



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

“Evaluación de la actividad citotóxica y antioxidante de *Euphorbia tanquahuete* y la relación con el contenido de compuestos fenólicos”

Tesis

Para obtener el Título de:

Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Gu Yen Ambriz Ortiz

Director de tesis:

M.C. Héctor Urquiza Marín

Co-asesor de tesis

D.C. Crisanto Velázquez Becerra

Morelia, Michoacán, noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** por ser mi casa de formación, desempeño y estudio en sus aulas.

Al **M.C. Héctor Urquiza Marín**, por su amistad, su asesoría, su apoyo y facilidades prestadas para realización del presente trabajo y por haberme recibido en su laboratorio, siempre se lo agradeceré por haber contribuido en ayudarme con mi titulación.

Al **D.C. Daniel Godínez Hernández**, por sus enseñanzas en el laboratorio en las pruebas y ayuda en la escritura con la tesis y redacción de mi tesis a su vez por su gran amistad brindada.

Al **D.C. Crisanto Velázquez Becerra**, por su apoyo con el equipo necesario para las pruebas de toxicidad utilizadas en mi tesis sus consejos y su ayuda en la formación de mi tesis y brindarme su amistad.

Al **D.C. Rafael Torres Martínez**, por su amistad, sus consejos y su apoyo prestado en el análisis de soxhlet en la redacción, formación, estructuración de las pruebas, gráficas y sus consejos.

Al **D.C. Rosalio Mercado Camargo**, por todas las observaciones y correcciones invaluables dirigidas al mejoramiento del presente trabajo y más aún por haber sido mi profesor y estar presente siempre que se presentaba alguna duda.

Al **D.C. Héctor Martínez Flores**, por sus enseñanzas al momento de darme clases y ser participe en mi formación académica también por tomarse su tiempo el revisar y corregir mi tesis.

Al **M.C Rafael Zamora Vega**, por sus enseñanzas al momento de las clases a su vez por tomarse el tiempo para darme sus correcciones dirigidas al presente trabajo y por darme su amistad.

A la **M.C. Malinali Ambriz Ortiz**, por presentarme su apoyo en las pruebas necesarias para mi tesis y su ayuda en la redacción de la misma por ser parte de mi familia y al saber que puedo contar con ella en Cada momento de mi vida.

Al **M.C. Brian Gómez Chávez**, por su apoyo en la redacción de mi tesis formación y estructuración de la misma también por ser un gran amigo.

A **Q.F.B. Juan Daniel Corona Hernández**, por su ayuda para montar las pruebas necesarias tales como toxicología en *Artemia salina* y lectura en placa a su vez por ser un gran amigo de toda la vida.

A la **Q.F.B. Marlety Vásquez Arroyo**, por su ayuda con la obtención de muestra de resina del árbol *Euphorbia tanquahuete* y mostrarme el método obtención más viable por su gran amistad de toda la vida.

DEDICATORIA

A mis padres, Javier Ambriz Barajas y María del Pilar Ortiz, por su gran apoyo, su gran compromiso, sus consejos, por darme vida y abrirme las puertas del conocimiento.

A mi hermano Inti Ambriz Ortiz, siempre fuiste mi confidente mi mejor amigo que nunca volverá sé que algún día volveremos a encontrarnos y estarás orgulloso por mis logros siempre tendrás un lugar en mi corazón te extraño. Por ese largo adiós.

A mi hermana Malinali Ambriz Ortiz mi gran ejemplo de vida ya que ella nos puso el peldaño a los demás mostrándonos que si se pueden lograr grandes cosas en la vida formándose como química y después adquiriendo el título de maestra en ciencias.

A mi tío Cirino Ortiz Castañeda, por su apoyo al paso de la carrera y sus palabras de que lo podía lograr también mostrando un gran ejemplo de trabajo arduo.

A mi cuñada Michel Méndez García que en conjunto con mis sobrinos me han mostrado que la felicidad lo causan unos pequeños momentos.

A mi tío Heliodoro Ambriz Barajas por sus lecciones de vida al enseñarme a pescar lo cual me fomento la paciencia y a su vez ser táctico en lo que necesitara hacer en mi vida.

A mi madrina Rosalba Magallan por ser mi madrina y prestarme su apoyo cuando más lo he necesitado también por su gran amistad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	ix
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Metabolismo secundario de productos naturales.....	3
3.1.1 Terpenoides	4
3.1.2 Alcaloides.....	7
3.1.3 Fenilpropanoides y policétidos.....	8
3.1.4 Composición química de la resina.....	11
3.1.5 Compuestos fenólicos.....	11
3.1.6 Otros metabolitos secundarios (glucósidos).....	12
3.1.6.1 Saponinas.....	12
3.1.6.2 Glucósidos cardiacos	12
3.1.6.3 Glucósidos cianogénicos	12
3.2 Actividad terapéutica de los compuestos naturales	13
3.3 <i>Euphorbia tanquahuete</i> (<i>Euphorbia elástica</i> , <i>Euphorbia fulva</i> o <i>Euphorbiadendron fulvum</i>)	14
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVOS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1 Material biológico.....	18

7.2	Obtención de los extractos.....	18
7.3	Experimentos <i>in vitro</i>	19
7.3.1	Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de metabolitos secundarios	19
7.3.2	Cuantificación de fenoles	19
7.3.3	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de madera por el método de DPPH ⁻	20
7.4	Experimentos <i>in vivo</i>	20
7.4.1	Efecto tóxico de extractos de resina de <i>Euphorbia tanquahuete</i> por medio del cálculo de la concentración letal LD_{50} en el modelo <i>A. salina</i>	20
7.4.2	Crecimiento de <i>Artemia salina</i>	21
7.4.3	Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT	21
7.4.4	Determinación de DL_{50}	21
7.4.5	Análisis estadístico	22
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
8.1	Experimentos <i>in vitro</i>	23
8.1.1	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FOLIN)	23
8.1.2	Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH ⁻	24
8.2	Experimentos <i>in vivo</i>	25
8.2.1	Efecto tóxico de los extracto de <i>E. tanquahuete</i> por medio del cálculo de la concentración letal LD_{50} en el modelo <i>A. salina</i>	25
9	CONCLUSIÓN	28
10	REFERENCIAS CITADAS.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interfaz de la planta con rutas metabólicas secundarias de fenilpropanoide y policétido con metabolismo microbiano. Se muestra una selección de rutas de plantas naturales en un posible huésped de <i>S. cerevisiae</i> . Redes más extensas de rutas fenilpropanoides naturales y sintéticas se han mostrado previamente. Abreviaturas adicionales: Acc1, acetil-CoA carboxilasa; PAL, Phe amoniaco-liasa; PKS, policétido sintasa; TAL, Tyr amoniaco-liasa (Michael et al. 2019).....	10
Figura 2. A) <i>Euphorbia tanquahuete</i> creciendo en condiciones naturales. B) Inflorescencia del árbol <i>Euphorbia tanquahuete</i> . C) Tallo. D) Hojas. E) Árbol en habitat natural F) Crecimiento. G) Distribución geográfica (CONABIO, 2019).	14
Figura 3. Foto que ilustra la morfología de <i>A. salina</i> . 4x.....	21
Figura 4. Contenido total de fenoles de los extractos de <i>E. tanquahuete</i> . El ácido gálico fue usado como estándar para medir el contenido fenólico total. Cada valor es expresado con la media \pm EE (n=3). Extracto de éter de <i>E. tanquahuete</i> (ETE), extracto de hexano de <i>E. tanquahuete</i> (ETH) y extracto de cloroformo de <i>E. tanquahuete</i> (ETC). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey.....	24
Figura 5. Capacidad antioxidante para la eliminación del radical DPPH \cdot de los extractos de <i>E. tanquahuete</i> . El trolox fue usado como estándar para medir la capacidad reductora del radical DPPH \cdot en equivalentes μ M trolox. Cada valor es expresado con la media \pm EE (n=3). Extracto de éter de <i>E. tanquahuete</i> (ETE), extracto de hexano de <i>E. tanquahuete</i> (ETH) y extracto de cloroformo de <i>E. tanquahuete</i> (ETC). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. ^{bc} p<0.05 (ETH vs ETC).....	25
Figura 6. Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 12 h, a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 μ g/mL del extracto de ETE. En esta grafica se observa una pequeña disminución en la cantidad de <i>A. salina</i> presentes en el medio lo cual ha sido generado por la concentración de los extractos de <i>E. tanquahuete</i>	26
Figura 7. Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 12 h frente a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 μ g/mL del extracto de ETH. Transcurridas 12 h de iniciada la prueba se observa un mayor deceso de las <i>A. salina</i>	26

Figura 8. Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 12 h frente a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de ETC. Tras 24 h transcurridas de observo un total deceso de *A. salina*.27

