posean la capacidad de atacar a las cepas resistentes y que al mismo tiempo, sean inocuas con el huésped; para poder llevar a cabo esto, se utiliza la investigación fitoquímica, cuyo objetivo principal es: aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones. En Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (Valdez-Aguilar, 2001)

México es considerado un país con un sistema “tolerante” de la medicina tradicional y otras formas de atención médica no institucionales. Al encontrarse la medicina tradicional mexicana fuera de este reconocimiento oficial, es difícil determinar

el número de mexicanos que recurren a ella para el tratamiento de sus problemas de salud. Se calcula que entre 15 y 20 millones de mexicanos son pacientes de la medicina tradicional. Según investigaciones realizadas, una cantidad bastante elevada de derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social, mantiene relación con la medicina tradicional. (Quintero, 1998). En la actualidad ya han sido identificadas más de 5,000 especies mexicanas que tienen aplicaciones curativas (Valdez-Aguilar, 2001).

La presente investigación pretende evaluar la actividad antibacteriana, antifúngica y amebicida de tres especies de la familia Boraginaceae frente a microorganismos de importancia médica, como una alternativa natural al tratamiento tradicional.

## 2 HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule*, *Cordia morelosana* y *Borago officinalis* de la familia Boraginaceae poseen actividad biológica contra hongos, bacterias y amibas y no son tóxicos para los humanos.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana, antimicótica, antiamebiana, tóxica y citotóxica de los extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule*, *Cordia morelosana* y *Borago officinalis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Colectar e identificar las plantas *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis*.
2. Obtener los extractos metanólicos de: hojas, raíz, inflorescencias y tallos de las plantas en estudio.
3. Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos que muestren actividad biológica relevante.
5. Identificar las fracciones con actividad antibacteriana y antifúngica relevante mediante la técnica de bioautografía.
6. Evaluar la toxicidad de los extractos mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*.

7. Determinar la Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ ) de los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas *in vitro*.
8. Evaluar la citotoxicidad de los extractos activos sobre la línea celular normal Vero.
9. Identificar parcialmente los componentes de los extractos con actividad relevante.

#### 4 ANTECEDENTES

Existen documentos que prueban que las plantas se utilizan para tratar diversas enfermedades desde hace miles de años, como son las tablillas de arcilla de los Sumerios que datan de 4,000 años a.C. en las que se documenta que este pueblo elaboraba medicinas con casia, mirto, tomillo y otros. En Egipto se han encontrado una gran cantidad de papiros, principalmente en las tumbas de los faraones, destacando el de Smith y el de Ebers, este segundo es un copilado de 2 milenios anteriores, sobre el uso de las plantas para tratar enfermedades y se divide en tres partes: el uso de la planta, indicaciones al médico sobre la preparación e indicaciones al paciente sobre su uso. (Panoto-s, 2007)

El empleo de agentes farmacológicos en el tratamiento de infecciones comienza hace más de 2500 años cuando los chinos utilizaron la cáscara enmohecida de soya en el tratamiento de los forúnculos. El término antibiótico fue utilizado por primera vez en 1942 por Selman Waksman, con este término describía todas las formulaciones que fueran antagonistas al crecimiento de organismos y derivadas de otros organismos vivos,

en la actualidad este término se utiliza indistintamente para referirse también a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos. En Francia en el año de 1897 la penicilina fue descubierta por Ernest Duchesne pero su trabajo pasó inadvertido por la sociedad científica, en 1909 en Alemania, el científico Paul Ehrlich desarrolló el Salvastran, un antibiótico de corto espectro derivado del arsénico que fue utilizado para tratar la sífilis, un problema de salud pública en esa época. Alexander Fleming observó la inhibición producida por el hongo *Penicillium* y la llamó penicilina, a él se le atribuye el descubrimiento de ésta debido a que pudo interpretar acertadamente lo que estaba observando. La llamada edad de Oro de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos, este antibiótico se empezó a administrar a cerdos en dosis subterapéuticas como promotor del crecimiento. Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos o sintetizados por métodos químicos, cuya función es suprimir el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente destruirlos. (Patiño, 2003)

En los últimos años las infecciones causadas por microorganismos se han incrementado debido diferentes causas como: al aumento de pacientes inmunodeprimidos, uso frecuente de procedimientos invasores como la diálisis, a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro y uso de glucocorticoides. (Mesa Arango, 2004)

Aproximadamente del 25 al 50% de los fármacos actuales son derivados de plantas, a pesar de los avances en química médica, que han permitido la síntesis de compuestos químicos, algunos medicamentos importantes de la medicina científica son todavía derivados directamente de las plantas por ser más económicos o por su complejidad. Las plantas son ricas en una gran variedad de metabolitos secundarios como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, los cuales, se ha observado que poseen propiedades antimicrobiales *in vitro*. (Cowan, 1999; Ricker *et al.*, 1998, Pamplona, 2000)

Actualmente de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria (Chellaiah Muthu, 2006). La validación o descubrimiento de compuestos presentes en plantas usadas empíricamente en la medicina tradicional apoyan la utilización popular de éstas.

La introducción de gran cantidad de antibióticos en el mercado ha alterado la ecología clásica de los gérmenes, dando sin saberlo una gran ventaja a las bacterias. La resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos se da a través de los mecanismos que estos han desarrollado lo que les confieren la capacidad de inactivar la acción de los antibióticos. Otras causas y factores que se asocian con la aparición de cepas bacterianas resistentes son el uso irracional y abuso de estos medicamentos, su empleo en tratamientos en el campo veterinario que pueden llegar a generar resistencias en gérmenes que afectan a los humanos, así como, el hecho de que la propia flora bacteriana normal del hombre pueda ser en muchas ocasiones resistente a la acción de

los antibióticos. La resistencia a los antibióticos es un problema sanitario muy importante que supone un incremento de la morbilidad y mortalidad. (Patiño, 2003)

El conocimiento de la medicina tradicional acerca de las plantas medicinales y su uso por culturas indígenas no es solo para utilizarlo en la conservación de las tradiciones culturales y la biodiversidad, sino también para el cuidado de la salud de la comunidad y el desarrollo de medicamentos en el presente y el futuro. (Chellaiah Muthu, 2006)

#### **4.1 Actividad antimicrobiana de plantas en estudio**

Las plantas son utilizadas universalmente para tratar enfermedades, y continuamente nuevas drogas son descubiertas a través de la investigación de estas. Existen más de 20,000 especies utilizadas en medicina tradicional.

Las plantas presentan una habilidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, principalmente fenoles o sus derivados sustituidos con oxígeno. Muchos de estos compuestos son metabolitos secundarios, aproximadamente 12,000 han sido aislados, (menos del 10% del total). En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa a la planta frente a la depredación por microorganismos, insectos o herbívoros. Algunos como los terpenoides, dan a la planta su olor; las quinonas y taninos son responsables de la pigmentación de la planta, otros compuestos son responsables del sabor (ej. terpenoide capsaicina del chile). Por otro lado algunas de

las mismas hierbas y especies usadas para sazonar los alimentos producen compuestos medicinales útiles. (Cowan M. M., 1999)

Ricker *et al*, 1998, mencionan que los compuestos vegetales secundarios (compuestos químicos que no son propagados en el reino vegetal) son probablemente los responsables del equilibrio ecológico entre los herbívoros que desean comer plantas y éstas que necesitan defenderse de ellos. La producción química puede ser la respuesta evolutiva a la presión de selección para desarrollar una formación de compuestos, con propiedades repelentes o tóxicas a fin de defenderse.

La literatura científica incluye investigación del efecto de extractos vegetales sobre diferentes microorganismos o funciones fisiológicas del hombre. En un estudio efectuado por Juárez-Palafox S. en el 2000, analizó los extractos de 42 plantas de uso común frente a cepas de *Aspergillus*; utilizando etanol (96%) como solvente de extracción y la técnica de pozo en agar. Reportando que 11 extractos mostraron halos de inhibición de crecimiento en las especies de *Aspergillus*; resaltando al anís (*Pimpinella vulgaris* L.) que formó halos de inhibición que permanecieron por 7 días en casi todas las cepas de *Aspergillus* excepto *A. Níger* 1051 en donde inhibió el crecimiento de esporas únicamente y *A. fumigatus* NADC 0073 en donde el crecimiento no se vió afectado por el extracto.

Continuando sobre la misma línea de investigación, Rosas-Taraco en el 2001, probó extractos etanólicos, metanólicos y acuosos obtenidos de la hoja de *Agave americana*, sobre tres cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus*, observando que ningún

extracto inhibió el crecimiento del hongo, pero todos afectaron el proceso de conidiogénesis; cabe recalcar que el extracto acuoso presentó mayor actividad sobre el proceso de conidiogénesis.

García-Galván (2003) aisló los principios activos (metabolitos secundarios) presentes en *Carya illinoensis*, *Machaeranthera scabrella*, *Ruta chalepensis* y *Thymus vulgaris*, contribuyendo así a la quimiotaxonomía de sus familias y además determinar su actividad contra hongos de importancia médica, tales como: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *M. gypseum*, *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Sporothrix schenckii*.

En un estudio previo realizado por Carranza-Torres en el 2006, detectó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Jatropha dioica* frente a bacterias del área gingival y subgingival, causantes de periodontitis del adulto. Los resultados obtenidos a partir de este estudio, abren un panorama favorable, para proponer a *J. dioica* como fuente para obtener fármacos de origen natural para el tratamiento de enfermedades periodontales.

En el 2006 Céspedes *et al.* aislaron 5 lignanos a partir del extracto metanólico de *Araucaria araucana* y sus estructuras fueron dilucidadas por métodos espectroscópicos. En los ensayos de sensibilidad antimicrobiana, se pudo observar que las bacterias Gram positivas utilizadas fueron más susceptibles al pinosinol, mientras que el secoisolariciresinol mostró una actividad antifúngica significativa frente a los hongos *Trametes versicolor* y *Ceratocystis pilifera* al inhibir su crecimiento micelial a



concentraciones de 300-400 µg/disco. Por otro lado el extracto metanólico de *Araucaria araucana* obtuvo su actividad máxima en concentración de 400 µg/disco al inhibir completamente el crecimiento de *T. versicolor*, *Fusarium spp.* y *T. mentagrophytes*.

Asres *et al* en el 2006, demostraron que el extracto acetónico de la corteza de *Combretum molle* (Combretaceae) presentaba actividad frente a bacterias Gram negativas, registrando una mínima concentración inhibitoria (CMI) para *E. coli* y *Shigella spp* de 50 mg/ml; mientras que cepas de *C. albicans* mostraron alta sensibilidad al extracto e inhibición completa de su crecimiento a una concentración de 400 µg/ml.

Hernández *et al*, 2003 realizaron un estudio de la etnobotánica y la actividad antibacterial de algunas plantas utilizadas en de la medicina tradicional del estado Puebla que son utilizadas para tratar enfermedades gastrointestinales entre ellas *Cordia curassavica*, donde se observó que todos los extractos hexánicos presentaron actividad sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

En 2005 se realizó una evaluación del potencial anti diarreico del extracto de raíz de *Trichodesma indicum* en ratas, reportando que el extracto etanólico posee una actividad antidiarreica significativa y gracias a esto se justifica el uso como remedio herbal no específico para el tratamiento de la diarrea. (Perianayagam *et al*, 2005)

Okusa *et al*, 2007, estudió la actividad antimicrobiana de diversos extractos de *Cordia gilleti*, obteniendo que el extracto metanólico mostró actividad antagonista en la

cepas de los microorganismos estudiados, los resultados obtenidos sugieren que la planta es útil en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Hernández *et al*, 2007, evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las partes aéreas de *Cordia curassavicum*, observándose actividad contra las bacterias gram positivas y gram negativas, así como hongos, en base a estos resultados se confirma su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias, gastrointestinales y dermatológicas.

Kloucek, *et al*, 2007 estudiaron la actividad antimicrobiana de algunas cortezas medicinales utilizadas en las Amazonas Peruanas entre ellas la corteza de *Cordia allidora* y obtuvieron que todas las plantas estudiadas poseen un significativo efecto antimicrobiano.

Gilani *et al*, 2007, realizaron un trabajo sobre las bases farmacológicas para el uso de *Borago officinalis* en enfermedades gastrointestinales, respiratorias y cardiovasculares y los resultados sugieren que los efectos espasmódicos del extracto crudo de hojas de *Borago officinalis* son mediados posiblemente por el mecanismo antagonista de  $Ca^{++}$ , el cual podría explicar su uso tradicional en enfermedades gastrointestinales, respiratorias y cardiovasculares.

Osuna *et al* en 2002 evaluaron 5 plantas utilizadas tradicionalmente para tratar diversos padecimientos, entre ellas *Tournefortia densiflora* planta de la familia Boraginaceae, en este estudio se evaluó la actividad antibacterial y antiespasmódica observándose resultados favorables.

#### 4.2 *Entamoeba histolytica*

La amibiasis es definida por WHO (World Health Organization) y PAHO (*Pan American Health Organization*) como “la condición de portar al parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas” (OMS, 1997) y es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo (Stanley, 2003). En países en vía de desarrollo es un importante problema de salud y es responsable de aproximadamente de 40 000 a 100 000 muertes a nivel mundial (Bharti *et al* 2002; Long *et al*, 2007). *E. histolytica*, es un protozoo parásito que tiene una distribución cosmopolita en donde imperan condiciones de sanidad deficientes e inadecuadas; la mayoría de las infecciones son asintomáticas y puede aparecer meses o años después de haber sido expuesto. (Pritt y Clark, 2008)

En México, en el año 2003, un estudio gubernamental reportó 4 556 casos causados por infecciones intestinales (Paniagua *et al*, 2007). Para el tratamiento de la amibiasis la droga de elección es el metronidazol y sus derivados imidazoles, sin embargo; *E. histolytica* ha desarrollado un mecanismo de resistencia a esta droga sistémica (Wassmann *et al*, 1999), asimismo; se han reportado cepas de *E. histolytica* que presentan multidrogoresistencia (Orozco *et al*, 2002); por otra parte, Samarawickream *et al.*, 1997, reporta que esta droga es mutagénica, carcinogénica y neurotóxica en bacterias, hámster y gatos respectivamente.

La búsqueda de nuevos tratamientos antiaméuticos es importante para el control de la enfermedad (Cruz-Vega *et al* 2000). Actualmente, se tienen evidencias del uso de

plantas medicinales que tienen propiedades amebicidas y no representan riesgos tóxicos para el usuario. De la misma manera, se han aislado compuestos bioactivos de estas plantas con la misma seguridad y eficacia.

Osuna *et al.*, (2003) evaluaron la actividad antiprotozoaria de diversos extractos de plantas, entre ellas *Tournefortia densiflora*, observando que *T. densiflora* presentaba el mayor potencial actividad contra los organismos estudiados.