-ABREVIATURAS

AC: Átomos de carbono

C: Carbono

DL₅₀: Dosis letal cincuenta

DPPH: 2,2-difenil-2-picrilhidrazil

ETC: Extracto de cloroformo de *E. tanquahuete*

ETE: Extracto de éter de *E. tanquahuete*

ETH: Extracto de hexano de *E. tanquahuete*

FPP: Farnesil pirofosfato

GGPP: Geranilgeranilpirofosfato

GPP: Geranil pirofosfato

IPP₂: Isopentenil pirofosfato

MS: Metabolitos secundarios

nm: N

1. RESUMEN

Las plantas y los árboles sintetizan una gama de compuestos orgánicos que tradicionalmente se clasifican como metabolitos primarios y secundarios. Estos últimos desempeñan una participación importante en la adaptación de las plantas al entorno cambiante y en la superación de las restricciones de estrés, realizan una amplia gama de funciones protectoras en situaciones de estrés biótico y abiótico: antimicrobiano, fotoprotector, además, presentan otras actividades biológicas como: citotóxicos, antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipemiente entre otras. Por lo tanto el propósito de este trabajo fue evaluar la actividad biológica de tres extractos de *Euphorbia tanquahuete* [(etérico (ETE), hexánico (ETH) y clorofórmico (ETC)-). Se realizaron ensayos *in vitro* para la cuantificación de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante y citotóxica por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante se determinó mediante las técnicas DPPH. Para las pruebas *in vivo*, se utilizó el modelo biológico de *Artemia salina* para evaluar la dosis letal 50 (DL₅₀). Los resultados *in vitro* mostraron que el extracto de ETH fue el que presentó mayor contenido fenólico [(40.5±4.31 mg de ácido gálico (EAG g⁻¹)), el extracto de ETC obtuvo una concentración de 24.7±7.6 (EAG g⁻¹-) y por último el extracto con menor contenido de fenoles fue el ETE (19.4±2.3 (EAG g⁻¹)). Por otro lado, en el ensayo del radical DPPH. Se observó una capacidad similar para reducir el radical DPPH. De los tres extractos utilizados, sin embargo, el extracto de ETH presentó una diferencia estadística significativa para reducir este radical en comparación con el ETC (0.473±0.015 y 0.433±0.002 μM TROLOX mL⁻¹, respectivamente) y el extracto de ETE tuvo una actividad de. 0.456±0.004 μM TROLOX mL⁻¹. Además, la evaluación de toxicidad en *A. salina* demostró que la administración de los extractos de ETE, ETH y ETC mostró niveles de mortalidad en las dosis de 60 μg/mL para los dos primeros y para el último 40 μg/mL para reducir la población al 50% a las 12 horas. Con estos resultados se observó que *E. tanquahuete* presenta actividad antioxidante y citotóxicas en distintas concentraciones.

Palabras clave: resina, solvente, extracción, compuesto natural, terapéutico.

2. ABSTRACT

Plants and trees synthesize a range of organic compounds that are traditionally classified as primary and secondary metabolites. The latter play an important role in adapting plants to the changing environment and in overcoming stress restrictions, they perform a wide range of protective functions in situations of biotic and abiotic stress: antimicrobial, photoprotective, in addition, they present other biological activities as; cytotoxic, antioxidant, hypoglycemic, lipid lowering among others. Therefore the purpose of this work was to evaluate the biological activity of three extracts of *Euphorbia tanquahuete* [(ethereal (ETE), hexanic (ETH) and chloroform (ETC))]. *In vitro* assays were performed for the quantification of phenolic compounds related to the antioxidant and cytotoxic activity by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity was determined by DPPH· techniques. For *in vivo* tests, the biological model of *Artemia salina* was used to evaluate lethal dose 50 (LD50). The results *in vitro* showed that the ETH extract was the one with the highest phenolic content (40.5 ± 4.31 mg of gallic acid (EAG g⁻¹)), the ETC extract obtained a concentration of 24.7 ± 7.6 mg of gallic acid (EAG g⁻¹) Finally, the extract with the lowest phenol content was ETE (19.4 ± 2.3 mg (EAG g⁻¹)). On the other hand, in the DPPH· radical test, a similar ability to reduce DPPH· radical of the three extracts used, however, the ETH extract showed a significant statistical difference to reduce this radical compared to the ETC (0.473 ± 0.015 and 0.433 ± 0.002 μM TROLOX mL⁻¹, respectively) and the extract of ETE had an activity of 0.456 ± 0.004 μM TROLOX mL⁻¹ In addition, the toxicity assessment in *A. salina* showed that the administration of the extracts of ETE, ETH and ETC showed mortality levels at doses of 60 μg / mL for the first two and for the last 40 μg / mL to reduce Cir the population at 50% at 12 hours. With these results it was observed that *E. tanquahuete* has antioxidant and cytotoxic activity in different concentrations.

Keywords: resin, solvent, extraction, natural compound, therapeutic.

3. INTRODUCCIÓN

Los árboles forestales incluyen un gran grupo de gimnospermas y angiospermas que desempeñan un papel crucial en el equilibrio general de los ecosistemas. Las especies forestales también tienen una gran importancia económica en la producción de madera, pasta de papel, biocombustibles y una variedad de resinas y metabolitos secundarios. A pesar de la relevancia de las especies forestales desde el punto de vista ambiental, económico y social, nuestro conocimiento de los mecanismos que subyacen al crecimiento, desarrollo y productividad de los bosques aún es limitado en comparación con las plantas de cultivo (Cánovas *et al.* 2018). Las plantas y los árboles han sido la clave para el bienestar humano desde los primeros años de la existencia humana, sintetizan una amplia gama de compuestos orgánicos que tradicionalmente se clasifican como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos que son esenciales para el crecimiento y el desarrollo. Los metabolitos secundarios desempeñan una participación importante en la adaptación de las plantas al entorno cambiante y en la superación de las restricciones de estrés, realizan una amplia gama de funciones protectoras en situaciones de estrés biótico y abiótico: antimicrobiano, fotoprotector, estabilizador de la estructura, señalización y suelen acumularse en concentraciones sorprendentemente altas en algunas especies (Ingle *et al.* 2019).

3.1 Metabolismo secundario de productos naturales

El metabolismo secundario de las plantas se define como un término para la vía y los productos de metabolismo de moléculas pequeñas que no son esenciales para la supervivencia del organismo. En la naturaleza, una variedad de vías de metabolismo secundario provocaron una serie de compuestos defensivos de la planta llamados metabolitos secundarios (MS). Además de nutrientes básicos como proteínas, grasas o carbohidratos, las plantas pueden producir otros compuestos, incluidos toxoides, polisacáridos, flavonas, etc. Los MS son las moléculas que se pueden dispensar para el metabolismo y el crecimiento de las plantas, mientras que la gran variedad y alta diversidad de productos secundarios son componentes clave para que las plantas interactúen con el medio ambiente en la adaptación a condiciones de estrés biótico y abiótico, participan en la

protección contra herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso otras plantas competidoras. Además, algunas plantas utilizan MS como señales para la comunicación entre plantas y microorganismos simbióticos, y también sirven para atraer polinizadores y dispersores de semillas (Yang *et al.* 2018). Los MS de las plantas se encuentran de manera ubicua en diferentes partes de las plantas medicinales y aromáticas. (Ahamad *et al.* 2019). Los MS se definen ampliamente como productos naturales sintetizados por un organismo que no son esenciales para sustentar el crecimiento y la vida. El reino vegetal fabrica más de 200,000 compuestos químicos distintos, la mayoría de los cuales provienen del metabolismo especializado. Si bien estos compuestos desempeñan funciones importantes en la competencia y defensa entre especies, muchos productos naturales de plantas se han explotado para su uso como medicamentos, fragancias, sabores, nutrientes, repelentes y colorantes. Las rutas biosintéticas de las plantas y microorganismos median la formación de las principales clases de productos naturales: terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides y policétidos de alto valor (Michael *et al.* 2019).

3.1.1 Terpenoides

Los terpenoides (también llamados isoprenoides) son la clase más grande de MS de las plantas, y comprenden más de 50,000 productos naturales (Michael *et al.* 2019). Se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 átomos de carbonos (AC)) que contienen (por ejemplo, los terpenos de 10 AC contienen dos unidades de isopreno y se llaman monoterpenos) (Taiz y Zeiger, 2002). Además, poseen una gama de funcionalidades químicas como actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y amebicida (López-Carreras *et al.*, 2012). Los precursores centrales geranyl pirofosfato (GPP; C10), farnesil pirofosfato (FPP; C15) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP; C20) forman la base estructural de la mayoría de los terpenoides de orden superior (Michael *et al.* 2019). Su biosíntesis se inicia con acetil-CoA o intermediarios glucolíticos en al menos dos formas diferentes: en la vía del ácido mevalónico, tres moléculas de acetil-CoA se unen paso a paso para formar ácido mevalónico. Este intermediario clave de seis carbonos se pirofosforila, descarboxila y deshidrata para producir isopentenil pirofosfato (IPP2). IPP2 es el bloque de construcción de terpenos activado de cinco carbonos (Taiz y Zeiger, 2002). Recientemente, se descubrió que el IPP2 también puede formarse a partir de intermediarios de glucólisis o el ciclo de reducción de carbono fotosintético a través de un conjunto separado de reacciones llamado

ruta del metilentitol fosfato que funciona en cloroplastos y otros plastidios. Este grupo está compuesto por hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Varios productos naturales de plantas importantes se derivan de orígenes biosintéticos mixtos, ocultando los límites entre las clases de MS (Figura 1). Dentro de la clase de alcaloides, los alcaloides indol monoterpénoides (MIA) surgen a través de la condensación de la triptamina análoga al triptófano y un monoterpene secoiridoide (secologanina). La secologanina también puede condensarse con dopamina, dando lugar a emetina y cefalina, los alcaloides activos del medicamento emético ipecacuana. La nicotina se forma mediante el acoplamiento de dos anillos heterocíclicos de distinto origen biosintético. Mientras que el anillo de pirrolidina deriva de la ornitina a través de la ruta del alcaloide de tropano (Figura 1), el anillo de piridina se forma a partir de niacina, sintetizada a partir del aspartato. Varios otros alcaloides se forman a partir de productos de la ruta del fenilpropanoide, como las anfetaminas sustituidas a través de la condensación de piruvato y ácido benzoico, un análogo C6-C1 del ácido cinámico. Las anfetaminas modificadas también se llaman alcaloides de fenilpropilamino para reflejar su origen biosintético dual. Del mismo modo, los alcaloides de fenetilisoquinolina se derivan a través de la condensación de dopamina y 4-hidroxidihidrocinamaldehído, otro derivado del ácido cinámico. Los capsaicinoides producidos por los chiles tienen una clasificación tripartita única, ya que son alcaloides exocíclicos que surgen en parte de la vía del fenilpropanoide y la síntesis de policétidos (Michael *et al.* 2019).

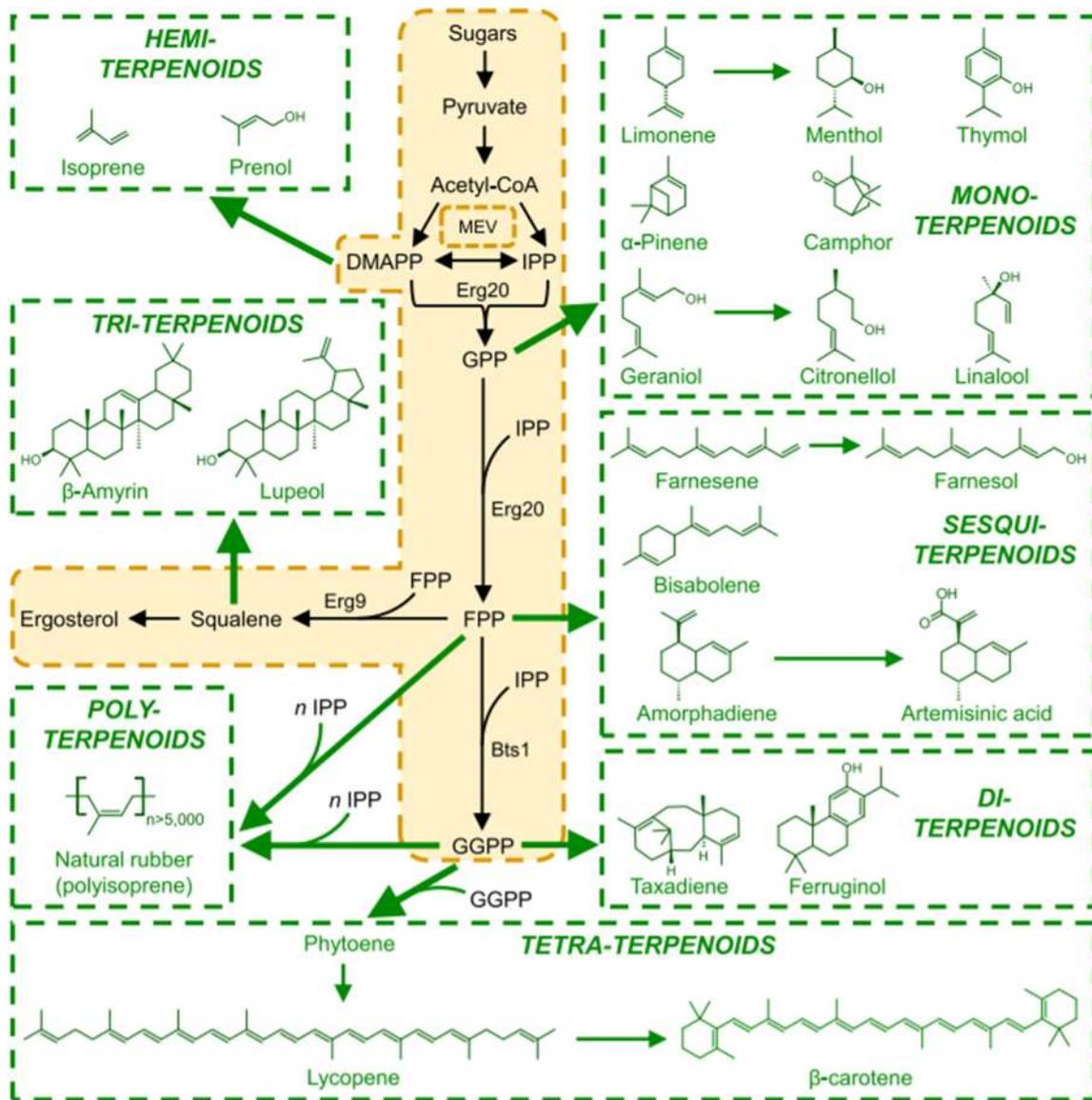


Figura 1. Interfaz de las vías metabólicas secundarias terpenoides de la planta con el metabolismo microbiano. Las reacciones y vías metabólicas secundarias de la planta (verde) se muestran vinculadas al metabolismo microbiano central (sombreado beige; fuente negra). *S. cerevisiae* se muestra como la posible especie huésped. Se muestran las enzimas de levadura (fuente negra). Abreviaturas: Bts1, geranilgeranil difosfato sintasa; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; Erg9, escualeno sintasa; Erg20, farnesil pirofosfato sintetasa; FPP, farnesil pirofosfato; GPP, geranil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; IPP, pirofosfato de isopentenilo; MEV, vía de mevalonato. (Michael et al. 2019).

3.1.2 Alcaloides

Se definen como metabolitos de bajo peso molecular que contienen átomos de nitrógeno heterocíclicos (alcaloides verdaderos) o exocíclicos (protoalcaloides, aminas y poliaminas). Se conocen aproximadamente 20,000 alcaloides naturales, muchos de los cuales presentan analgésicos (morfina), estimulantes (cafeína y efedrina), psicotrópicos (mescalina y cocaína), antibacterianos (sanguinarina), anticancerígenos (vinblastina y vincristina), antitusivos (codeína), antiinflamatorios (Berberina), antiespasmódica (papaverina) o actividades antipalúdicas (quinina). Los derivados de fenilalanina y tirosina (por ejemplo, fenetilamina, tiramina y dopamina) son la fuente de una gran cantidad de alcaloides, incluidos los alcaloides de bencilisoquinolina (BIA) y los alcaloides de fenetilisquinolina (Fig.2). Los BIA son una gran clase de aproximadamente 2.500 metabolitos que incluyen berberina, noscapina, sanguinarina y morfina. Estos medicamentos importantes se derivan de la condensación de dopamina y 4 hidroxifenilacetaldehído, que se sintetizan a partir de tirosina. La dopamina también puede condensarse con derivados de fenilalanina (4 hidroxidihidrocinamaldehído), produciendo la clase de alcaloides de fenetilisquinolina. Fenilalanina y tirosina forman la base de algunos protoalcaloides y catecolaminas más simples, incluidas las anfetaminas modificadas (efedrina y catinona), dopamina, mescalina y adrenalina. Debido a la ubicuidad del grupo indol en la naturaleza, Triptófano también forma la base de muchos alcaloides importantes, como los indoles simples, las b-carbolinas (serotonina y harmina) y los alcaloides indol monoterpénicos (MIA). (Michael et al. 2019). La mayoría de los alcaloides son alcalinos, presentando valores de pH de 7.2 en el citosol y en la vacuola un pH alrededor de 5 a 6. Su átomo de nitrógeno está protonado, por lo tanto, los alcaloides tienen carga positiva y generalmente son solubles en agua (Taiz y Zeiger, 2002). En los seres humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas debido a la interacción con los neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