### **4.3 *Artemia Salina***

El ensayo de letalidad sobre *A. salina* fue propuesto por Michael *et al* en 1956 y posteriormente desarrollado por Vanhaecke *et al* en 1981 y también por Sleet y Brendel en 1983. Este estudio se basa en la habilidad de matar artemias cultivadas en el laboratorio (Carballo *et al*, 2002). El ensayo de letalidad sobre *A. salina* es considerado una herramienta muy útil para la evaluación preliminar de la toxicidad (Solis *et al*, 1993), y este ha sido utilizado en la detección de toxinas fúngicas (Harwing y Scott, 1971), toxicidad de extractos de plantas (McLaughlin *et al*, 1991), metales pesados (Martínez *et al*, 1998), toxinas de cianobacterias (Jaki *et al*, 1999), pesticidas (Barahona y Sánchez-Fortún,1999), y en el ensayo de citotoxicidad de materiales dentales. (Pelka *et al*, 2000)

Harwing y Scott en 1971 describió el uso de las larvas de artemia como un sistema de detección de toxinas fúngicas así como investigar la su sensibilidad con algunas micotoxinas conocidas, este ensayo tiene la ventaja que los huevecillos de artemia se pueden adquirir comercialmente. Las larvas de artemia fueron encontradas como una prueba conveniente para la toxicidad de metabolitos fúngicos, los resultados obtenidos en este ensayo podría ser un sistema de detección adecuado para la prueba de toxinas fúngicas.

Carballo *et al* (2002) realizaron una comparación entre dos ensayos con artemia para detectar la citotoxicidad *in vitro* de productos naturales marinos y ellos obtuvieron que en sus resultados se demostraba la correlación establecida previamente entre el ensayo de letalidad y la citotoxicidad y recomiendan que se realicen ambos ensayos simultáneamente para probar la actividad farmacológica de los productos naturales marinos.

Latha *et al* (2006) evaluaron la actividad antimicrobial y tóxica de los extractos crudos de *Psophocarpus tetragonolobus* pods, los extractos etanólicos fueron probados sobre artemias y se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* sobre eritrocitos de oveja, y observaron que en el ensayo de letalidad sobre artemia no se mostraba toxicidad significativa, mientras que en la prueba sobre eritrocitos de oveja se mostraba citotoxicidad significativa. Los resultados sugieren que los extractos de *P. tetragonolobus* no presentan toxicidad significativa sobre humanos. Estos resultados sugieren que los extractos etanólicos son una potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos.

Bastos *et al* (2009) realizaron un estudio de la actividad antimicrobiana y la toxicidad sobre artemia de extractos y algunos constituyentes de *Zeyheria tuberculosa*, los resultados obtenidos muestran que los extractos y las flavonas aisladas de *Z. tuberculosa* podrían ser usadas particularmente sobre dos microorganismos patógenos, *S. aureus* y *C. albicans*. Estos resultados podrían justificar el uso popular para esta especie ya que algunas fracciones probadas tuvieron actividad antimicrobial y otros mostraron un efecto tóxico significativo sobre artemia.

Se realizó una detección primaria de la bioactividad de cianobacterias de agua salada utilizando extractos crudos sobre larvas de *A. salina*. El ensayo de letalidad sobre *A. salina* es utilizado como ensayo preliminar y es complementado con un ensayo más específico sobre embriones de erizo de mar. Los extractos acuosos de todas las cepas de cianobacterias mostraron una potente toxicidad sobre *A. salina*, los resultados sugieren que las cianobacterias de agua salada son productoras de compuestos bioactivos con efectos tóxicos. (Lopes *et al*, 2010)

En un estudio realizado en el 2010 se analizaron ocho cepas de cianobacterias, los extractos en diclorometano, metanol y agua se probaron sobre *A. salina*; las cepas fueron tóxicas sobre artemia siendo los extractos acuosos mas tóxicos que los extractos orgánicos. La gran mortalidad de artemia indica que otras toxinas desconocidas están involucradas. (Bárbara Frazão *et al*, 2010)

#### 4.4 Citotoxicidad

Shokrzadeh *et al*, 2010, realizaron un estudio para evaluar la citotoxicidad de extractos hidro-alcohólicos de *Cucurbita pepo* y *Solanum nigrum* en las líneas celulares de cáncer HepG2 y CT26 y según los resultados obtenidos se concluyó que el extracto de *S. nigrum* presentaba una citotoxicidad similar al extracto de *T. baccata* sobre células cancerosas.

Bhagat y Saxena (2010) evaluaron la citotoxicidad *in vitro* de *Cassia occidentalis* sobre líneas celulares de cáncer humano y su actividad antibacterial, ellos observaron que el extracto acuoso de *C. occidentalis* tenía mayor potencial que los extractos hidro-alcohólicos y alcohólicos sobre las líneas de cáncer humano HCT-15, SW-620, PC-3, MCF-7, SiHa y OVCAR-5 y concluyeron que esta planta puede ser investigada para el descubrimiento de nuevas moléculas de drogas.

George *et al* (2010) realizaron un trabajo sobre la evaluación de extractos de plantas medicinales de Bangladeshi en células de cáncer pancreático y obtuvieron que los extractos crudos de *Petunia punctata*, *Alternanthera sessilis*, y *Amoora chittagonga* mostraron citotoxicidad en tres líneas de celulares cancerígenas.

José Luis y Pablo (2009) evaluaron la citotoxicidad de 19 extractos vegetales sobre las líneas tumorales: HT29 (colon), A549 (pulmón) y MDA-MB-231 (seno), utilizaron el ensayo con MTT y observaron que los extractos de nueve de las especies

evaluadas causan una reducción en el crecimiento del 30% en cuando menos una línea celular.

Uddin *et al* (2009) investigaron la citotoxicidad de 16 extractos de plantas medicinales de Bangladesh utilizando el ensayo del MTT, los extractos metanólicos y acuosos presentaron actividad citotóxica sobre fibroblastos sanos de ratón (NIH3T3) y tres líneas de cáncer humano (gástrico: AGS; colon: HT-29 y seno: MDA-MB-4356S).

## **4.5 Familia Boraginaceae**

### **4.5.1 Generalidades**

Las plantas de la familia Borragináceas están ausentes en las zonas septentrionales frías de la tierra y poco frecuentes en los trópicos, las Borragináceas son especialmente abundantes en la región mediterránea. Son plantas herbáceas, generalmente erizadas de pelos ásperos, las que son comunes en nuestra region: pulmonarias, consueidas, nomeolvides, viboreras, orcanetas, licopsis, cinoglosos, heliotropos, etc. Algunas son ornamentales, como numerosos cultivares de heliotropo del Perú (*Heliotropium arborescens*), con flores de delicado perfume, o varias especies y variedades de Myosotis (*M. alpestris* F.W. Schmidt, *M. scorpioides* L., etc.), de Mertensia, o también buglosa o lengua de buey de Siberia (*Brunnera macrophylla*).



Algunas plantas de la familia Boraginaceae han sido utilizadas en medicina tradicional para tratar padecimientos como asma, conjuntivitis, erupciones cutáneas, fiebres, heridas, resfriados, sarampión, úlceras (Chung, 2005; Al-Awadi, 2001; Okusa, 2007; Passos, 2007; Chen, 2002).

#### **4.5.2 Compuestos químicos encontrados con actividad biológica:**

Esta familia comprende alrededor de 130 géneros y 2600 especies distribuidas en zonas tropicales. Los compuestos que frecuentemente se reportan son: terpenos, alcaloides pirrolizados, flavonoides y naftaquinonas. (da Silva *et al*, 2009; Craig D *et al*, 1986; Ragaa *et al*, 1986)

En la familia Boraginaceae la alcanina, una naftoquinona, ha sido encontrada en 150 especies. También se han encontrado alcaloides pirrolizados en 8 géneros. (Domínguez X. A., 1973; Brigham *et al*, 1999)

Omar *et al* en 1983 estudiaron la composición química y la toxicidad de *Trichodesma africanum* L, debido a que esta planta crece en las zonas en donde el ganado pasta en el Medio Este, África y Asia y se habían reportado varios casos de intoxicación con ella. En medicina tradicional esta planta es utilizada en infusión para purgar; ellos encontraron que existía una notable toxicidad en ratas y ratones al ser inyectados, produciendo contracción muscular y una reducción en la presión sanguínea causada por la toxina.

Shigeo Tanaka *et al*, (1986) estudiaron dos plantas de la familia Boraginaceae las cuales son utilizadas tradicionalmente para tratar quemaduras, inflamaciones, heridas y úlceras, se evaluaron los enantiómeros shilconin y alquinin para ver si existía diferencia en cuanto a sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas y observaron que no existía diferencia significativa entre ellos.

El género *Echium* miembro de la familia Boraginaceae es rico en alcaloides pirrolizados, esta clase de alcaloides son muy importantes no solo por su actividad hepatotóxica, mutagénica y carcinogénica, sino también por sus propiedades antimicóticas, antitumorales y carcinogénicas (El-Shazly *et al*, 1996).

Pamplona Roger, 2000, propusieron el uso médico de *Borago officinalis* L., ya que la planta contiene abundantes sales minerales, especialmente nitrato potásico, así como cálcicas y silícicas, contiene también mucílagos y flavonoides, sus usos más comunes en medicina tradicional es: sudorífica, diurética, emoliente y antiinflamatoria; además el aceite de sus semillas presenta propiedades como hipolipidemiante y regulador hormonal. En este mismo trabajo también se menciona el uso de *Heliotropium indicum* L. como loción contra el prurito de la piel, especialmente en caso de sarna.

El género *Heliotropium* de la familia Boraginaceae, es una conocida fuente de alcaloides pirrolizados, flavonoides y derivados aromáticos geranil, este género está comprendido por aproximadamente 250 especies distribuidas en ambos hemisferios. (Villaruel *et al*, 2001)

Se han realizado estudios sobre los efectos del fruto de *Cordia myxa* sobre colitis inducida en ratas, los resultados mostraron que el tratamiento con el fruto revertía el cólon inflamado, sugiriendo que los efectos antiinflamatorios pueden ser atribuidos a su propiedad antioxidante y a la restauración de elementos traza en el cólon inflamado. (Al-Awadi *et al*, 2001)

En una análisis de HPLC se encontró que el extracto crudo de *B. officinalis* contiene varios compuestos atrapantes de radicales y se sugiere que estos compuestos poseen una gran habilidad para eliminar los radicales, el compuesto antioxidante mayoritario en este extracto fue el ácido rosmarínico. (Bandoniene y Murkovic, 2002)

Petersen y Simmonds, 2003 realizaron un estudio con ácido rosmarínico que es comúnmente encontrado en especies de la familia Boraginaceae; el ácido rosmarínico tiene una gran cantidad de actividades biológicas interesantes como antiviral, bactericida, antiinflamatorio y antioxidante, en este estudio se propuso la producción biotecnológica de dicho compuesto.

Gupta, 2003, en un estudio realizado en Panamá se reportó el uso de *Turnefortia*, género de la familia Boraginaceae, en el tratamiento de infecciones e identificaron compuestos fenólicos y quinonas.

Se han realizado investigaciones en *Lithospermi radix* sobre su actividad inmunoestimulante, esta planta es utilizada en medicina tradicional para tratar el shock séptico, eczema y quemaduras. (Chung *et al*, 2005)

Se ha reportado el uso en medicina tradicional de *Heliotropium indicum* en Sibia región sur de Mali, donde se utilizaba para controlar el vómito, amenorrea, infecciones oculares y alta presión sanguínea; y en Senegal es utilizado el polvo de las hojas para controlar dermatitis y eccema supurativo e impétigo en niños. Esta misma planta se utiliza en Tamil Nadu, región de la India como una pasta hecha a partir de toda planta y se aplica tópicamente para tratar heridas y afecciones de la piel. (Togola A et al, 2005; Muthu C et al, 2006)

Cheryl en 2006 realizó un estudio sobre las etnomedicinas utilizadas en Trinidad y Tobago para tratar desórdenes urinarios y diabetes mellitus, entre las plantas utilizadas se encuentra *Tournefortia hirsutissima*, planta de la familia Boraginacea reportando que es segura, pero necesita una evaluación más formal.

Passos *et al* en 2007 estudiaron las propiedades antiinflamatoria y antialérgicas del aceite esencial y los compuestos activos de *Cordia verbenacea* concluyendo que el aceite o sus constituyentes podrían representar una nueva opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Estudios sobre *Tournefortia hartwegiana* mostraron que la planta tiene propiedades antidiabéticas sobre ratas; los estudios sobre el modo de acción del extracto sugieren que el extracto metanólico ejerce actividad antidiabética suprimiendo la absorción de carbohidratos por el intestino. (Ortiz-Andrade *et al*, 2007)

Se estudiaron las actividades antiinflamatoria *in vivo* y antioxidante *in vitro* de plantas de la dieta Mediterránea y observaron que todos los extractos mostraron un efecto antiinflamatorio a una dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  reduciendo el edema de un 21 a 27%, todos los extractos mostraron actividad de captura de radical y/o antioxidante; entre las plantas estudiadas se encuentra *Borago officinalis* el cual contiene la mayor cantidad de esteroides (Conforti *et al*, 2007)

Se evaluó la eficacia de los extractos acuosos de *Echium amoenum* en el tratamiento de desordenes obsesivo-compulsivo y se observó que los extractos mostraron una superioridad significativa sobre el placebo en reducir los síntomas obsesivo y compulsivo así como la ansiedad; no se observó diferencia significativa entre los dos grupos en términos de efectos adversos, estos resultados sugieren que el extracto tiene algunos efectos anti obsesivo-compulsivo. (Sayyah *et al*, 2009)

Se estudió el efecto del ácido rosmarínico de *Argusia argentea* en la inhibición de la hemorragia inducida por el veneno de serpiente, basado en el uso tradicional de algunas boragináceas y se observó que el extracto metanólico inhibe significativamente la hemorragia producida por el veneno crudo de *Trimeresurus flavoviridis*. (Aung *et al*, 2010)

Se realizó la determinación del contenido fenólico y el potencial antioxidante de extractos crudos y el aislamiento de compuestos de hojas de *Cordia multispicata* y *Turnefortia bicolor* y los resultados sugieren que *T. bicolor* es una fuente rica en

compuestos fenólicos y podría ser una nueva fuente de antioxidantes naturales o nutraceuticos con aplicaciones potenciales. (Correia Da Silva *et al*, 2010)

Se identificaron plantas latino Americanas con actividad antiparasitaria sobre malaria, la enfermedad del Chagas y leishmaniasis y se encontró que el extracto etanólico de las ramas de *Bourreria huanita* planta de la familia boraginaceae presentan una IC<sub>50</sub> de 6µg/ml. (Calderón *et al*, 2010)

#### **4.5.3 Descripción Botánica de la Familia Boraginaceae**

Esta familia comprende hierbas comúnmente pilosas, a veces arbustos y enredaderas, raramente son arboles. Hojas alternas, simples; inflorescencias a menudo en cimas o racimos escopioides; flores perfectas, por lo general actinomorfas, sépalos 5, persistentes, pétalos 5 unidos; estambres 5 insertos sobre el tubo o garganta corolina, ovario supero, bicarpelar, los carpelos acentuadamente lobulados, óvulos 1 en cada lóculo, ascendentes u horizontales; fruto generalmente de 4 aquenios (nuececillas), a veces drupa o baya. Es una familia de 100 géneros y alrededor de 2000 especies de distribución tropical, así como de regiones templadas y mediterráneas. (Cano, 1994; Alanis *et al*, 1996; Bruneton, 2000)