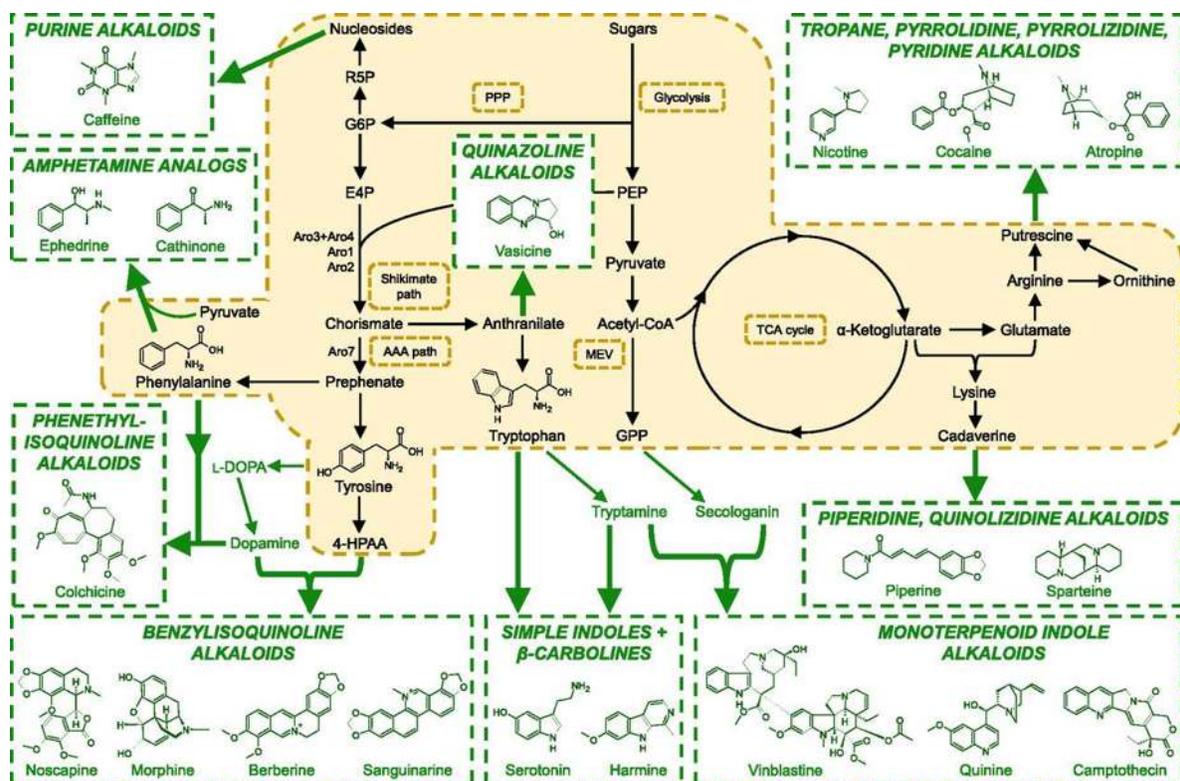
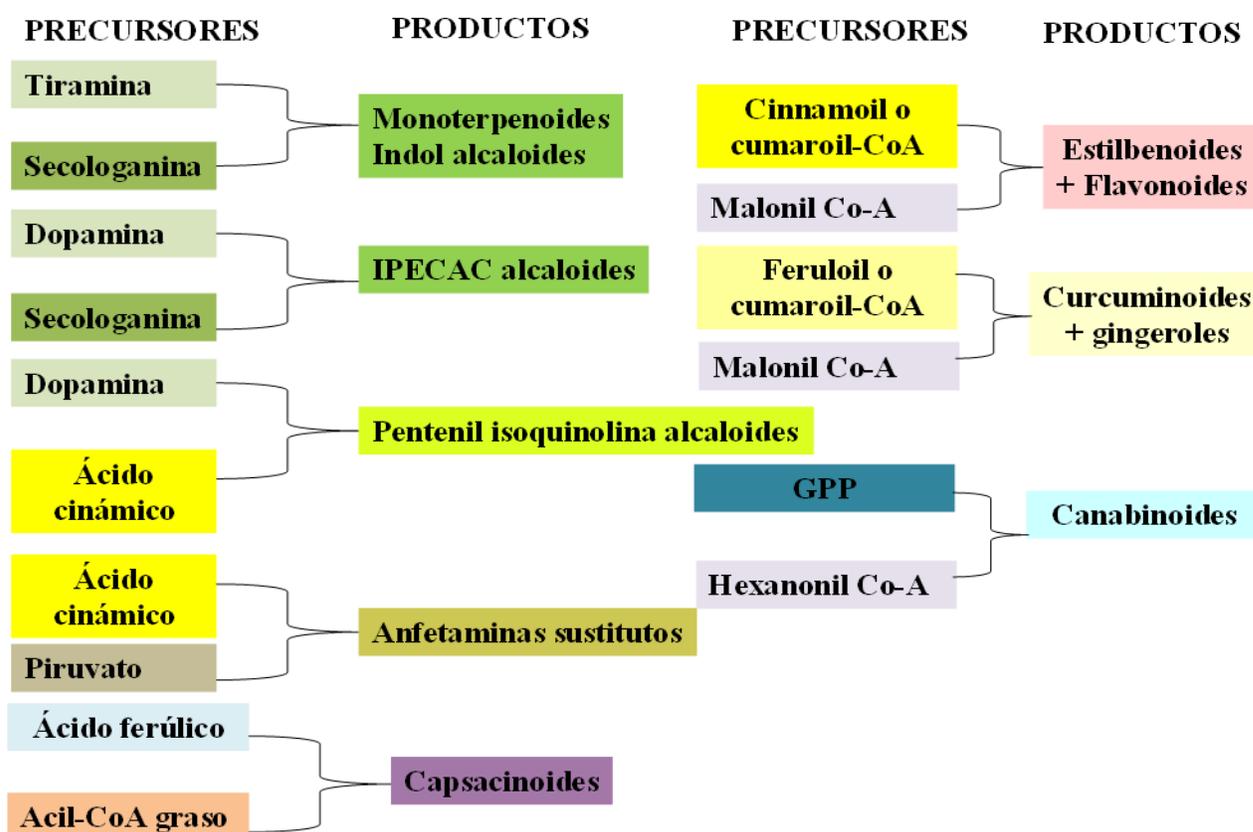


Figura 2. Interfaz de las vías metabólicas secundarias del alcaloide de las plantas con el metabolismo microbiano. *S. cerevisiae* se muestra como la posible especie huésped. Las reacciones y vías metabólicas secundarias de la planta (verde) se muestran vinculadas al metabolismo microbiano central (sombreado beige; fuente negra). Se muestran las enzimas de levadura (fuente negra). Abreviaturas: ruta AAA, ruta de aminoácidos aromáticos; Aro1, proteína aromática pentafuncional; Aro2, corismato sintasa y flavina reductasa; Aro3 + Aro4, isoenzimas de 3-desoxiD-arabino-heptuloso-7 fosfato (DAHP) sintasa; Aro7, corismato mutasa; E4P, eritrosa 4-fosfato; 4-HPAA, 4-hidroxifenilacetaldehído; PPP, vía pentosa fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; R5P, ribosa 5-fosfato; Ciclo TCA, ciclo del ácido tricarbóxico (Michael et al. 2019).

3.1.3 Fenilpropanoides y policétidos

Los fenilpropanoides representan una clase de más de 8,000 fenólicos vegetales derivados de tirosina y fenilalanina a través de la ruta del fenilpropanoide. El nombre fenilpropanoide se refiere a la estructura distintiva C6-C3 de los metabolitos dentro de esta vía. El

intermediario de punto de ramificación fenilpropanoide clave es p-cumaroil-CoA (Fig. 3), que forma la base de los flavonoides, estilbenoides, cumarinas, lignanos, catequinas y auronas. Además del esqueleto C6-C3, la ruta del fenilpropanoide también se desvía a nivel de ácido cinámico o ferúlico para producir una variedad de benzoatos C6-C1, como la vainillina, el benzaldehído y el ácido gálico. Aunque los estilbenoides y los flavonoides se originan a partir de la vía del fenilpropanoide, se alargan por las poliquétido sintasas vegetales (PKS) de tipo III, lo que subraya la naturaleza biosintética mixta de estos metabolitos especializados (Cuadro 1). Los PKS aceptan sustratos unidos a CoA, con mayor frecuencia p-coumaroyl-CoA, aunque el cinamoil y feruloil-CoA forman la base de algunos policétidos de fenilpropanoide, como la pinosilvin y la curcumina. Una vez cargados con una molécula iniciadora, los restos malonil-CoA se incorporan a la cadena de policétidos en crecimiento (Michael et al. 2019).



Cuadro 1. Metabolitos de origen biosintético mixto (Modificado de Michael *et al.* 2019).

Se pueden producir varias estructuras principales de policétidos diferentes, aunque las más específicas para la ingeniería metabólica son los andamios de naringenina chalcona y resveratrol, que dan lugar a las respectivas subclases de flavonoides y estilbenoides. Estos compuestos se funcionalizan en reacciones posteriores que incluyen hidroxilación aromática, reducción dependiente de NADP (NADPH), O-metilación y glicosilación. Los flavonoides por sí solos abarcan más de 6,000 productos naturales, incluidos chalcones, auronas, catequinas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides y antocianinas. A diferencia de los flavonoides y los estilbenoides, las cumarinas no son policétidos, ya que su estructura de anillo de lactona se deriva de la hidroxilación, isomerización y lactonización de ácidos fenólicos (ácido cinámico, p-cumarico, cafeico o ferúlico) o ésteres de acil-CoA fenólico (Michael *et al.* 2019).

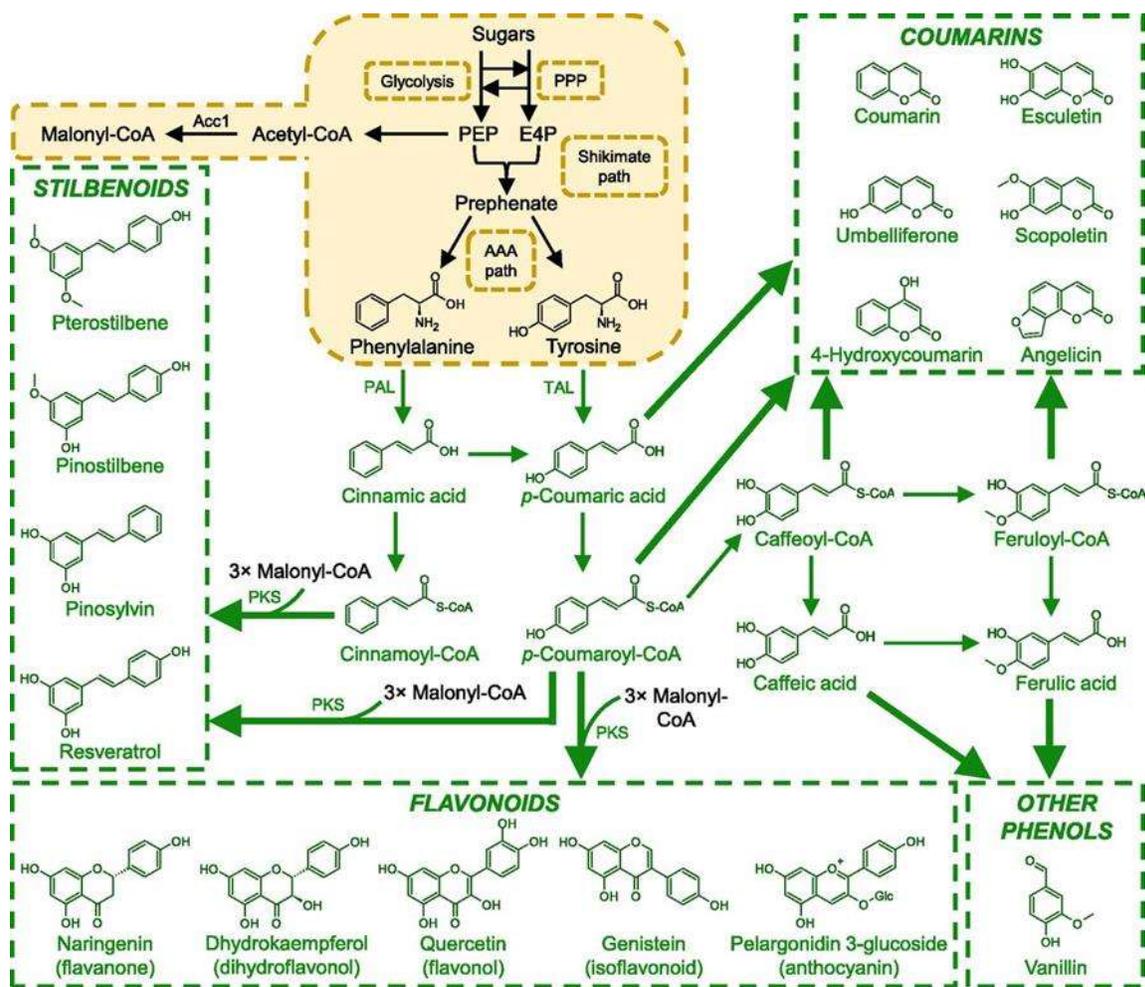


Figura 1. Interfaz de la planta con rutas metabólicas secundarias de fenilpropanoide y policétido con metabolismo microbiano. Se muestra una selección de rutas de plantas

naturales en un posible huésped de *S. cerevisiae*. Redes más extensas de rutas fenilpropanoides naturales y sintéticas se han mostrado previamente. Abreviaturas adicionales: Acc1, acetil-CoA carboxilasa; PAL, Phe amoniaco-liasa; PKS, policétido sintasa; TAL, Tyr amoniaco-liasa (Michael *et al.* 2019).

3.1.4 Composición química de la resina

La resina vegetal es una sustancia pegajosa e insoluble en agua que las plantas secretan principalmente para proteger tejidos lesionados, brotes jóvenes o brotes de hojas del ataque de herbívoros y / o patógenos. La resina es una mezcla químicamente compleja y altamente variable de muchos compuestos bioactivos, más de 300 sustancias (en su mayoría compuestos fenólicos, como flavonoides, ácidos carboxílicos aromáticos y benzopiranos y terpenoides). Los cuales muestran propiedades antimicrobianas y / o repelentes. La composición química de la resina es típicamente específica para cada especie de planta, pero puede variar mucho, tanto cualitativamente como cuantitativamente, dentro y entre las familias de plantas e incluso entre especies de plantas estrechamente relacionadas (Drescher, *et al.* 2019).

3.1.5 Compuestos Fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de MS que contiene un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos o polifenoles, debido a que derivan todas del fenol, el fenol es un compuesto formado por un anillo aromático y un grupo hidroxilo. Los compuestos fenólicos vegetales son un grupo químicamente heterogéneo de casi 10,000 compuestos individuales, algunos son solubles solo en solventes orgánicos, sin embargo otros son polímeros grandes y no son solubles (Taiz y Zeiger, 2002). Están conformados por ácidos fenólicos (conformados por una subunidad fenólica), flavonoides (conformados por dos subunidades fenólicas), taninos (conformados por tres o más subunidades fenólicas) entre otros (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013). Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger, 2002). La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de la eritrosa-4-P y del ácido fosfoenolpirúvico,

se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis del ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Además, presentan diversos efectos terapéuticos, como actividad antioxidante que se debe principalmente a la reactividad de su grupo fenol (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013).

3.1.6 Otros metabolitos secundarios (glucósidos)

Los glucósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de glucosa se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glucósidos:

3.1.6.1 Saponinas

Se conocen como glucósidos esteroideos, glucósidos esteroideos alcaloides o glucósidos triterpenos. Por lo tanto, son triterpenoides o esteroides que presentan una o más moléculas de glucosa en su estructura. Se pueden presentar como agluconas, es decir, sin la glucosa (terpeno sin la glucosa), se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (glucosa) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez-Urria 2009).

3.1.6.2 Glucósidos cardiacos

Son semejantes a las saponinas esteroideas, presentan propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glucósidos o de agluconas. Un miembro importante de este grupo es la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como tratamiento para la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

3.1.6.3 Glucósidos cianogénicos

Son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es dañada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Un ejemplo es la amigdalina que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Ávalos y Pérez-Urria 2009).

3.2 Actividad terapéutica de los compuestos naturales

Las plantas y árboles presentan compuestos naturales (compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos) con distintas actividades biológicas como: antioxidante, hipoglucemiante y citotóxica. A consecuencia de esto en algunos países asiáticos se han introducido en sus modelos de salud. Por otro lado, en México a partir de la última década se han iniciado investigaciones para evaluar el efecto terapéutico de plantas y árboles medicinales endémicos para el tratamiento de afecciones como diabetes mellitus, hipertensión, cáncer entre otros, lo que indica la importancia de los compuestos naturales con actividad biológica. Por ejemplo se identificó que las especies de *Psacalium decompositum*, *Columbrina elliptica*, *Agarista mexicana* presentaron actividad biológica para reducir los niveles de glucosa, lípidos y el estrés oxidativo presente en afecciones como la diabetes mellitus y la hipertensión (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013). Otro estudio en México se enfocó en cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de tres frutas de Yucatán (*Chrysophyllum cainito* L., *Anacardium occidentale* y *Anacardium occidentale*) y evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en los frutos, se concluyó que las tres frutas presentaron actividad antioxidante (Moo-Huchin *et al.*, 2015).

Por otro lado, hay diversos estudios en varias especies de árboles, por ejemplo el árbol de *Taxus brevifolia* de su corteza se aisló e identificó al paclitaxel utilizado como tratamiento para el cáncer de mama (Centelles, *et al.* 2010). Además, en la corteza y madera de otras especies de árboles (géneros de *Tabebuia* sp. y *Tecoma* sp.) se encuentra el lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), con actividades antitumorales, antibacterianas, antimaláricas y antifúngicas (López, *et al.* 2011).

Se ha reportado que la familia *Euphorbiaceae* ha demostrado una mayor presencia de compuestos fitoquímicos biológicamente activos, incluidos los flavonoides, terpenoides, glucósidos cardíacos, incluidos los taninos y saponinas que tienen un potencial más alto en la apoptosis y la permeabilidad de la membrana (Ahamad *et al.* 2019).

3.3 *Euphorbia tanquahuete* (*Euphorbia* *elástica*, *Euphorbia* *fulva* o *Euphorbiodendron* *fulvum*)

Es un árbol con crecimiento de arbusto, coloquialmente se le conoce como “Palo amarillo español, Palo de cucaracha español, Palo de sapo español, Palo mulato español, Pega hueso ND, Pega hueso español”. Se distribuye por varios estados de México entre ellos el Estado de México, Colima, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán de Ocampo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro de Arteaga, Zacatecas. Es un componente importante del bosque tropical caducifolio, penetran los encinares contiguos, matorrales y sitios perturbados. Además, crece en una altitud de 1800 a 2300 m, en suelos pedregosos, arenosos hasta arcillosos, neutros; se le encuentra en clima semiárido y cálido a subhúmedo. En sus ramas están recubiertas con resina, látex blanquecino; su corteza vistosa de color amarillo intenso. Además, presenta una típica flor con coloración amarillenta en un racimo compuesto (Fig. 4) (CONABIO, 2019).