## 4.6 Plantas estudiadas:

### 4.6.1 *Cordia morelosana* L

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobiota

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Boraginaceae

Genero: *Cordia*

Especie: *morelosana*

Nombre común: Anacahuite, Palo prieto (Figura 1)



Figura 1. *Cordia morelosana*

Árbol de 2 a 4 m de altura, y corteza negra. Las hojas son alargadas, ásperas en el anverso. Las flores son blancas y el conjunto de flores remata en otra singular flor. Origen desconocido. Habita en clima cálido desde los 550 hasta los 1000msnm. Asociada a bosque tropical caducifolio y bosque espinoso. (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007; Argueta, 1994)

#### 4.6.2 *Borago officinalis* L

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobiota

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Boraginaceae

Genero: *Borago*

Especie: *officinalis*

Nombre común: Borraja (Figura 2)



Figura 2. *Borago officinalis*

Hierba anual de unos 30 a 50 cm de altura, cubierta de numerosos pelos blanquecinos, las hojas son ovaladas, grandes, basales y de borde dentado. Las flores son azul violáceo, numerosas y están agrupadas en racimos terminales. El fruto es drupáceo. (Vit, 2002; Herber, 2007)



### 4.6.3 *Heliotropium amplexicaule* Vahl

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobiota

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Boraginaceae

Genero: *Heliotropium*

Especie: *amplexicaule*

Nombre común: Heliotropo azul, Heliotropo suave, Borraja de campo (Figura 3)



Figura 3. *Heliotropium amplexicaule*

Perenne. Tallos decumbentes, ramificados. Hojas hispídas, alternas, lanceolado-elípticas, con borde ligeramente sinuoso, casi sésiles. Inflorescencias cimosas uníparas, escorpioides. Flores liláceas; cáliz con 5 sépalos iguales, vellosos y apenas soldados en la base; limbo de la corola con lóbulos muy obtusos, apenas notables, tubo corolino algo infundibuliforme, vellosos externa e internamente; estambres 5, anteras sésiles, lineares no apiculadas; gineceo con estigma cónico. Fruto formado por clusas biseminadas, rugosas. (Monti *et al*, 2003; Dellow, 2008)

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

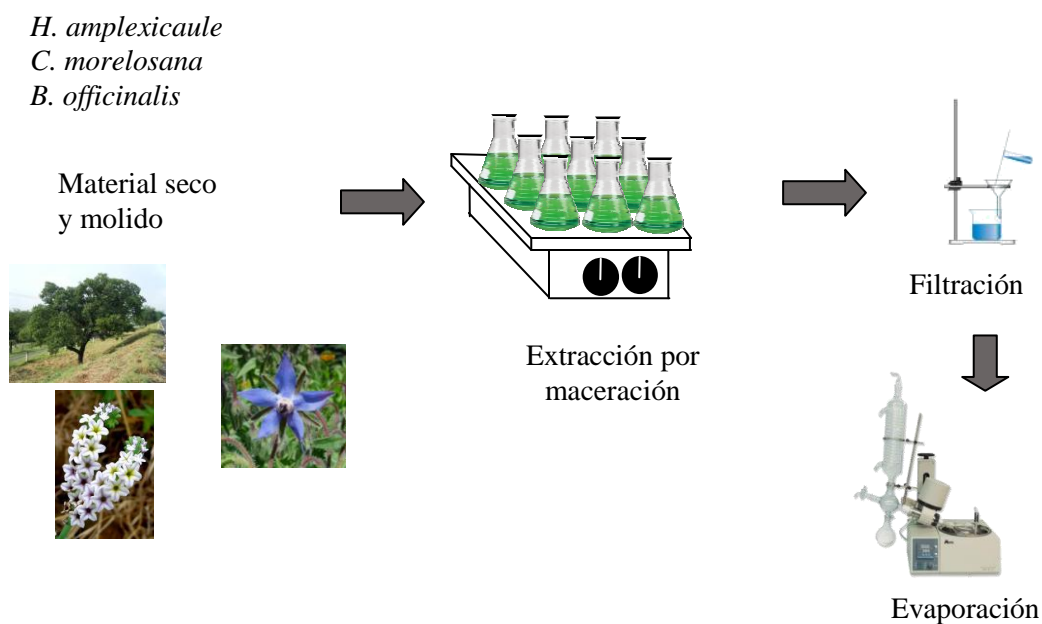
### 5.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio.

Se colectaron las plantas *H. amplexicaule* (Monterrey, N.L.), *C. morelosana* (Morelia, Mich.) y *B. officinalis* (Saltillo, Coah.), después de la colecta, se procedió a secarlas en una prensa botánica para su identificación y clasificación taxonómica en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, obteniéndose su número de herbario.

### 5.2 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas.

Esta se llevó a cabo una vez que el material vegetal se secó. Se separaron las diferentes partes de la planta seca y se trituraron por separado en un molino manual (marca Victoria), posteriormente se tomaron 30 g de cada una y se depositaron en sus respectivos matraces Erlenmeyer de 500 ml donde se les adicionó el volumen de 150 ml del solvente y se sellaron herméticamente para evitar la evaporación del mismo durante el proceso. Los principios activos del material seco y molido se obtuvieron mediante la extracción con solventes de diferente polaridad; el material seco se desengrasó con hexano y cloroformo y finalmente se realizó la extracción con metanol (CTR Scientific) durante 7d con agitación constante con cada uno de los solventes. Los extractos

metanólicos obtenidos se evaporaron hasta sequedad con presión reducida en un rotavapor (Yamato modelo RE200), Figura 4. Estos fueron conservados en frascos oscuros en refrigeración a 4°C hasta su uso.



**Figura 4.** Diagrama de la obtención de los extractos.

### 5.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

**Tabla I**

Microorganismos utilizados

Microorganismos		
Bacterias		
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogene</i>
Hongos		
<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>T. Mentagrophytes</i>
<i>T tonsurans</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>M audouinii</i>
<i>M cookie</i>	<i>M gypseum</i>	

Con los extractos obtenidos se evaluó la actividad biológica sobre los microorganismos mencionados en la Tabla I. El método empleado para el ensayo microbiológico fue el de difusión en placa con discos de papel filtro (Koneman *et al*, 1989). Para evaluar la actividad los extractos secos se prepararon a una concentración de 40 mg/ml en metanol y se esterilizaron por filtración con membranas de 0.25  $\mu\text{m}$ . (Koneman *et al*, 1989)

### **5.3.1 Activación de las bacterias.**

Se utilizó medio líquido C. Rivas (Patente IMPI MX/10892) 8.5 g en 100 ml de agua destilada, ajustado a pH 7.0.

Para la preparación del medio se utilizaron tubos de ensaye 18 x 150 mm con 5 ml de medio a cada uno, se esterilizaron a 15 Lb /10 min, se inocularon con las diferentes cepas en estudio con una asada a cada tubo previamente identificado, posteriormente se incubaron de 12-18 h a 37°C.

### **5.3.2 Cultivo de las bacterias.**

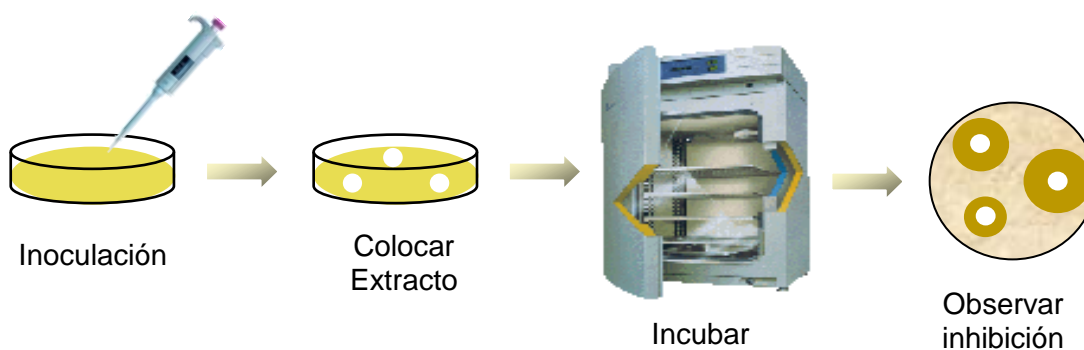
Se utilizó el medio sólido C. Rivas; 8.5g de medio en 100 ml de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas Petri en porciones de 20 ml, que se utilizaron en las pruebas de inhibición "in vitro".

### **5.3.3 Activación de los hongos.**

Los hongos se activaron en medio C. Rivas (Saboroud modificado) 6.5 g por 100 ml; con un periodo de incubación de 7 -15 d a 28-30 °C.

### 5.3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.

El método de difusión en placa se realizó colocando 10  $\mu$ l de cada uno de los extractos obtenidos (40 mg/ml) sobre discos de papel filtro Whatman No. 1 en una placa con medio sólido C. Rivas, previamente inoculada con 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC (tubo uno de la escala de Mc Farland) o una asada con las diferentes cepas de hongos; se depositó también en un disco 10  $\mu$ l del solvente utilizado para disolver el extracto como control negativo y 10  $\mu$ l de un antibiótico o antifúngico como control positivo. Se incubó a 37°C por 24h para las bacterias y de 7-15 d para los hongos; después de este período se midieron los halos de inhibición en mm para cada prueba. (Figura 5)



**Figura 5.** Ensayo para la determinación de la actividad antimicrobiana.

#### **5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que muestren actividad biológica relevante.**

En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100 µl de medio líquido C. Rivas y se añadieron 100 µl de cada una de los extractos partiendo de la concentración inicial de 1600 µg/ml y se realizaron microdiluciones seriadas. Una vez efectuadas estas, se adicionaron 100 µl de la suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC (tubo uno de la escala de Mc Farland). Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37 °C, y se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada una de las fracciones aplicando 40 µl de una solución de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetranolium bromuro (MTT) a una concentración de 2.5 mg/ml a cada pozo e incubando por 4 h a 37 °C, posteriormente se observó la viabilidad microbiana de color púrpura de las diluciones probadas.

#### **5.5 Identificación de las fracciones con actividad antibacteriana y antifúngica relevante mediante la técnica de bioautografía.**

##### **5.5.1 Cromatografía en capa delgada de los extractos con concentración mínima inhibitoria relevante para separación de sus fracciones.**

Las placas cromatográficas se prepararon utilizando 10 g de sílica gel 7G en 40 ml agua destilada, ésta mezcla se colocó sobre placas de vidrio de 7.5 x 2.5 cm, después se secó por un periodo de una hora en la estufa de secado a 110 °C. Una vez preparadas

las placas cromatográficas se realizó la cromatografía utilizando un tubo capilar para aplicar la muestra, la placa fue introducida en una cámara de vidrio de boca ancha con la fase móvil. El Rf se calculó midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluente.

### **5.5.2 Identificación de las fracciones activas.**

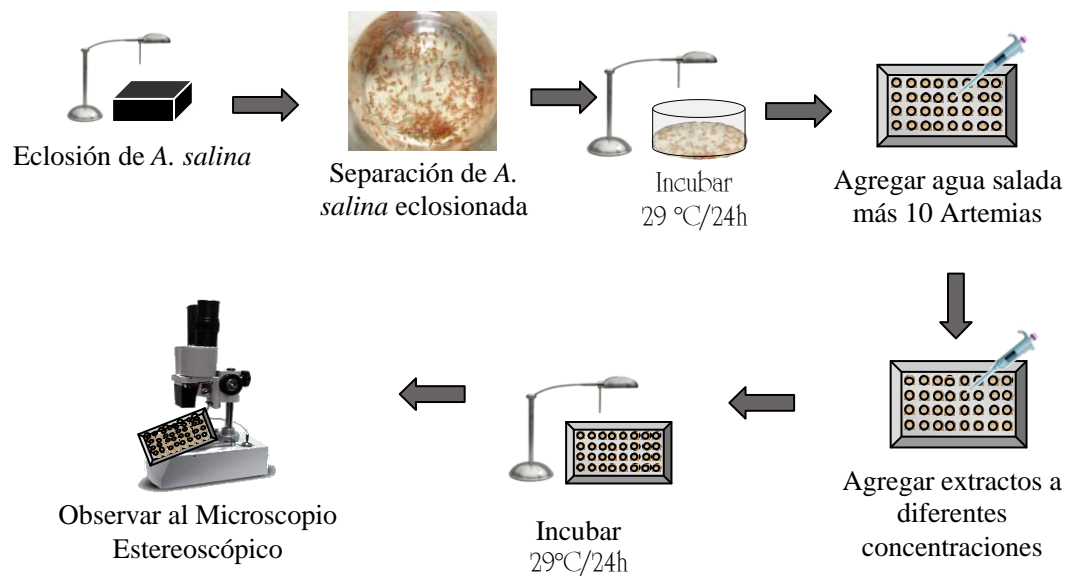
Se utilizó la técnica de Hamburger modificada por Verástegui en 1998; se seleccionaron las cromatoplasmas en las cuales las fracciones mostraron una mayor separación. En una caja Petri se expuso el cromatograma con luz ultravioleta por una hora para esterilizar y sobre él se colocó una tira de medio sólido C. Rivas de 1x 6cm x 0.3 mm de espesor. Posteriormente se añadió sobre la tira de agar 150 µl de la dilución  $1 \times 10^6$  UFC. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de una caja Petri un algodón con agua destilada estéril. Se utilizó como control de crecimiento un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero separado del cromatograma. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 – 48 h. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente. (Verastegui *et al*, 1998)



## **5.6 Evaluación de la toxicidad de los extractos mediante el Ensayo de Letalidad sobre *Artemia salina*.**

Los huevecillos de *A. salina* fueron mantenidos en refrigeración antes de su uso. Para su eclosión se realizó en un dispositivo de vidrio de 25 x 15 cm con tapa y dividido en dos secciones por la mitad, con una sección oscura, se colocaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en 300 ml de agua de mar simulada (40 g de sal de mar aforando a 1 l de agua destilada (Instant Ocean) con aireación continua (bomba de acuario ELITE 799 ) y con luz blanca irradiada de una lámpara de 11W a 20 cm del eclosionador, finalmente se cerró con la tapa y se incubaron por 48 h. Una vez eclosionados, a las 24 h los nauplios fueron pasados a otro recipiente con la ayuda de una micropipeta y se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 h más. A una microplaca de 96 pozos se agregó un volumen de 100 µl de la suspensión de nauplios a cada pozo (aprox. 10 nauplios) y se les adicionaron 100 µl de las diluciones de los extractos obtenidos, se partió de una concentración de 1 000 µg/ml. Como control positivo de toxicidad se utilizó una solución de 400 ppm de dicromato de potasio y agua de mar como control negativo. A las 24 h de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Lieder MC-720X), se realizó el conteo de nauplios vivos en las diferentes dosis que se evaluaron. La concentración de las muestras que produce la muerte del 50% de los nauplios se toma como la  $DL_{50}$  (Figura 6). Mediante el análisis Probit se determinó la  $DL_{50}$  de los extractos probados. (Mc Laughlin, 1991)

El criterio de toxicidad fue el siguiente (Déciga-Campos *et al.*, 2007): Valores de  $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$  (no tóxico),  $\geq 500 \leq 1000 \mu\text{g/ml}$  (toxicidad débil) y  $< 500 \mu\text{g/ml}$  (tóxico).