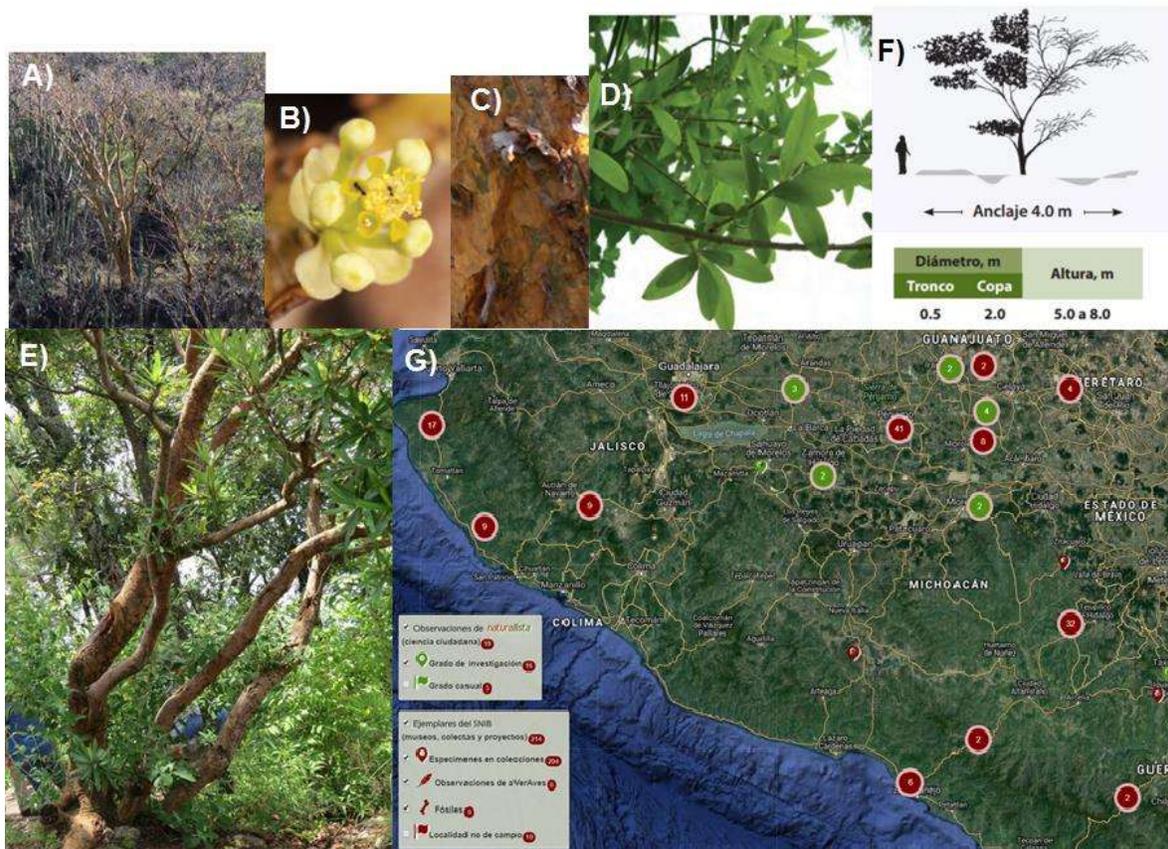


Figura 2.A) *Euphorbia tanquahuete* creciendo en condiciones naturales. B) Inflorescencia del árbol *Euphorbia tanquahuete*. C) Tallo. D) Hojas. E) Árbol en hábitad natural F) Crecimiento. G) Distribución geográfica (CONABIO, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

La población de la zona de tierra caliente del estado de Michoacán utiliza el árbol de *Euphorbia tanquahuete* como remedio tradicional en el tratamiento de diversas afecciones. Sin embargo, no hay estudios científicos que respalden el uso de este árbol como remedio natural y a su vez no presente efectos adversos en la salud de la población que los utiliza. Por lo tanto, el interés de este estudio fue evaluar el efecto tóxico presente en los distintos extractos de *Euphorbia tanquahuete* en el modelo biológico de *Artemia salina* y observar el efecto antioxidante de *Euphorbia tanquahuete* como remedio natural.

5. HIPÓTESIS

Los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete* presentan efecto tóxico en el modelo de *Artemia salina* y presentan efecto antioxidante debido a los compuestos fenólicos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la actividad citotóxica y antioxidante de los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete* y cuantificar el contenido de compuestos fenólicos.

6.2 Objetivos particulares

- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete*.
- Evaluar los niveles de toxicidad *in vivo* en el modelo de *Artemia salina* de los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete*.
- Determinación de la actividad antioxidante por captura de radicales libres de los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Las muestras vegetales (resina), utilizadas para la elaboración de los extractos a partir de la especie de madera *Euphorbia tanquahuete* (Árbol de pega hueso) que fueron utilizados en este estudio, se recolectaron de la región de San Lucas, Michoacán, México con coordenadas 18° 34' 37.02" N, 100° 47' 7.76" O.

Los crustáceos *Artemia salina* requeridos para los bioensayos *in vivo* utilizados en el presente estudio fueron analizados en el Laboratorio de Farmacología del IIQB a cargo del M.C Héctor Urquiza Marín profesor investigador y maestro titular del programa de la Licenciatura en Químico FÁrmacobiólogo de la Facultad de Químico FÁrmacobiólogo de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

7.2 Obtención de los extractos

El material vegetal (resina) se colocó en un sistema de refrigeración en obscuridad a una temperatura de 4°C. Para la obtención de los extractos éterico (ETE), hexánico (ETH), y clorofórmico (ETC), se pesaron en una balanza analítica (Precisa), 10 g de material vegetal y posteriormente se colocó en un dedal de extracción de celulosa para Soxhlet y se adicionaron 250 mL de solvente (MEYER) grado reactivo en un matraz bola Erlenmeyer, se montó el equipo de extracción Soxhlet y se inició la extracción a temperatura de ebullición del solvente de 4 h, repitiendo el proceso cuatro veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión. El extracto se concentró en un rotaevaporador (Heidolph) para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en un desecador hasta sequedad total. Los extractos secos se almacenaron en frasco ámbar hasta su utilización. Posteriormente para recuperar los extractos se diluyeron en 10 mL de su respectivo solvente, se llevó a sequedad en un vial ámbar con capacidad de 10 mL, se pesó y se obtuvo el rendimiento, se pesó 1 g de muestra y se adiciono 10 mL de cloroformo, 1 mL de agua y 5 mL de metanol, se recuperó la fase oleosa y se filtró con papel filtro Whatman de tamaño del poro de 11 µm. Para la evaluación del rendimiento de las extracciones con solventes en el proceso de soxhlet se utilizó la ecuación modificada de (Happel y Jordan, 1981).

7.3 Experimentos *in vitro*

7.3.1 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de metabolitos secundarios

Para la determinación inicial de los principios activos presentes en los extractos de resina de *Euphorbia tanquahuete* se realizó una prueba química de identificación. Las soluciones de los extractos se prepararon a diferentes concentraciones, disueltos en solventes orgánicos.

7.3.2 Cuantificación de fenoles

La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. El ácido gálico se empleó como estándar a una concentración de 0.010 a 5 mg/mL. Las absorbancias respectivas se midieron a 760 nm en un espectrofotómetro Thermo SCIENTIFIC, en el laboratorio de Microbiología de la madera del Edificio de Posgrado de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera a cargo del Dr. Crisanto Velázquez Becerra profesor investigador miembro del Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera. La concentración de fenoles totales se reportó como mg de mili equivalentes de ácido gálico/mL (Figura A1). Los valores equivalentes a μ moles de ácido gálico/g peso fresco de cada muestra serán obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$y = (0.379x) / 0.0631$$

$$x = \frac{y - 0.0631}{0.379}$$

Dónde:

y = absorbancia obtenida

x = μ moles de ácido gálico/g peso fresco

7.3.3 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de madera por el método de DPPH[•]

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó en base a la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) con base al método descrito por (Brand-Williams *et al.* 1995), con modificaciones para adaptarlo a nuestras condiciones. Las soluciones de los extractos se mezclaron con 1,000 µL de la solución metanólica de DPPH[•] 1 mM. Las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y la absorbencia se midió a 517 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18. Las diferencias en absorbencia entre la muestra y el control (DPPH[•] en etanol) se calcularon y expresaron como miliequivalentes de ácido gálico o del radical DPPH[•]. Se emplearon soluciones de ácido gálico como estándares de referencia. Curva de calibración.

7.4 Experimentos *in vivo*

7.4.1 Efecto tóxico de extractos de resina de *Euphorbia tanquahuete* por medio del cálculo de la concentración letal $_{50}$ en el modelo *A. salina*

Los ensayos de citotoxicidad regularmente son costosos, requieren disciplina, equipo sofisticado, recolección de sangre y personal de tiempo completo, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos que sean igual de sensibles pero que disminuyan los costos, el tiempo y la cantidad de muestra utilizada. El ensayo de letalidad en artemia también conocido como BSLT por sus siglas en inglés (Brine Shrimp Lethality Test) resulta una opción a esto. Este método es ampliamente utilizado para la detección de compuestos bioactivos en extractos crudos de plantas, aunque también se le ha empleado para determinar la toxicidad de algunos extractos de plantas, determinación de metales pesados, pesticidas, aditivos para comidas y algunas drogas. BSLT ha incrementado su uso debido a los bajos costos, alta sensibilidad para la detección de compuestos citotóxicos y el uso de cantidades menores de muestras comparado con otros métodos, además de que las larvas de artemia que se emplean para este ensayo son muy similares con una célula de mamífero, es rápido, simple y barato, por el uso de pequeñas cantidades de material para cada prueba (Mirzaei, *et al.* 2013).

7.4.2 Crecimiento de *Artemia salina*

Los quistes de *A. salina* se colocaron en agua salada (3% de sal san-Halita, especial para acuarios), a una temperatura de 25°C con una iluminación de aproximadamente 2000 lux en la superficie del agua y manteniendo una aireación constante que permitió mantener niveles de oxígeno por encima de 2 mg/L (Sorgeloos; *et al.* 1986). Después de 72 h el cultivo de artemia se encontró en la fase de nauplio (Fig. 5), las cuales fueron utilizadas para las pruebas.