**Figura 6.** Ensayo de letalidad de los extractos sobre *A. salina*.

## 5.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ ) sobre *E. histolytica* HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas *in vitro*.

### 5.7.1 Cinética de Crecimiento

Se utilizó medio PT modificado, adicionado con 10 % de suero de ternera y 1 % de antibiótico (P/E)

Para la cinética de crecimiento la cepa de *E. histolytica* HM1-IMSS crecida en medio PT se inoculó a  $1 \times 10^4$  cel/ml en tubos de vidrio con tapón de rosca de 16x125

mm con 5.55 ml de medio PT adicionado. Se incubó a 37 °C y cada 24 h se contó el número de células durante nueve días. Para realizar el conteo los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/ml empleando una cámara de Neubauer.

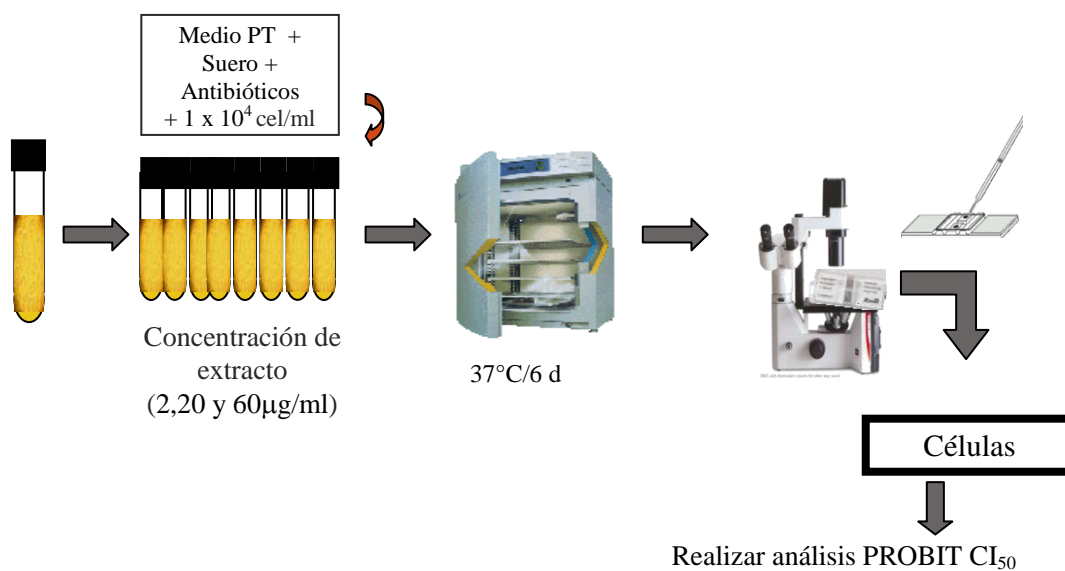
Los bioensayos se realizaron en la fase logarítmica del crecimiento de las células, la *E. histolytica* HM1-IMSS fue propagada en cultivo axénico a 37 °C en medio PT modificado suplementado con el 10 % de suero de ternera y 1 % de antibiótico (P/E).

### **5.7.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>)**

Se utilizó *E. histolytica* HM1-IMSS. Se realizaron resiembras sucesivas de  $1 \times 10^4$  cel/ml el medio PT modificado en tubos con tapón de rosca de 16x125 mm, se adicionó 1 % antibiótico (P/E) y 10 % de suero de ternera, posteriormente se incubó a 37 °C por 96 h. Los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/ml empleando una cámara de Neubauer.

De las amibas suspendidas en medio PT modificado incubadas por 96 h a 37°C se tomaron  $1 \times 10^4$  cel/ml y se transfirieron en tubos con 5 ml de medio PT modificado, se probaron cinco concentraciones de los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* (2, 20, 60, 100 y 200 µg/ml) por triplicado en tres ensayos

independientes y se incubaron por 96 h a 37 °C. A las 96 h los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/ml empleando una cámara de Neubauer. Se hizo el análisis Probit para determinar la  $IC_{50}$  de los extractos probados (Figura 7).



**Figura 7.** Determinación de la Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ ) de los extractos sobre *E. histolytica*.

## **5.8 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular normal Vero mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>).**

### **5.8.1 Cultivo Celular**

La línea celular normal de riñón de mono verde africano Vero fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio M199 (Gibco/BRL) adicionado con 4 % de suero fetal bovino (FBS, Gibco/BRL) y solución de antibióticos (penicilina 100,000 U/l y estreptomycin 1 mg/l). Las líneas celulares fueron cultivadas en botellas de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda.

### **5.8.2 Cinética de Crecimiento de la línea celular Vero**

La cinética se realizó durante 6 d colocando una concentración inicial 2,000 células/ml con el medio M199. A partir del cultivo confluyente de células Vero, se retiró el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS), se despegaron las células con tripsina al 0.25 % (Trypsin X-100, Cellgro Mediatech Inc, Herdon VA) y se colocaron en un tubo cónico de 15 ml, se centrifugo a 1000 rpm/10 min, el sedimento celular se re-suspendió en 2 ml de medio; se contó el número de células y se preparó una suspensión de 2,000 cel/ml las cuales fueron colocadas en cajas Petri (Corning, New Jersey, USA) se incubaron las cajas Petri a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Se realizaron 3 ensayos independientes con 2 repeticiones cada uno, cada 24 h durante 6 d, se despegaron las células con tripsina a dos cajas Petri y se contó el número de células, utilizando un hemocitómetro. Se obtuvo su Tiempo de generación

(G) que es el tiempo requerido para que una célula se divida o una población se duplique y fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo de generación (G)} = \frac{t}{3.3 \log Nb/Na}$$

Donde:

G = Tiempo de generación

t = Tiempo determinado

3.3 = Constante

Nb = Número de células a un tiempo determinado

Na = Número de células iniciales

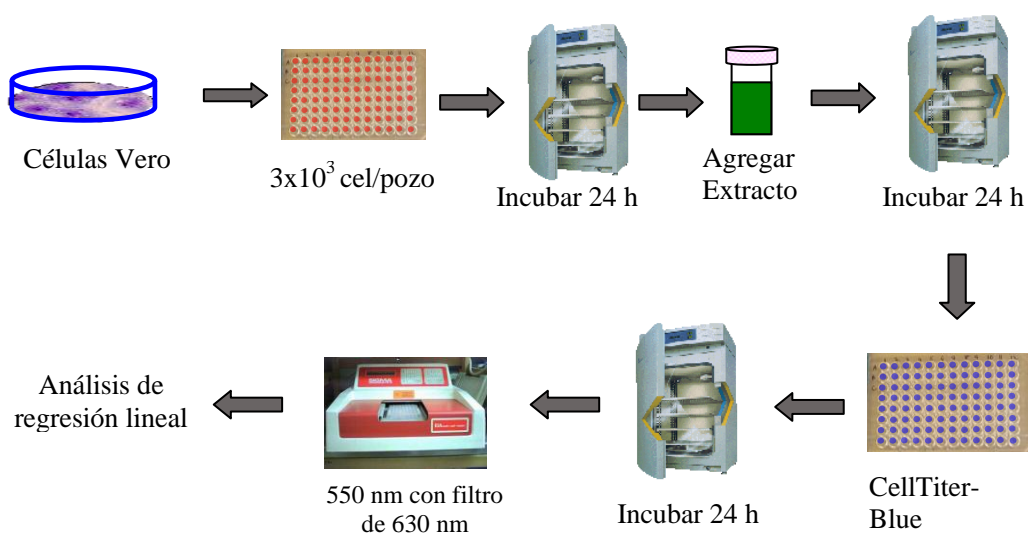
### 5.8.3 Determinación de Citotoxicidad en Cultivo Celular

Se determinó el porcentaje de viabilidad de los extractos en estudio sobre las células Vero mediante el ensayo de CellTiter-Blue.

Se utilizó el medio de cultivo M-199 suplementado con 4 % de suero fetal bovino. Las células utilizadas en el estudio fueron obtenidas a partir de cultivos confluentes de aproximadamente 80-90 %, utilizando tripsina al 0.025 %, su viabilidad (mayor al 98 %) se determinó por el método de exclusión con colorante de azul tripano.

Se colocaron en volúmenes de 100 µl de la suspensión celular ( $3 \times 10^3$  cel/pozo) en microplacas de 96 pozos (Costar Corning Inc), se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h, posteriormente se agregaron 100 µl de medio de cultivo M-199, mas 100 µl de los extractos; estos se diluyeron en buffer de fosfatos salino (PBS) a una

concentración de 3 mg/ml; partiendo de esta solución stock, se prepararon diluciones con medio M199 en concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ , cada uno por triplicado, Posteriormente se eliminaron 50  $\mu\text{L}$  de los pozos control positivo y se sustituyeron por 50  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 al 0.2 % (Merck, Darmstadt Alemania) y en el control negativo 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Fueron incubadas por 24 h más a 37°C en condiciones de 5% de  $\text{CO}_2$  y ambiente húmedo, posteriormente se agregó 10  $\mu\text{l}$  del reactivo CellTiter-Blue® (Promega, Madison WI,USA) a cada uno de los pozos. Se incubaron por 24 h a 37 °C y finalmente fue leída en un lector de microplacas a una longitud de onda de 550 nm con un filtro diferencial de 630 nm (BIO-TEK, USA). El porcentaje de células muertas se determinó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas de controles tratados y no tratados. Se graficaron los valores de concentración de los extractos contra el porcentaje de viabilidad para obtener la  $\text{IC}_{50}$ . Los valores finales representan el promedio de tres experimentos por cuadruplicado cada uno. Los valores de absorbancia tienen una relación lineal con el número de células viables. Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS 17.0 (Figura 8).



**Figura 8.** Ensayo de citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular Vero.

## 5.9 Identificación parcial de los componentes de los extractos

### 5.9.1 Identificación por medio de reacciones químicas.

#### Pruebas para Grupos Funcionales

Para realizar las pruebas se utilizaron soluciones a 50 mg/ml de los extractos disueltos en metanol.

Prueba de Liebermann-Burchard: Prueba utilizada para determinar triterpenos y compuestos esteroidales. Se colocó una gota de la solución del extracto sobre una placa de porcelana de 12 pozos, se evaporó el solvente y posteriormente se agregó una gota de cloroformo y dos gotas del reactivo; posteriormente se observaron cambios de coloración. El reactivo utilizado se preparó utilizando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 ml de anhídrido acético y 1.0 ml de cloroformo.

Prueba de Salkowski: Se utilizó para determinar esteroides y metilesteroides, es similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra en cloroformo se puso en contacto con una gota de ácido sulfúrico, la prueba fue positiva si se desarrollaron colores amarillo o rojo.



Prueba de Shinoda: Se utilizó para la identificación de compuestos de tipo flavonoide; 1.0 mg de la muestra se disolvieron en metanol y unas limaduras de magnesio, se le aplicó calor (60°C) y después unas gotas de HCl por las paredes. Se consideró positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul o violeta.

Prueba de Baljet: Para sesquiterpenlactonas, se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A, un gramo de ácido pícrico en 100 ml de metanol; solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. Para la prueba se colocan 10 mg de compuesto y 3-4 gotas de reactivo, la prueba es positiva si se forma una coloración naranja o rojo obscuro.

Prueba de Dragendorff: Se utiliza la modificación de Munier y Machelobuf para la determinación de alcaloides. Para ello se preparan dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua y Solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 ml de A, 4 ml de B y 100 ml de agua (este reactivo es estable por un año). Se disuelven de 1 – 2 mg de la muestra en etanol y se colocan unas gotas en una placa de porcelana, luego se añaden unas gotas del reactivo, la prueba es positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

Prueba de bromo en tetracloruro de carbono: Para insaturaciones, a 2 mg de la muestra se le agregan una solución de bromo al 2 % en tetracloruro de carbono; la prueba se considera positiva si la coloración de la solución desaparece al principio.

Prueba del permanganato de Potasio: Para dobles enlaces, se preparó una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua, se disuelven 0.2 mg de la muestra en agua, acetona, o metanol, se toma con un capilar y se le agrega la solución de permanganato de potasio. La prueba es positiva si se produce la decoloración del reactivo.

Prueba de 2,4- Dinitrofenilhidracina: Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disuelven 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de metanol caliente. Se agregan 50 mg del compuesto carbonílico y se calentó a baño María por 10 a 15 min; se deja en reposo y se enfrió en baño de hielo, la aparición de un precipitado naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

Prueba de Molisch: Para azúcares. En un tubo de ensaye se coloca la muestra, se añadieron 3 gotas del reactivo de Molisch, y se agitó. Después se inclina el tubo y se deslizan por la pared 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si se forma un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se prepara disolviendo 1 g de  $\alpha$ -naftol en 100 ml de metanol al 95 %.

Prueba de NaOH: Para determinar lactonas. Se disolvieron 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10 %. La presencia de color naranja que desaparece al agregar HCl indica la presencia de un anillo lactónico

Prueba de Börntrager: Para determinar naftaquinonas y antraquinonas. Se hierve por 10 min una pequeña porción de extracto con hidróxido de potasio (KOH 2-5%) para luego enfriarla, se acidula con HCl 1N y se extrae con benceno. La capa se separa y se agita con un poco de la solución de KOH. Si la fase del benceno se decolora y la alcalina se torna roja, esto indicó presencia de quinonas.

Prueba del cloruro férrico  $\text{FeCl}_3$ : Para determinar oxihídridos fenólicos. Se disuelven 1 a 2 mg de extracto muestra en 1 ml de etanol, mas una gota de solución de cloruro férrico en agua al 15 %. Fue positiva para la presencia de oxihídridos fenólicos con la aparición de coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde.

Cumarinas: Se disuelve una porción de extracto muestra (1-2 mg) en solución alcohólica de KOH al 10 %. Una coloración amarilla, que desapareció al acidular con HCL 1N se registra como positiva.

Prueba del bicarbonato de sodio. La sal se prepara al 10% en agua. Se disuelven de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente. Luego se agregan 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto indican la presencia de saponinas.

Prueba del  $H_2SO_4$ . Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en  $H_2SO_4$  y se observa coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído. Se prepara una mezcla de 1 ml. De ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregan de 1-5 mg. de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añaden unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva para compuestos aromáticos. (Harborne J.B., 1998)

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio.

#### 6.1.1 *Cordia morelosana*

Fue colectada e identificada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos con número de identificación 13151-HUMO.

#### 6.1.2 *Borago officinalis*

Fue colectada en Saltillo, Coahuila e identificada en el herbario de Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro con número de identificación 27344.

#### 6.1.3 *Heliotropium amplexicaule*

Fue colectada en Monterrey, Nuevo León e identificada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con número de identificación \_\_\_\_\_. (Figura 9)



**Figura 9.** Colecta de material vegetal.

## 6.2 Obtención de los extractos metanólicos

En la tabla II se muestran los porcentajes de rendimientos de las plantas utilizadas, siendo *B. officinalis* la que presenta el mayor rendimiento con un 15.30% seguido por las hojas de *H. amplexicaule*, el extracto con menor rendimiento fue la corteza de *C. morelosana* con tan solo 0.7%.

**Tabla II**

Rendimiento y parte utilizada de las plantas estudiadas.

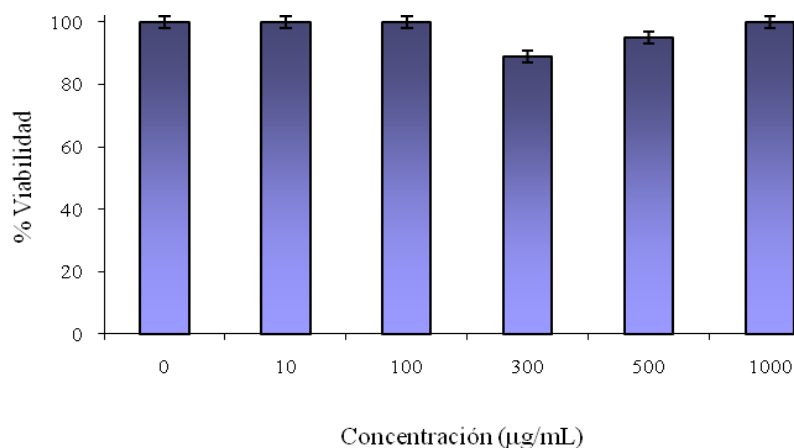
<b>Planta</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Rendimiento %</b>
<i>C. morelosana</i>	Corteza	0.7
<i>B. officinalis</i>	Aérea	15.38
<i>H. amplexicaule</i>	Tallo	3.38
<i>H. amplexicaule</i>	Hojas	7.12
<i>H. amplexicaule</i>	Raíz	3.28
<i>H. amplexicaule</i>	Inflorescencias	5.13

### 6.3 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

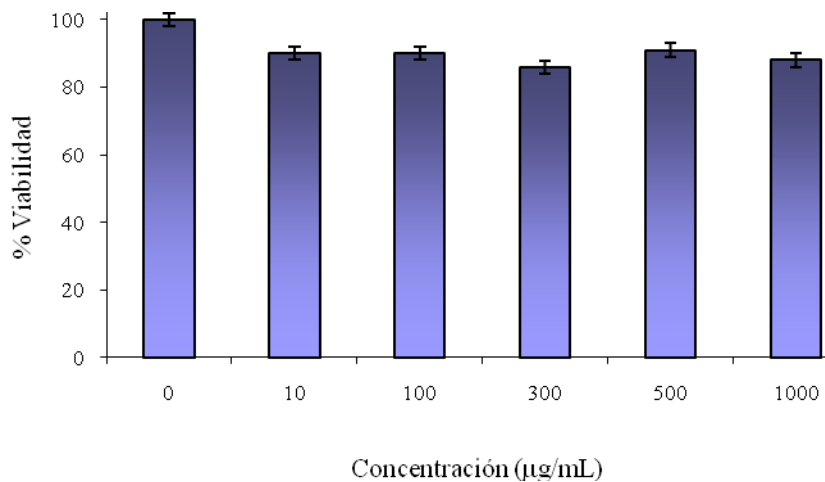
Se realizó un ensayo preliminar de los extractos metanólicos desengradados, referidos en la Tabla II, por el método de difusión en placa, observando que ninguno de los extractos probados presentaron inhibición sobre los microorganismos evaluados mencionados en la Tabla I.

### 6.4 Evaluación de la toxicidad de los extractos mediante el Ensayo de Letalidad sobre *Artemia salina*.

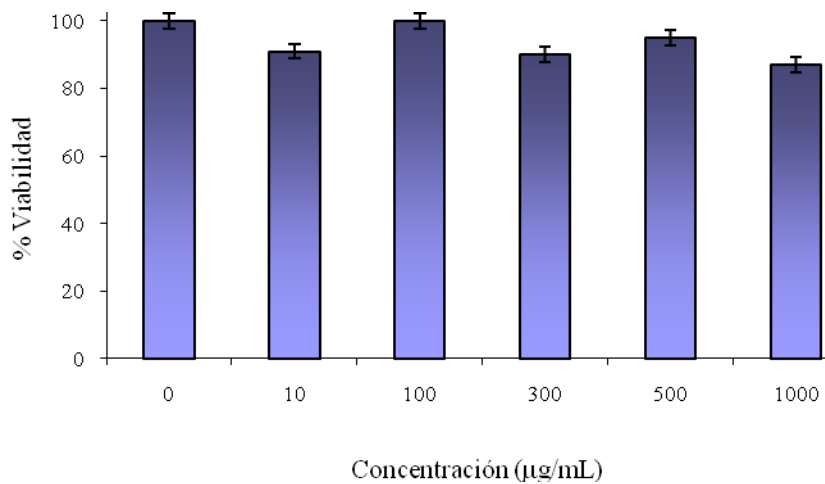
Según los resultados obtenidos y mostrados en las siguientes figuras 10 al 15 los extractos no muestran toxicidad sobre *A. salina* a las diferentes concentraciones probadas.



**Figura 10.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de Hoja de *H. amplexicaule*.

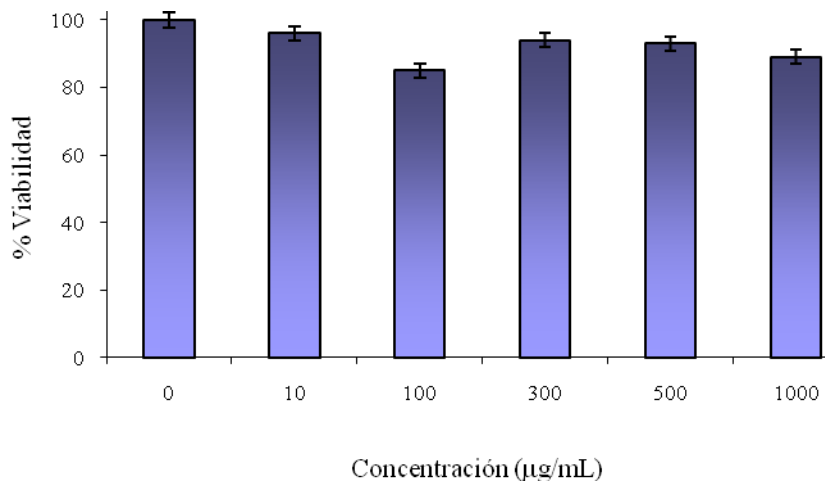


**Figura 11.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de Tallo de *H. amplexicaule*.

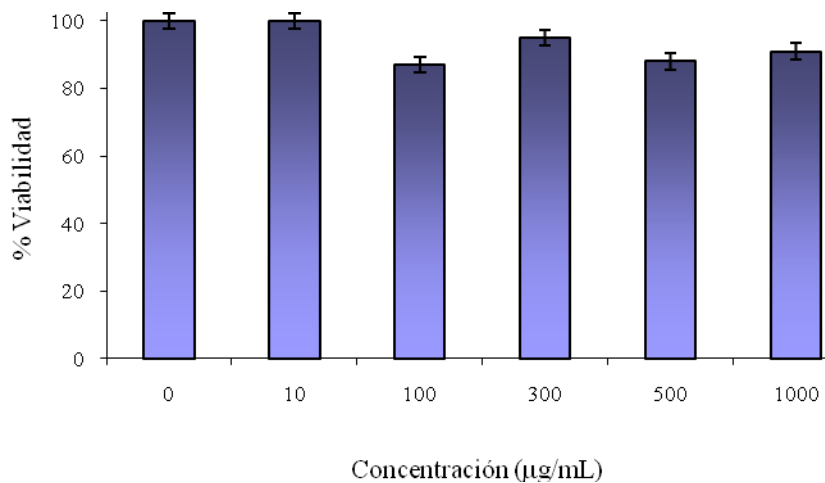


**Figura 12.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de Raíz de *H. amplexicaule*.

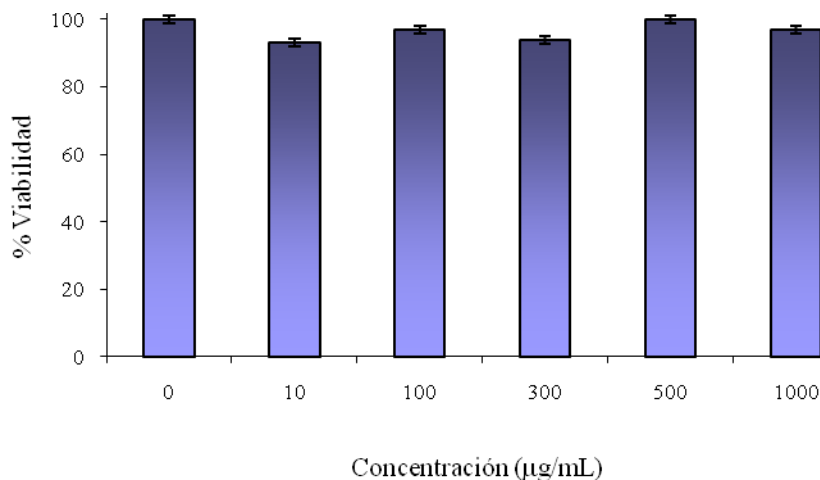




**Figura 13.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de Flor de *H. amplexicaule*.



**Figura 14.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de corteza de *C. morelosana*.

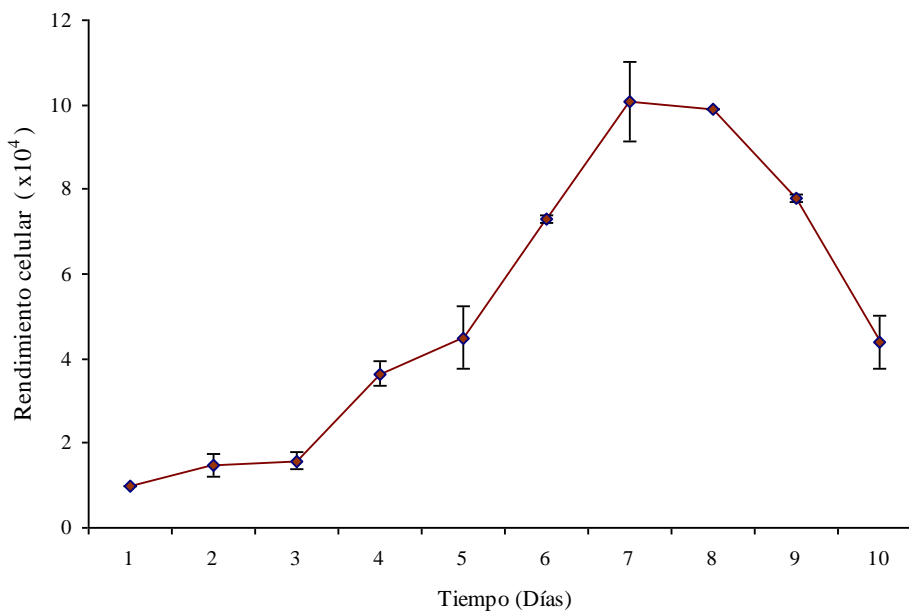


**Figura 15.** Porcentaje de viabilidad sobre *A. salina* del extracto metanólico de la parte aérea de *B. officinalis*.

### 6.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) sobre *E. histolytica* HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas *in vitro*.

#### 6.5.1 Cinética de Crecimiento

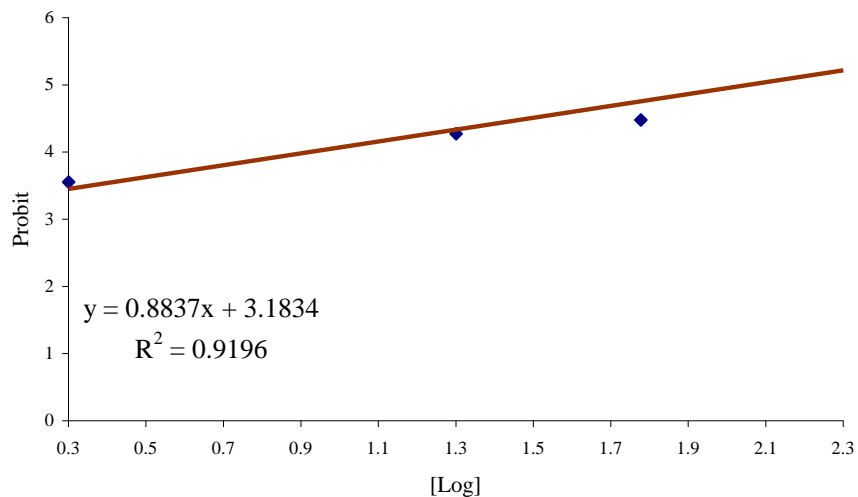
Se realizó la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS para determinar la fase logarítmica, los resultados se muestran en la Figura 16, nos indican en el séptimo día hay mayor número de células por lo tanto es el indicado para realizar el ensayo.



**Figura 16.** Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS propagada en condiciones axénicas *in Vitro*.

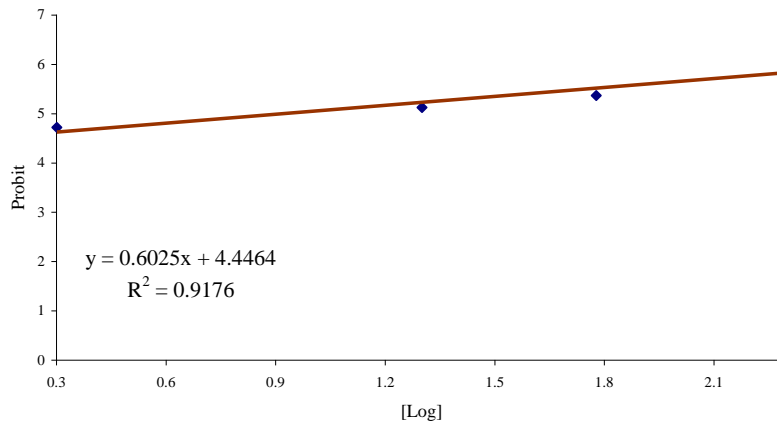
### 6.5.2 Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) de los Extractos

Los resultado arrojados por los ensayos de los extractos metanólicos sobre *E. histolytica* HM1-IMSS (Figuras 17 - 22), se muestra el extracto metanólico de raíz de *H. amplexicaule* presenta el menor valor en la CI<sub>50</sub> a una concentración de 2µg/ml (Figura 19), seguido por el extracto metanólico de *C. morelosana* con una CI<sub>50</sub> de 4µg/ml (Figura 21).