Figura 3.Foto que ilustra la morfología de *A. salina*. 4x.

7.4.3 Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT

El intervalo de concentraciones adecuadas de los extractos para realizar el BSLT se determinó en un intervalo de concentración de 10-80 $\mu\text{g/mL}$. Los mejores resultados se obtuvieron a concentraciones de (30, 40, 50 y 70) $\mu\text{g/mL}$ en tiempos de 12 y 24 horas.

7.4.4 Determinación de DL_{50}

La dosis letal 50 (DL_{50}) se determinó con las artemias en fase de nauplio. Las larvas se colocaron en placas de 96 pocillos, 6 nauplios de *A. salina* por pozo, para cada extracto se utilizaron seis concentraciones (1, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$). El agua salada absoluta y otro con un volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) 1% se emplearon como controles, con la finalidad de descartar que el DMSO tuviera un efecto sobre el cálculo de la DL_{50} . La muerte de las larvas se determinó cada 12 horas por un período máximo de 24 horas. La DL_{50} se calculó por el método de regresión lineal seleccionando aquella R^2 con valores mayores o iguales a 0.8 y que presentará el 100% de sobrevivencia para las concentraciones más bajas y el 0% de sobrevivencia para aquellas concentraciones más altas. Se determinó la DL_{50} por medio

de regresión lineal la ecuación de la recta R^2 a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson:

$$r = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 \Sigma(y - \bar{y})^2}}$$

Coeficiente de R^2 (conocido y^- , conocido x^-)

Conocido y^- : Rango % supervivencia

Conocido x^- : Rango concentración

7.4.5 Análisis estadístico

- Los ensayos *in vitro* fueron determinados estadísticamente mediante ANOVA de una vía y una prueba de medias Tukey usando el programa GraphPad Prism 5 considerando $p < 0.05$ como probabilidad mínima aceptable para las diferencias entre medias.
- Para medir la toxicidad en *A. salina* se obtuvo por medio de regresión lineal graficando la ecuación de la recta R^2 , se realizó una curva de concentración-respuesta.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Experimentos *in vitro*

8.1.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FOLIN)

El porcentaje total de fenoles se determinó por el método de Folin-Ciocalteu el cual se expresó como equivalentes de ácido gálico en los extractos clorofórmico, hexánico y éterico de *Euphorbia tanquahuete* (Fig. 6). El ETH fue el que presentó mayor contenido fenólico (40.5 ± 4.31 mg de ácido gálico (EAG g^{-1})), el ETC obtuvo una concentración de 24.7 ± 7.6 mg de ácido gálico (EAG g^{-1}) por último el ETE con menor contenido de fenoles (19.4 ± 2.3 mg de ácido gálico (EAG g^{-1})). La cuantificación de compuestos fenólicos totales de los distintos extractos de *E. tanquahuete* se considera distinto, debido a la naturaleza de los solventes utilizados para este estudio, por ejemplo, para la extracción de compuestos polares o hidrofílicos se utilizan solventes polares como metanol, etanol o acetato de etilo. Sin embargo, si se desean extraer compuestos apolares o lipofílicos, se utilizan solventes apolares como diclorometano y hexano, o en mezcla con metanol a una proporción 1:1 para extraer tanto compuestos polares como apolares, sin embargo, los solventes de polaridad intermedia como el cloroformo; y el acetato de etilo pueden extraer los mismos compuestos que la mezcla de diclorometano: metanol (1:1) (Sasidharan, *et al.* 2010)

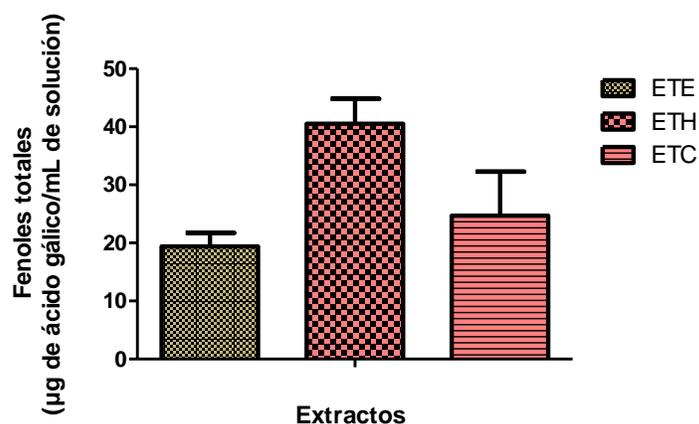


Figura 4. Contenido total de fenoles de los extractos de *E. tanquahuete*. El ácido gálico fue usado como estándar para medir el contenido fenólico total. Cada valor es expresado con la media \pm EE (n=3). Extracto de éter de *E. tanquahuete* (ETE), extracto de hexano de *E. tanquahuete* (ETH) y extracto de cloroformo de *E. tanquahuete* (ETC). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey.

8.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

En la prueba por DPPH, se basa en evaluar la actividad antioxidante de los extractos (ETE, ETH y ETC) para neutralizar o reducir el radical DPPH. En base al método descrito por, (Brand-Williams *et al.* 1995). Se observó una capacidad similar para reducir el radical DPPH, sin embargo, el extracto de ETH presentó una diferencia estadística significativa para reducir este radical en comparación con el ETC (0.473 ± 0.015 y 0.433 ± 0.002 μM TROLOX mL^{-1} , respectivamente) (Fig., 7). Estos resultados se deben a que la presencia de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, polifenoles, flavonoides y taninos) reducen a los radical libre, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno debido a su capacidad de donar un átomo de hidrógeno (Msaada *et al.*, 2017). Sin embargo, se puede atribuir un efecto sinérgico de entre los compuestos fenólicos y terpenos presentes en los extractos utilizados para reducir el radical DPPH debido a que la naturaleza de los solventes utilizados también extrae compuestos terpénicos. Estos últimos presentan actividad antioxidante debido a que los radicales libres (DPPH) toman un hidrógeno de las insaturaciones presentes en sus cadenas hidrocarbonadas (Gonzalez-Burgos, *et al.* 2012).

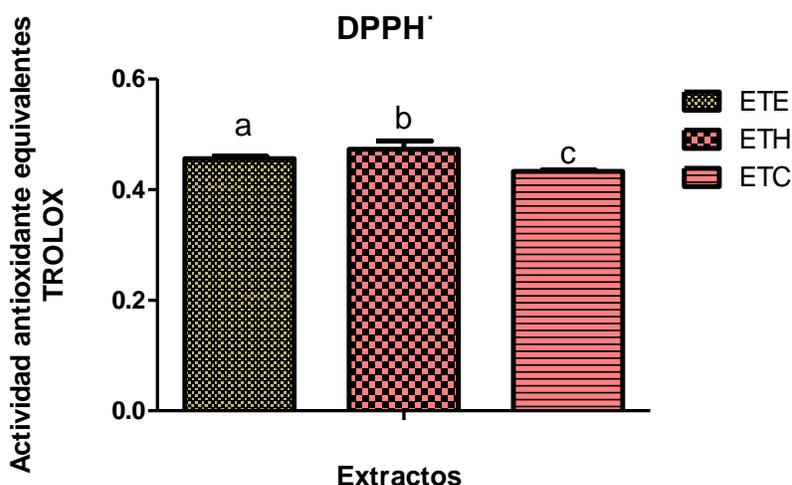


Figura 5. Capacidad antioxidante para la eliminación del radical DPPH \cdot de los extractos de *E. tanquahuete*. El trolox fue usado como estándar para medir la capacidad reductora del radical DPPH \cdot en equivalentes μ M trolox. Cada valor es expresado con la media \pm EE (n=3). Extracto de éter de *E. tanquahuete* (ETE), extracto de hexano de *E. tanquahuete* (ETH) y extracto de cloroformo de *E. tanquahuete* (ETC). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. ^{bc}p<0.05 (ETH vs ETC)

8.2 Experimentos *in vivo*

8.2.1 Efecto tóxico de los extractos de *E. tanquahuete* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina*

En el ensayo de supervivencia para el modelo de *A. salina* utilizado como prueba alternativa para determinar la toxicidad de los productos químicos y naturales por medio del cálculo de la DL₅₀. Para este ensayo se determinó la DL₅₀ por el método de regresión lineal seleccionando aquella R² con valores mayores o iguales a 0.9 y que presentará el 100% de sobrevivencia para las concentraciones más bajas y el 0% de sobrevivencia para aquellas concentraciones más altas, en donde el extracto ETE y ETH obtuvieron una supervivencia del 50% a 60 μ g/mL y para el extracto ETC fue de 40 μ g/mL (Fig. 8, 9 y 10). Se puede atribuir mayor toxicidad de ETC debido a la presencia de fenoles simples y terpenos capaces de generar toxicidad aguda en *A. salina* donde se requirió menor dosis (Renukadevi, *et al.* 2011). El aumento de la mortalidad es proporcional al aumento de la concentración, lo que proporciona una linealidad en la relación dosis-efecto de cada extracto y la determinación del valor de DL₅₀, una sustancia orgánica ecotoxicológica en este modelo se considera bajo la concentración de 40-160 g/l después de 24 horas de exposición y 10-160 g/l después de 48 horas de exposición, respectivamente. (Lagarto, *et al.* 2001), (Lu, 2018).

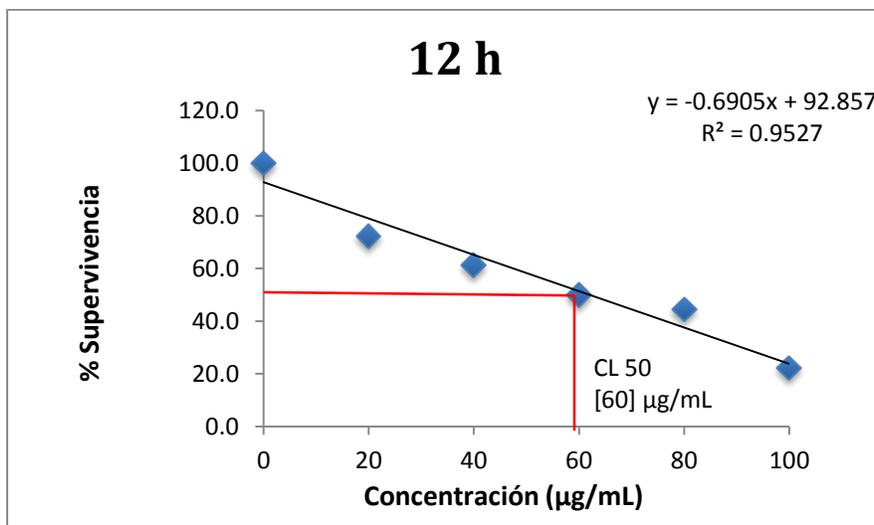


Figura 6. Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 12 h, a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL del extracto de ETE. En esta grafica se observa una pequeña disminución en la cantidad de *A. salina* presentes en el medio lo cual ha sido generado por la concentración de los extractos de *E. tanquahuete*.

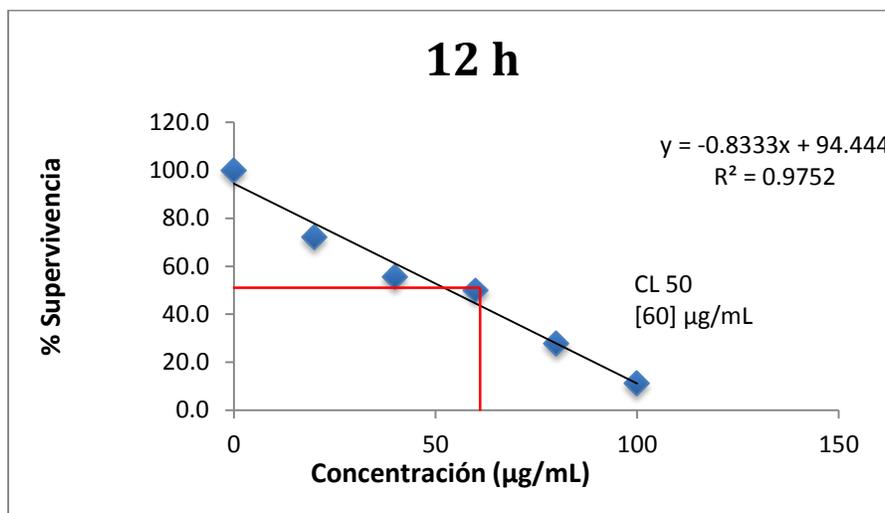


Figura 7. Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 12 h frente a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL del extracto de ETH. Transcurridas 12 h de iniciada la prueba se observa un mayor deceso de las *A. salina*.

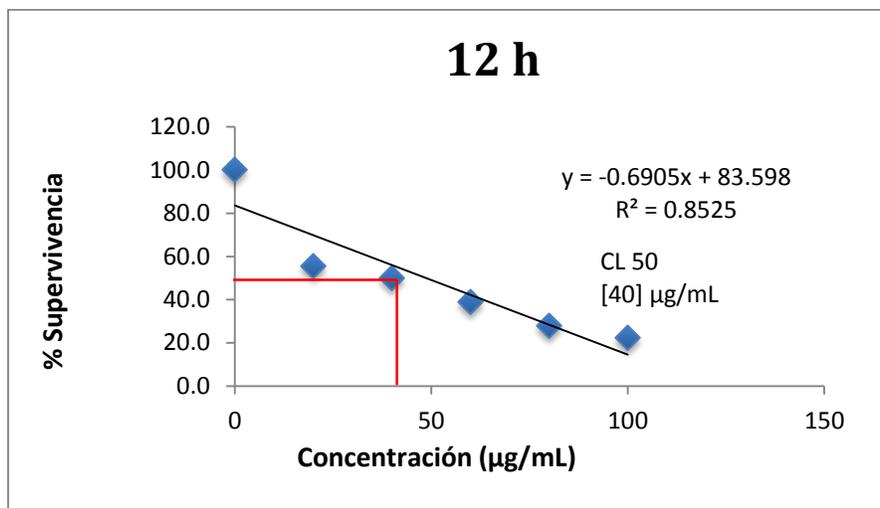


Figura 8. Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 12 h frente a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL del extracto de ETC. Tras 24 h transcurridas de observo un total deceso de *A. salina*.

9 CONCLUSIÓN

Los extractos clorofórmicos, hexánico y éterico de *E. tanquahuete* presentaron actividad tóxica en *A. salina*; además poseen actividad antioxidante al ser capaces de neutralizar el radical DPPH., esta actividad biológica se debe a la presencia de compuestos fenólicos.

10 REFERENCIAS CITADAS

- 1 Ahamad, B., Islam, A., Khan, A., Khan, M. A., ul Haq, I., jafri, L., Ullah, N. (2019). Comprehensive investigations on anti-leishmanial potentials of *Euphorbia wallichii* root extract and its effects on membrane permeability and apoptosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.007
- 2 Ávalos A. y Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145
- 3 Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity LWT - *Food Science and Technology* 28(1):25–30.
- 4 Cánovas Francisco M., Cañas Rafael A., de la Torre Fernando N., Pascual María Belén, Castro-Rodríguez Vanessa, Avila Concepción. (2018). Nitrogen Metabolism and Biomass Production in Forest Trees. *Frontiers in Plant Science*. 9 (2) doi: 10.3389/fpls.2018.01449.ISSN.1664-462X
- 5 Centelles, J. J. & Imperial, S. (2010). Paclitaxel. Descubrimiento, Propiedades y Uso Clínico. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 29(4), 69-75.
- 6 Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2019). Disponible en: <http://enciclovida.mx/especies/149820>
- 7 Drescher, N., Klein, A. M., Schmitt, T., & Leonhardt, S. D. (2019). A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 14(2), e0210594. doi: 10.1371/journal.pone.0210594
- 8 Esquivel-Gutiérrez E. R., Noriega-Cisneros R., Saavedra-Molina A. y Salgado-Garciglia R. (2013). Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties. *PharmacologyOnline Newsletter* 2: 15-23.
- 9 Ingle, K., Padole, D., Khelurkar, V.C. (2019). Secondary Metabolites for Plant Growth Promotion and Plant Protection. *Advances in Life Sciences* 5(23), Print: ISSN 2278-3849, 10888-10891, 2016
- 10 Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I., Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to

- determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400. doi:10.1078/0944-7113-00044
- 11 López, L. I., Leyva, E. & García de la Cruz, R. F. (2011). Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(1), 6-17. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57918590002>
- 12 López-Carreras N, Miguel M. y Aleixandre A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. clín. diet. hosp.* 32(3): 81-91
- 13 Lu, Y., Yu, J. (2018). *Artemia* spp. Model - A Well-Established Method for Rapidly Assessing the Toxicity on an Environmental Perspective. *Medical Research Archives*. (6)2, 2-15.
- 14 Michael E. Pyne, Lauren Narcross, Vincent J.J. Martin. (2019). Engineering Plant Secondary Metabolism in Microbial Systems. *Plant Physiology*. 179 (3) 844-861; doi: 10.1104/pp.18.01291
- 15 Mirzaei A., Mirzaei N. y Ghavamizadeh M. (2013). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: A Brine Shrimp Lethality Test. *Life Science Journal* 10(12). pp: 8-12
- 16 Moo-Huchin V. M., Moo-Huchin M. I., Estrada R. J., Cuevas-Glory L., Estrada I., Ortiz-Vázquez E., Betancur D. y Sauri E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 166 (2015): 17-22
- 17 Msaada K., Jemia M. B., Salem N., Bachrouch O., Sriti J., Tammar S., Bettaieb I., Jabri I., Kefi S., Limam F. y Marzouck B. (2017). Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry* 10(2): 3176-3183
- 18 Renukadevi, K. P., & Sultana, S. S. (2011). Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-h69. *Int J Pharmacol*, 7, 356-362.
- 19 Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. (2010). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1). doi:10.4314/ajtcam. v8i1.60483

- 20 Sorgeloos P., Lavens P., Lé P., Tackaert W. y Versichele D. (1986). Manual para el Cultivo y Uso de Artemia en Acuicultura. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia
- 21 Taiz L. y Zeiger E. (2002). Plant Physiology. *Sunderland: Sinauer* 3ª edición.
- 22 Yang, Li., Wen, Kui-Shan., Ruan, Xiao., Zhao, Ying-Xian., Wei, Feng., Wang, Qiang. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*. (23) 762 doi:10.3390/molecules23040762