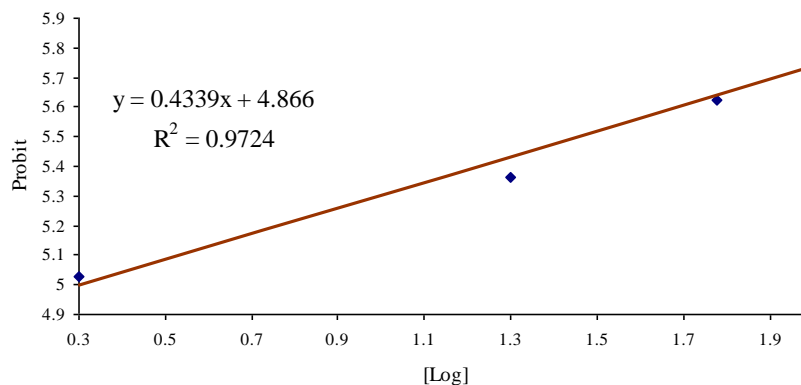
**Figura 17.** Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) del extracto metanólico de Hoja de *H. amplexicaule* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 114  $\mu\text{g/ml}$  del extracto metanólico de Hoja de *H. amplexicaule*.



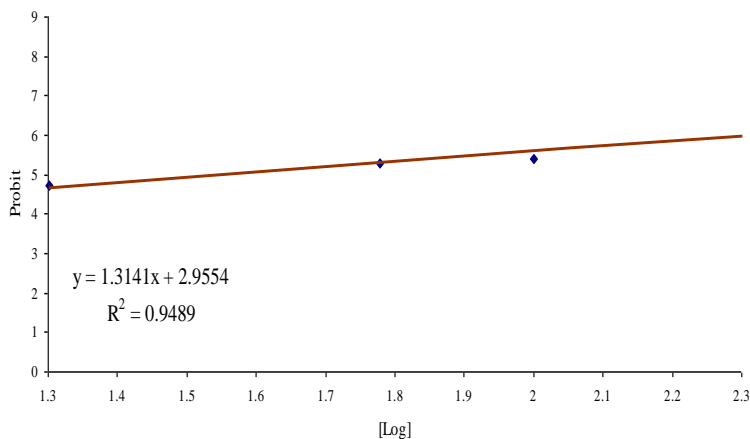
**Figura 18.** Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) del extracto metanólico de Tallo de *H. amplexicaule* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 8 µg/ml del extracto metanólico de tallo de *H. amplexicaule*.



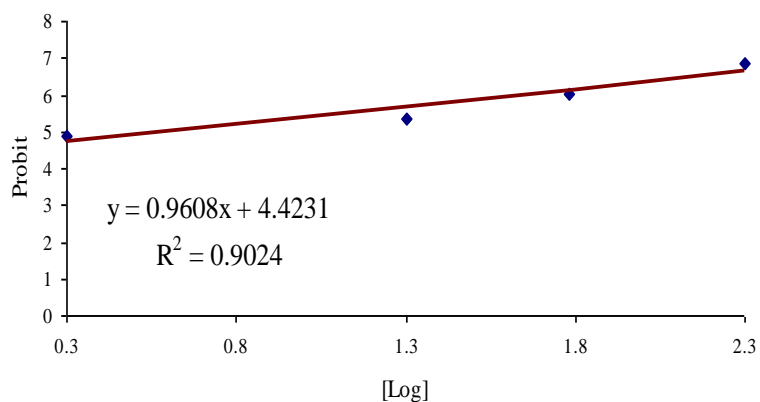
**Figura 19.** Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) del extracto metanólico de Raíz de *H. amplexicaule* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 2 µg/ml del extracto metanólico de raíz de *H. amplexicaule*.



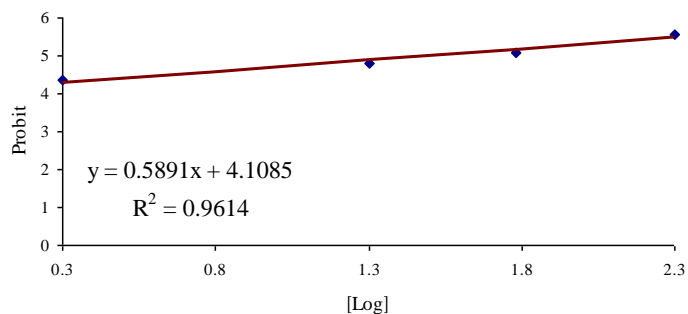
**Figura 20.** Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ ) del extracto metanólico de Flor de *H. amplexicaule* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 36  $\mu\text{g/ml}$  del extracto metanólico de flor de *H. amplexicaule*.



**Figura 21.** Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ ) del extracto metanólico de *C. morelosana* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 4 µg/ml del extracto metanólico de corteza de *Corida morelosana*.



**Figura 22.** Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) del extracto metanólico de corteza de *B. officinalis* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

Para eliminar el 50% de la población de *E. histolytica* HM1-IMSS es necesario emplear una concentración de 32.7 µg/ml del extracto metanólico de corteza de *B. officinalis*.

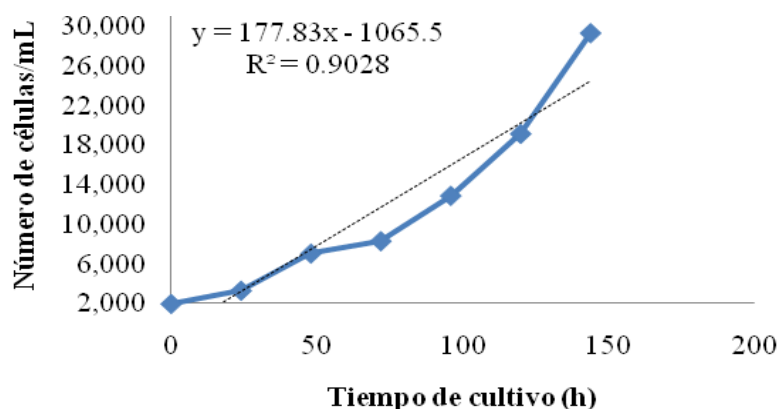
## 6.6 Evaluación de la citotoxicidad en Cultivo Celular

### 6.6.1 Cinética de Crecimiento

Se realizó la cinética de crecimiento de las células normales de mamífero Vero y se obtuvo un tiempo de generación (G) de 37.05 h, los datos se muestran en la Tabla III y en la figura 23.

**Tabla III.** Cinética de crecimiento de las células Vero

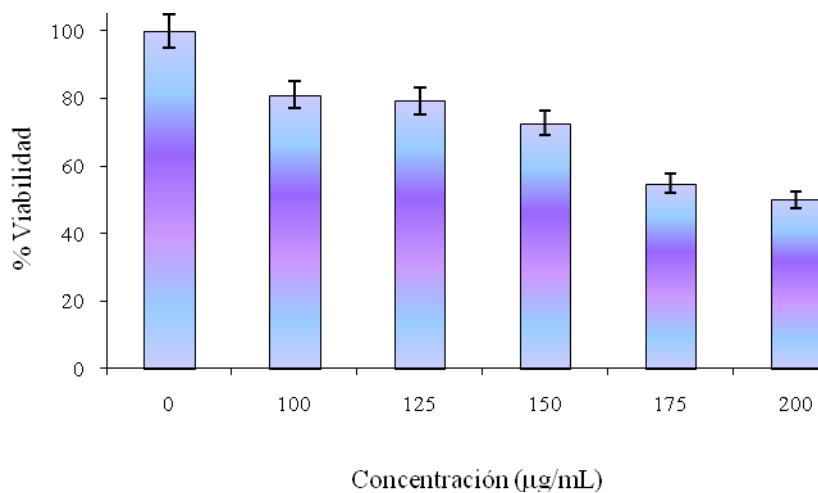
Tiempo de cultivo (h)	Número de Células
0	2,000
24	3,333
48	7,083
72	8,333
96	12,917
120	19,167

**Figura 23.** Cinética de crecimiento de las células Vero.

### 6.6.2 Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) de Extractos

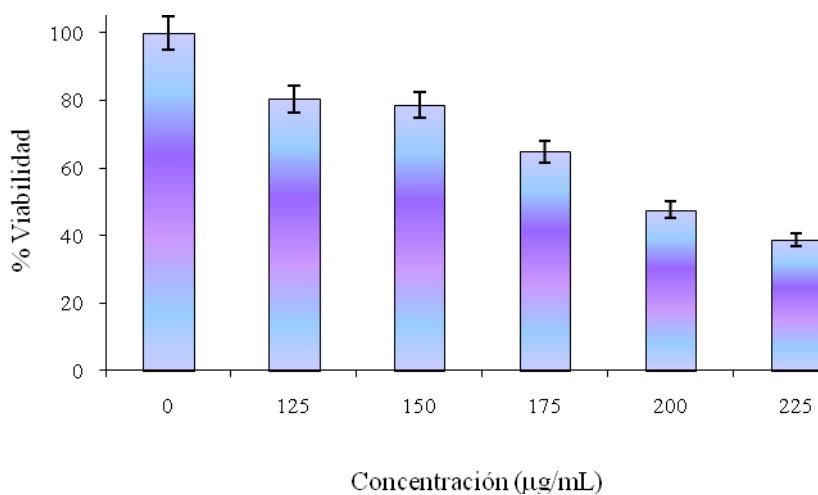
Se realizó el ensayo de citotoxicidad sobre células normales de mamífero (Vero) encontrando que el extracto metanólico que presentó la CI<sub>50</sub> mayor fue el de raíz de *H. amplexicaule* con un valor de 250 µg/ml, y en general todos los extractos presentan una CI<sub>50</sub> mayor a una concentración de 150 µg/ml. (Figuras 24 - 29)





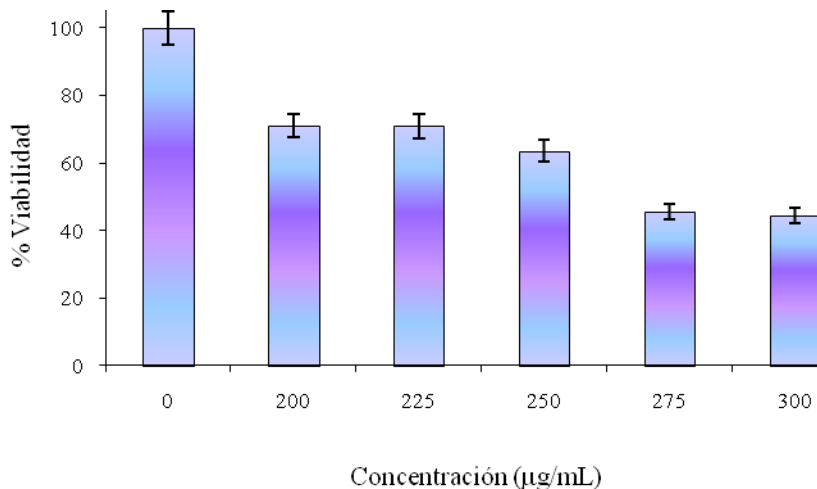
**Figura 24.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de hoja de *H. amplexicaule*.

La  $IC_{50}$  del extracto metanólico de Hoja de *H. amplexicaule* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es superior a una concentración de 175 µg/ml.



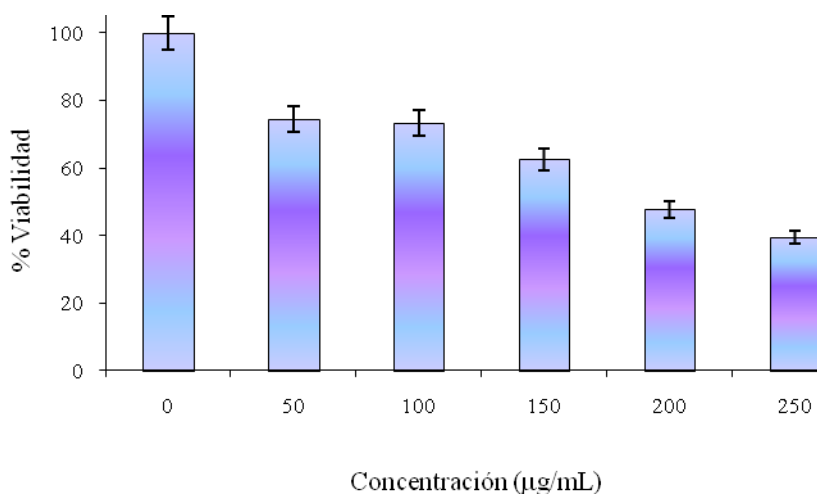
**Figura 25.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de *H. amplexicaule*.

La  $IC_{50}$  del extracto metanólico de Tallo de *H. amplexicaule* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es superior a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ .



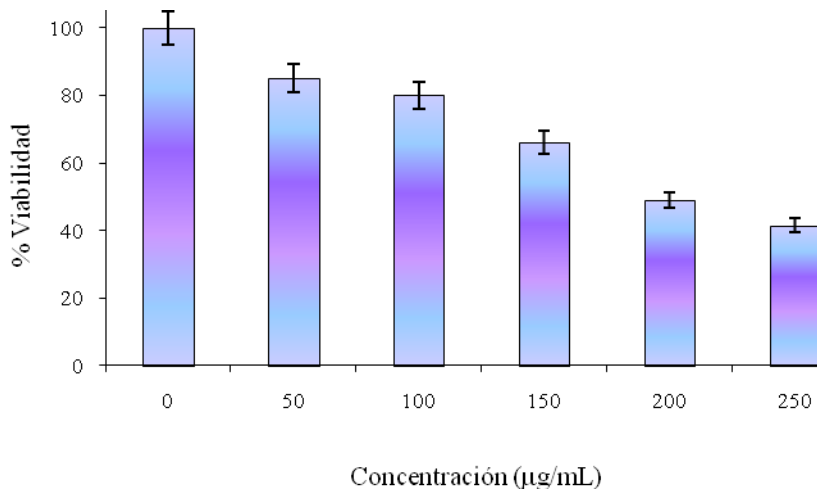
**Figura 26.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de *H. amplexicaule*.

La  $IC_{50}$  del extracto metanólico de Raíz de *H. amplexicaule* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es superior a una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ .



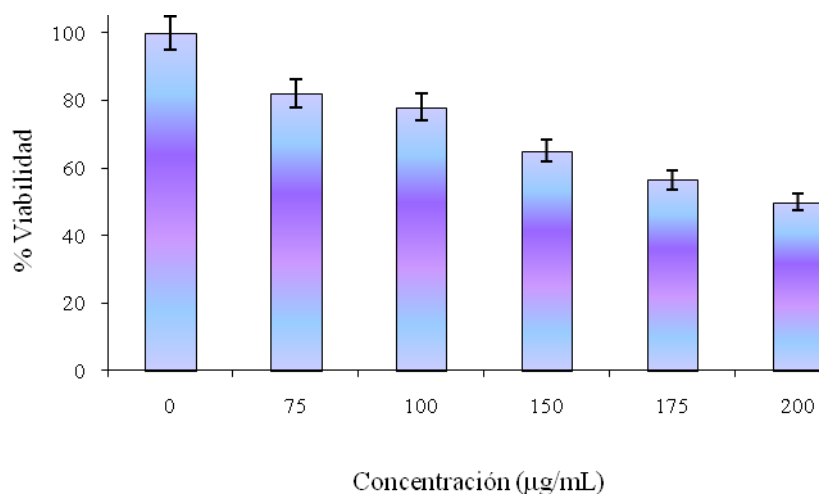
**Figura 27.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de *H. amplexicaule*.

La  $IC_{50}$  del extracto metanólico de Flor de *H. amplexicaule* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es mayor a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 28.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de *C. morelosana*.

La  $IC_{50}$  del extracto metanólico de corteza de *C. morelosana* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es superior a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 29.** Viabilidad sobre células Vero del extracto metanólico de *B. officinalis*.

La IC<sub>50</sub> del extracto metanólico de la corteza de *C. morelosana* sobre la línea de células normales de mamífero Vero es superior a una concentración de 175 µg/ml.

## **6.7 Identificación parcial de los compuestos de las plantas en estudio.**

### **6.7.1 Pruebas químicas**

Se realizaron pruebas coloridas para la determinación parcial de los grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos probados en este trabajo de investigación, se encontró la presencia de alcaloides en todos los extractos y azúcares y oxhidrilos fenólicos en los extractos de *H amplexicaule*. Los resultados de las pruebas realizadas se muestran en la Tabla IV.

**Tabla IV**

Grupos funcionales de los extractos metanólicos de la corteza de *C. morelosana*, parte aérea de *B. officinalis* y de hoja, tallo, raíz y flor de *H. amplexicaule*.

Prueba	<i>H. amplexicaule</i>				<i>C. morelosana</i>	<i>B. officinalis</i>
	Tallo	Hoja	Raíz	Flor		
Triterpenos y compuestos esteroideos	-	+	-	+	-	-
Esteroles y metilesteroles	-	+	-	+	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	+	-	+	-	-	+
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Insaturaciones	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Grupo carbonilo	-	-	-	-	-	-
Azúcares	+	+	+	+	-	+
Lactonas	+	-	-	-	-	+
Naftaquinonas y antraquinonas	+	-	+	-	-	-
Oxihidrilos fenólicos	+	+	+	+	-	-
Cumarinas	-	-	-	+	-	-
Compuestos Aromáticos	-	-	-	-	-	-

## 7 Discusión

La medicina alternativa es en la actualidad una de las opciones que está tomando gran auge tanto en el ambiente científico como en el social, por ejemplo, en Latinoamérica se utiliza la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (Valdez-Aguilar, 2001), mientras que en los países desarrollados, la medicina complementaria/alternativa (MCA) se está haciendo cada vez más popular. El conocimiento de las propiedades farmacéuticas de las plantas y su empleo empírico se conoce en América desde antes de la llegada de los españoles (González Ferrara, 1998).

Las plantas evaluadas en este trabajo fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: por los antecedentes reportados de usos etnobotánicos y estudios realizados sobre la familia Boraginaceae y por su distribución en México, en este segundo punto nos enfrentamos al problema del crecimiento del área urbana ya que muchos lugares en los que se reporta la presencia de la familia Boraginaceae han sido invadidos por la civilización, en detrimento de la flora nativa.

Se evaluó la actividad bactericida los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* sobre once cepas bacterianas y ninguna presentó actividad; a

diferencia del estudio realizado por Osuna *et al* (2005), donde una de las plantas estudiadas fue el extracto metanólico de *Turnefortia densiflora* (Boraginaceae), habiendo mostrado actividad sobre las bacterias probadas *S. sonnei* ATCC 11060, *E. coli* ATCC 25992, *S. typhimurium* ATCC 14028, *P. mirabilis* ATCC 43011, *E. coli* R166, *E. coli* R170, *E. cloacae* R819, *S. typhi* R1330 y *S. typhi* R1324.

Hernández (2003) evaluó el extracto hexánico de *Cordia curassavica* observando que presentaba actividad sobre las bacterias gram positivas y gram negativas, posteriormente (2007) este mismo investigador evaluó la actividad bactericida del aceite esencial y los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico mostraron actividad. Okusa *et al* (2007) probaron diversos extractos de *Cordia guilleti* y encontraron que presentó actividad sobre todos los microorganismos probados; a diferencia de los resultados obtenidos con las plantas evaluadas en el presente trabajo las cuales no mostraron actividad sobre las diferentes cepas de bacterias probadas, cinco cepas gram positivas y seis cepas gram negativas.

En el 2004 Mohsen Abolhassani probó el extracto acuoso de borago en contra de *S. aureus* y encontró resultados positivos, contrario a los resultados que en este trabajo se obtuvieron con extracto metanólico, no habiendo mostrado actividad, aunque en el trabajo de Mohsen se reporta actividad sobre *S. aureus*, en el presente trabajo no se registró actividad sobre esta bacteria, tal vez por diferencias en la etapa de madurez de la planta o por condiciones del hábitat.

Los extractos metanólicos de borago también fueron evaluados sobre siete cepas de dermatofitos y una levadura resultando sin actividad todos los extractos evaluados contra dichos microorganismos, resultados similares a los obtenidos por Končić *et al* en el 2010 donde investigaron las infusiones de *Moltingia petraea* (Boraginaceae) sobre diferentes hongos y no obtuvieron actividad fungicida. Sin embargo otra investigación realizada por Okusa *et al* (2007) donde evaluaron el extracto metanólico de *C. guilleti* (Boraginaceae) reportan actividad fungicida. También Hernández *et al* 2007 evaluaron la actividad del aceite esencial de extractos de *Cordia curasavica* (Boraginaceae) sobre cinco cepas de hongos y observaron que tenían actividad contra estos.

A pesar de que las plantas boragináceas tienen un amplio uso en la medicina tradicional que van desde enfermedades gastrointestinales (Hernandez, 2003; Okusa *et al*, 2007; Hernández *et al*, 2007; Perianayagam, 2005) hasta tratamiento tópico (Sertie, 2005; Okusa *et al*, 2007; Hernández *et al*, 2007; Benedek *et al*, 2010) con los resultados obtenidos con los extractos probados de las plantas evaluadas en el extracto metanólico no puede validarse dicho uso.

Otra de las actividades evaluadas fue la amebicida donde se obtuvieron resultados relevantes para los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, con valores de IC<sub>50</sub> de 2 y 8 µg/ml para raíz y tallo respectivamente, esto coincide con lo reportado por Calderón *et al* en el 2010 donde evaluaron el extracto etanólico de las ramas de *Bourreria huanita* y obtuvieron una IC<sub>50</sub> de 6 µg/ml y también con el trabajo realizado



por Tapia-Pérez *et al* en el 2003 en donde evaluaron la actividad antiprotozoario en diversas plantas y se encontró que *T. densiflora* fue la mas activa con una  $IC_{50}$  de 69  $\mu\text{g/ml}$ . Se utilizó como control positivo metronidazol con una  $IC_{50}$  de 0.0846  $\mu\text{g/ml}$ , tomando en cuenta que este es un compuesto puro, los extractos polares de las plantas de la familia Boraginaceae evaluadas en este trabajo son una alternativa y se sustenta su uso tradicional para tratar enfermedades gastrointestinales ocasionadas por *E. histolytica*; al igual que las otras plantas ya mencionadas correspondientes a esta familia. (Perianagyagam, 2005; Hernández *et al*, 2007; Okusa *et al*, 2007)

En la búsqueda de extractos con actividad en sistemas biológicos se han utilizado las líneas celulares para determinar su citotoxicidad (Sagar *et al.*, 2006). Para realizar este estudio se utilizaron cultivos confluentes de la línea celular Vero de mamífero encontrando que el extracto metanólico que presentó la  $CI_{50}$  mayor fue el de raíz de *H. amplexicaule* con un valor de 250  $\mu\text{g/ml}$ , y los otros extractos presentan una  $CI_{50}$  mayor a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ ; un estudio realizado por Sevimli-Gur (2010) probaron naftaquinonas de *Alkanna cappadocica* (Boraginaceae) y reportaron que estos presentaban citotoxicidad con las células estudiadas, entre las que se encontraban las células Vero.

Considerando la citotoxicidad producida por un extracto o compuesto activo sobre una línea celular normal se puede determinar su selectividad comparándolo con las diferentes pruebas biológicas, por este motivo uno de los criterios para considerar la selectividad del material biológico es el Índice de selectividad (IS), donde se ha

establecido que si el valor de IS es menor a 1.0 indica que la sustancia es mas tóxica para, en este caso las amibas, que para las células normales, si es mayor a 1.0, es mas citotóxica para las células normales. En este trabajo las IS aproximadas para los extractos probados oscilan entre 0.008 y 0.7.

Con respecto al Ensayo de Letalidad sobre *Artemia salina* es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con potencial biológico, debido a que se ha demostrado que el crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica (Meyer *et al.*, 1982; Bastos *et al.*, 2009; Almeida-Alves *et al.*, 2000; Masseur and Nshimo, 1995; Solis *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 2008; Vanhaeckele *et al.*, 1998). Se ha determinado que esta técnica tiene una posible correlación con la pruebas específicas de toxicidad (McLaughlin, 1993), En 2002 Carballo *et al* demostraron la correlación establecida previamente entre el ensayo de letalidad y la citotoxicidad y recomiendan que se realicen ambos ensayos simultáneamente.

Para evaluar la toxicidad de los extractos metanólicos de *C. morelosana*, *H. amplexicaule* y *B. officinalis* se utilizó el ensayo de letalidad sobre *A. salina* y se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  superiores a 1,000  $\mu\text{g/ml}$  lo cual indica que el extracto no es tóxico según la escala reportada (Déciga-Campos *et al*, 2007).

Los compuestos identificados en este estudio fueron triterpenos, esteroides, metilesteroides, sesquiterpenlactonas, azúcares, lactonas, naftaquinonas, antraquinonas,

oxhidrilos fenolicos, cumarinas y alcaloides, siendo los alcaloides los que estaban presentes en todos los extractos obtenidos, lo cual coincide con lo reportado por Gilani *et al* (2007) ya que ellos también reportaron la presencia de cumarinas y esteroides en *B. officinalis*, también existen otros reportes de la presencia de terpenos, alcaloides pirrolizados y naftaquinonas (da Silva *et al*, 2009; Craig D *et al*, 1986; Ragaa *et al*, 1986, Brigham *et al*, 1999; El-Shazly *et al*, 1996) y Correia Da Silva *et al*, 2010 reportó que *T. bicolor* (Boraginaceae) es una fuente rica en compuestos fenolicos.

La información obtenida con esta investigación científica aporta la actividad amebicida de las plantas mexicanas estudiadas. Se recomienda continuar con estudios de estas plantas evaluando extractos de diferente polaridad. Por otro lado con el fin de aislar los compuestos responsables de la actividad antiamebiana; se requiere realizar el fraccionamiento y el aislamiento del agente(s) responsable de la actividad biológica para identificar los componentes activos del extracto sobre *E. histolytica*.

## 8 CONCLUSIONES

- ✓ De los extractos metanólicos obtenidos de *Heliotropium amplexicaule*, *Cordia morelosana* y *Borago officinalis*, el que produjo mayor rendimiento fue la parte aérea de *B. officinalis* 15.38% y el de menor rendimiento fue el extracto de corteza de *C. morelosana* 0.7%.
  
- ✓ Los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* no mostraron actividad antibacteriana ni antifúngica sobre los microorganismos evaluados.
  
- ✓ La toxicidad de los extractos metanólicos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* sobre *Artemia salina* fue negativa a una concentración de 1 mg/mL.
  
- ✓ La actividad amebicida más relevante sobre *E. histolytica* HM1-IMSS, fue la ejercida por el extracto de raíz de *H. amplexicaule* con una  $CI_{50}$  de 2 $\mu$ g/mL, seguido por el de corteza de *C. morelosana* con una  $CI_{50}$  de 4 $\mu$ g/mL.

- ✓ En cuanto a la citotoxicidad de los extractos activos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis* sobre la línea celular normal Vero, los más tóxicos fueron los de flor de *H. amplexicaule* y corteza de *C. morelosana* con una  $CI_{50}$  superior a 150  $\mu\text{g/mL}$ .
  
- ✓ Se identificó la presencia de triterpenos, esteroides, metilesteroides, sesquiterpenlactonas, azúcares, lactonas, naftaquinonas, antraquinonas, oxhidrilos fenólicos, cumarinas y los alcaloides se encuentran en todos los extractos de *H. amplexicaule*, *C. morelosana* y *B. officinalis*.

En base a lo anterior podemos resaltar que el extracto metanólico de raíz de *H. amplexicaule* presenta una actividad relevante sobre *E. histolytica* HM1-IMSS con una  $CI_{50}$  de 2  $\mu\text{g/mL}$  y con una muy baja citotoxicidad sobre células Vero con una  $CI_{50}$  de 250  $\mu\text{g/mL}$ .

## 9 LITERATURA CONSULTADA

1. Afzal M., Obuekwe C, Khan A. R. y Barakat H. 2001. Antioxidant Activity Of *Cordia Myxa* L. And Its Hepatoprotective Potential. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. ISSN: 1579-4377. *EJEAFCh*, 6 (8), 2007. [2236-2242]
2. Al-Awadi FM, Srikumar TS, Anim JT, Khan I. 2001. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. *Nutrition*. 17(5):391-6.
3. Alanis F. G. J., Cano C.ano J., Rovalo M. M.1999. Vegetación y Flora de Nuevo León. CEMEX. Impresora Monterrey, S.A. de C.V. p.p. 161.
4. Almeida-Alves TM, Fonseca-Silva A, Brandão M, Mesquita-Grandi TS, Smânia EF, Júnior AS, Zani CL. 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:367-373.
5. Argueta. 1994. Atlas De Las Plantas De La Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista –volumen II. ISBN-968-29-7324-4. México, D. F., pag 1193
6. Asres K., Mazumder A., Bucar F. 2006. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Combretum molle*. *Ethiop Med J.*, 44(3):269-77.
7. Aung HT, Nikai T, Niwa M, Takaya Y. 2010. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. *J Nat Med*. Oct;64(4):482-6. Epub 2010 May 29.
8. Bandoniene D, Murkovic M. 2002. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *J Biochem Biophys Methods*. Oct-Nov;53(1-3):45-9.
9. Barahona MV, Sánchez-Fortún S. 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-

- PAM on carbaryl toxicity. *Env Pollut.* 104:469–476. doi: 10.1016/S0269-7491(98)00152-3.
10. Bastos ML, Lima MR, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EM, Lemos RP. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* May 18;8:16.
  11. Benedek B, Ziegler A, Ottersbach P. 2010. Absence of mutagenic effects of a particular *Symphytum officinale* L. liquid extract in the bacterial reverse mutation assay. *Phytother Res.* Mar;24(3):466-8.
  12. Bhagat M, Saxena AK. 2010. Evaluation of *Cassia occidentalis* for in vitro cytotoxicity against human cancer cell lines and antibacterial activity. *Indian J Pharmacol.* Aug;42(4):234-7.
  13. Bharti, N.; Husain K.; González Garza, M. T.; Cruz-Vega, D.E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F. and Azam, A. 2002. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 12, Issue 23, 2 December, Pages 3475-3478.
  14. Brigham L. A., Michaels P. J., Flores H. E. 1999. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.* 119: 417-428.
  15. Brunetaon Jean. 2000. Plantas Tóxicas Vegetales Peligrosos para el Hombre y los Animales. Editroial ACRIBIA, S.A. pp. 187-198.
  16. Calderón AI, Romero LI, Ortega-Barría E, Solís PN, Zacchino S, Gimenez A, Pinzón R, Cáceres A, Tamayo G, Guerra C, Espinosa A, Correa M, Gupta MP. 2010. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharm Biol.* May;48(5):545-53.
  17. Cano C. J., Marroquín F. J. S. 1994. *Taxonomía de Plantas Superiores*. Tillas pp. 295.
  18. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* Sep 23;2:17.

19. Carranza T. I. E. 2006. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de tallo de *Jatropha dioica* en microorganismos presentes en pacientes con periodontitis del adulto. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
20. Céspedes C. L., Ávila J. G., García A. M., Becerra J., Flores C., Aqueveque P., Bittner M., Hoeneisen M., Martínez M., Silva M. 2006. Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch heartwood lignans. *Z Naturforsch*, 61(1-2):35-43.
21. Chellaiah Muthu, Muniappan Ayyanar, Nagappan Raja and Savarimuthu Ignacimuthu. 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2:43
22. Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard MZ. 2002. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytotherapy Research*. 16(3):199-209.
23. Cheryl A. L. 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2:45
24. Chung HS, Kang M, Cho C, Park S, Kim H, Yoon YS, Kang J, Shin MK, Hong MC, Bae H. 2005. Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by *Lithospermi radix* in mouse peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol*. Dec 1;102(3):412-7. Epub 2005 Jul 28.
25. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F, Loggia RD. 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol*. Feb 28;116(1):144-51. Epub 2007 Nov 19.
26. Correia Da Silva TB, Souza VK, Da Silva AP, Lyra Lemos RP, Conserva LM. 2010. Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. *Pharm Biol*. Jan;48(1):63-9.



27. Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 12, No. 4 p.p. 564 – 582.
28. Craig D. Dodson, Frank R. Stermitz. 1986. Pyrrolizidine Alkaloids from Borage (*Borago officinalis*) Seeds and Flowers. *J. Nat. Prod.*, 49 (4), pp 727–728
29. Cruz-Vega, D.E.; Aguilar, A.; Castro-Garza, J.; González-Garza, M.T. 2000. Antiamoebic activity of aqueous extracts from five medicinal plants from Northeastern Mexico. *Arch Med Res.* 31(4 Suppl):S17-8
30. da Silva Sâmia Andrica S., Agra Maria de Fátima, Tavares Josean F., da-Cunha Emídio V.L., Barbosa-Filho José Maria, da Silva Marcelo S. 2009. Flavones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* ISSN 0102-695X
31. Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G.E., Naverrete A., Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol* 110: 334-342.
32. Dellow JJ, Bourke CA y McCaffery. 2008. Blue heliotrope. *Primefact* 653. Job numer 8030. Pp 1-5.
33. Domínguez X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. 1ª edición. LIMUSA. México, D.F. pp. 176.
34. El-Shazly A., Sarg T., Aziz A. A., and El-Dahmy S. 1996. Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of Natural Products* 59, 310-313.
35. Frazão B, Martins R, Vasconcelos V. 2010. Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous north atlantic marine cyanobacteria?. *Mar Drugs.* Jun 21;8(6):1908-19.
36. García G. V. A. 2003. Análisis fitoquímico de los Extractos de *Carya illinoensis*, *Machaeranthera scabrella*, *Ruta chalepensis* y *Thymus vulgaris* con actividad fungicida para dermatofitos. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

37. George S, Bhalerao SV, Lidstone EA, Ahmad IS, Abbasi A, Cunningham BT, Watkin KL. 2010. Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* Sep 17;10:52.
38. Gilani AH, Bashir S, Khan AU. 2007. Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *J Ethnopharmacol.* Dec 3;114(3):393-9. Epub 2007 Aug 24.
39. González Ferrara. 1998. Plantas medicinales del norte de México. 1er Edición. México. p.p. 5-8, 51.
40. Gupta A. K., Kohli Y. 2003. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British Journal of Dermatology*, 149: 296–305.
41. Harbone J.B. 1998. *Phytochemical Methods a guide to modern techniques of planta analysis.* 3ª ed. Chapman & Hall, London, pp. 1-32
42. Harwing J, Scott P. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol.* 21:1011–1016.
43. Herber D. 2007. *PDR for Herbal Medicines.* 3a. ed. Thomson PDR, NJ, USA, pp 120-124.
44. Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J Ethnopharmacol.* Oct;88(2-3):181-8.
45. Hernández T., Canales M., Terán B., Ávila O., Duran A., García A. M., Hernández H., Ángeles-López O., Fernández-Araiza M., Ávila G. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol*; 111(1):137-41.
46. Jaki B, Orjala J, Bürji HR, Sticher O. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm Biol.* 37:138–143. doi: 10.1076/phbi.37.2.138.6092.

47. José Luis GG, Pablo C. 2009. Cytotoxicity screening of endemic plants from Guayana highlands. *Trop Biomed.* Aug;26(2):149-54.
48. Juárez P. S. R. 2000. Evaluación del efecto inhibitorio de 42 extractos de plantas medicinales en el crecimiento de hongos productores de micotoxinas. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
49. Kloucek P, Svobodova B, Polesny Z, Langrova I, Smrcek S, Kokoska L. 2007. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *J Ethnopharmacol.* May 4;111(2):427-9. Epub 2006 Nov 18.
50. Končić MZ, Kremer D, Gruz J, Strnad M, Bisevac G, Kosalec I, Samec D, Piljac-Zegarac J, Karlović K. 2010. Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food Chem Toxicol.* Jun;48(6):1537-42. Epub 2010 Mar 19.
51. Koneman W., Allen S.D., Dowell V.R., Sommers M. 1989. *Diagnostico Microbiologico*. 1a edición. Ed. Médica Panamericana. 380-402.
52. Latha LY, Sasidharan S, Zuraini Z, Suryani S, Shirley L, Sangetha S, Davaselvi M. 2006. Antimicrobial activities and toxicity of crude extract of the *Psophocarpus tetragonolobus* pods. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* Aug 28;4(1):59-63.
53. Long, K. Z.; Rosado, J. L.; Montoya, Y.; Solano, M. L.; Hertzmark, E.; DuPont, H. L.; Santos, J. I. 2007. Effect of Vitamina A and Zinc Supplementation on Gastrointestinal Parasitic Infections Among Mexican Children. *Official Journal of the American Academy of Pediatrics.* 120, e846-e855.
54. Lopes VR, Fernández N, Martins RF, Vasconcelos V. 2010. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Mar Drugs.* Mar 5;8(3):471-82.
55. Martínez M, Del ramo J, Torreblanca A, Díaz-Mayans J. 1998. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenética*. *Aquaculture.* 172:315–325. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00431-1.

56. Massele AY and Nshimo CM. 1995. Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East African Medical Journal* 72:661-663.
57. McLaughlin JM 1991. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In K Hostettmann, *Assays for Bioactivity*, Academic Press, San Diego, p. 2-32.
58. McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. 1991. Bench top" bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. In: AU Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. pp. 383-409.
59. Mesa A. A. C., Bueno S. J. G. y Betancur G. L. A. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap.* Diciembre; Vol. 17 (No4): 325-331.
60. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen L B, Nichols D E, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
61. Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*. 123:464.
62. Monroy-Ortiz C, Castillo-España P. 2007. Plantas Medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. CONABIO \_Universidad Autónoma del Estado de Morelos. ISBN 9688782777. 96
63. Monti Claudia, Novoa María C. y Vizcaíno Claudia E. 2003. Anatomía y Etnobotánica de Dos Especies de Boraginaceae de la Provincia Pampeana (Argentina) Usadas en Medicina Popular. *Lat. Am. J. Pharm.* 22 (3): 197-201
64. Muthu C., Ayanar M., Raja N. and Ignacimuthu S. 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2:43.
65. Nieto I, Salama A, Cataño J, Chegwin C. 2008. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:186-187.

66. Okusa PN, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol*. 2007 Jul 25;112(3):476-81. Epub Apr 24.
67. Omar M., J . DeFeo, and H. W. Youngken, Jr 1983. Chemical and toxicity studies of *Trichodesma africanum* L. *Journal of Natural Products* Vol. 46, No. 2 p.p. 153-156.
68. Orozco, E.; Lopez, C.; Gomez, C; Perez, D.G.; Marchat, L.; Banuelos, C.; Delgado, D.M. 2002. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* 51, 353-359.
69. Ortiz-Andrade R. R., García-Jiménez S., Castillo-España P., Ramírez-Avila G., Villalobos-Molina R., Estrada-Soto S. 2007. alpha-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. *J Ethnopharmacol*, 109(1):48-53.
70. Osuna L., Tapia-Perez M.E., Jimenez-Ferrer J.E., Carillo-Quiroz B.A. and Silva-San J. 2005. Screening of *Altemanthem repens*, *Boevhavia coccinea*, *Flaveria trinervia*, *Tournefortia densiflora*, and *Vitex mollis* Extracts to Evaluate their Antibacterial Activity and Effect on Smooth Muscle. I. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 43. No. 9. pp. 749-753.
71. Pamplona R. J. D. 2000. *Enciclopedia de las plantas medicinales*. 1ª edición. Editorial Safeliz. Madrid, España. p.p. 405, 746-747.
72. Paniagua, G. L.; Monroy, E.; García-González, O.; Alonso, J.; Negrete, E.; Vaca, S. 2007. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6, 17.
73. Panoto-s, 2007. *Historia de los fitofármacos en la medicina*. Editorial Siegfied Rhen. pp 9-20
74. Passos G. F., Fernandes E. S., da Cunha F. M., Ferreira J., Pianowski L. F., Campos M. M., Calixto J. B. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol*, 110(2):323-33.
75. Patiño C. Diana. 2003. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? [UMBral Científico](#), ISSN 1692-3375, N°. 3, p.p. 48-56

76. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. 2000. A new screening test toxicity testing of dental materials. *J Dent.* 28:341–345. doi: 10.1016/S0300-5712(00)00007-5.
77. Perianayagam JB, Sharma SK, Pillai KK. 2005. Evaluation of antidiarrheal potential of trichodesma indicum root extract in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* Oct;27(8):533-7.
78. Petersen M, Simmonds MSJ 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.
79. Pritt, B. S.; Clark, C. G. 2008. Amebiasis. *Mayo Clin Proceedings.* 83, 1154-1160.
80. Ragaa M. A. Mansour, Nabil A. M. Saleh. 1986. The Flavonoids of *Alkanna orientalis*. *J. Nat. Prod.*, 49 (2), p 356.
81. Ricker M., Daly D. C. 1998. Botánica económica en bosques tropicales, principios y métodos para su estudio y aprovechamiento. 1ª edición. Editorial Diana. Mexico, D.F. p.p. 94 - 97.
82. Rosas T. A. G. 2001. Actividad de extractos de *Agave americana* sobre el crecimiento, conidiogénesis y expresión del gen regulador de la biosíntesis de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
83. Sagar SM, Yance D, Wong RK. 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer- Part 1 and 2. *Current Oncology* 13 (1), 14-26 Part 1 and 13 (3): 99-107 Part 2.
84. Samarawickream NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:833-40.
85. Sayyah M, Boostani H, Pakseresht S, Malaieri A. 2009. Efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in treatment of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* Nov 13;33(8):1513-6. Epub Sep 6.

86. Sertié JA, Woisky RG, Wiezel G, Rodrigues M. 2005. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine*. May;12(5):338-44.
87. Sevimli-Gur C, Akgun IH, Deliloglu-Gurhan I, Korkmaz KS, Bedir E. 2010. Cytotoxic naphthoquinones from *Alkanna cappadocica* (perpendicular). *J Nat Prod*. May 28;73(5):860-4.
88. Shigeo Tanaka, Mayumi Tajima, Minoru Tsukada, Mamoru Tabata. 1986. A Comparative Study on Anti-Inflammatory Activities of the Enantiomers, Shikonin and Alkannin. *J. Nat. Prod.*, 49 (3), pp 466–469
89. Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Hashemi A, Saeedi Saravi SS. 2010. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of *Cucurbitapepo* and *Solanum nigrum* on HepG2 and CT26 cancer cell lines. *Pharmacogn Mag*. Jul;6(23):176-9.
90. Sleet RB, Brendel K. 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. *Ecotoxicol Env Safety*.7:435–446.
91. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med*. 59:250–252.
92. Stanley SL Jr. 2003. Amoebiasis. *Lancet*. 361, 1025-34.
93. Tapia-Pérez M.E., Tapia-Contreras A., Cedillo-Rivera R., Osuna L. y Meckes M. 2003. Screening of Mexican Medicinal Plants of Antiprotozoal Activity- Part II. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 41. No. 3. pp. 180-183.
94. Togola A., Diallo D., Dembélé S., Barsett H., Paulsen B. S. 2005. Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*; 1:7.
95. Uddin SJ, Grice ID, Tiralongo E. Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009 Aug 25. [Epub ahead of print]
96. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. 1998. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety*. 1981;5:382–387.

97. Verastegui M. M.A., Verde S. M.J., Garcia A. J. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas. Revista de la Sociedad Química de México XXXIII Congreso Mexicano de Química XVII Congreso de Educación Química. pp. 131.
98. Villarreal L., Torres R., Urzúa A., Reina M., Cabrera R., González-Coloma A. 2001. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. *J Nat Prod*; 64(9):1123-6.
99. Vit P. 2002. *Borago officinalis* L. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 1 Borraja. Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 43.
100. Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I. 1999. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem*. 274; 26051-6.



## **10 APÉNDICE**

## **10.1 RESUMEN CURRICULAR**

Catalina Leos Rivas

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentruación en

Química de Productos Naturales

Tesis: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE TRES PLANTAS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 25 de Abril de 1980, hija de Manuel Leos y Catalina Rivas Morales.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencia de Alimentos en 2005. Doctorado en Ciencias becado por CONACyT No. 204599 en 2010.

Experiencia Profesional: Maestra de Química Analítica, Métodos Instrumentales de Análisis y Contexto Social de la Profesión (2007-2010).

Número de Publicaciones: 1

## **10.2 ARTÍCULO**

**Decision Letter (JMF-2010-0164.R1)**

**From:** shendler@ucsd.edu

**Subject:** Journal of Medicinal Food - Decision on Manuscript ID JM 2010-0164.R1

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "**In vitro Amoebicidal Activity of Borage (Borago officinalis) Extract on Entamoeba histolytica**" in its current form for publication in Journal of Medicinal Food. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2111. If you prefer to send the copyright form via e-mail please send to ebicovny@liebertpub.com. Do NOT email these forms to the Editorial office.

Authors who would like their papers to be posted on PMC immediately have the option to make their articles available free on line via Liebert Open Option for a one-time fee. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Medicinal Food, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Sheldon Hendler, Ph.D., M.D.  
Editor-in-Chief, Journal of Medicinal Food  
shendler@ucsd.edu

**Date Sent:** 20- Oct-2010

