



Universidad Nacional Autónoma de  
México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Investigación Biomédica de Productos Naturales

Evaluación de las propiedades biomédicas de *Chenopodium murale* L.  
relacionadas al proceso de cicatrización

Que presenta:

José Antonio Cordero Torres

TESIS

que para obtener el título de:

BIOLÓGO

Director de Tesis

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, agosto de 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme, darme la oportunidad de conocer personas increíbles, crecer como persona y formarme como profesional.

A mi director de tesis Marco Aurelio Rodríguez Monroy por la oportunidad de permitirme unirme al equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación Biomédica de Productos naturales, así como apoyar y corregir el proyecto que tenía en mente durante varios años. Agradezco las charlas, las enseñanzas y consejos de su parte que me animaron a seguir adelante en mi formación como científico.

A la Doctora Margarita Canales por sus enseñanzas desde inicios, durante y al final de la carrera, así también el permitirme formar parte del grupo de trabajo del laboratorio de Farmacognosia, además de darme las facilidades para realizar una parte de los experimentos, a de las explicaciones, consejos y risas dentro de este periodo tiempo que sin duda disfrute. Po ultimo agradecer la revisión de éste trabajo que tuvo un progreso notable a partir de éstas.

A la Doctora Ana Hernández por acogerme en el laboratorio de Farmacognosia, a las pláticas en el día a día, al apoyo en cada experimento realizado ahí. Agradecer también el haber tenido la atención de corregir este trabajo.

A la Doctora Judith Salas por la revisión de este trabajo.

Al Maestro en Ciencias Luis Barbo por tener el tiempo de revisar y corregir este trabajo.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Farmacognosia que dentro de mi estancia ahí me apoyaron para la realización de este trabajo, así también agradezco los consejos y vivencias compartidas.

A los compañeros del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, que a pesar de no pasar tanto tiempo juntos me hicieron sentir parte del grupo de trabajo con su atención, apoyo y amabilidad, gracias en verdad.

A la M. en C. Daniela Balderas, por todo su increíble apoyo en la realización de este trabajo.

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), IN204821 y IN205020.

## **Dedicatorias**

A mis padres, que siempre me han apoyado en todo lo que me he propuesto, desde decidir estudiar Biología hasta concluir la carrera y que además me han brindado un amor incondicional, así como los medios para poder crecer como persona y como profesional. Gracias por todo, no hay palabras ni acciones para agradecerse los, no suelo decirlo, pero los amo desde el fondo de mi corazón.

A mis abuelos que siempre me han brindado un lugar para descansar de mis problemas, me han despertado en mí el interés por la naturaleza, han compartido sus historias reconfortantes, una me han dado una comida caliente, Agráceles que de tantas pláticas que hemos tenido éste proyecto nació bajo sus enseñanzas y conocimientos de los remedios naturales usados en casa. Gracias Mama nena, Gracias Papá Cruz este proyecto nació por ustedes.

A los amigos que me han acompañado a lo largo de la carrera, Abraham, Emmanuel, Montse, Diana, Vale y Cinthi, Marinita e Itzel, su apoyo ha sido indispensable para mi crecimiento personal, no hay palabras para agradecer que me hayan acompañado en cada momento de felicidad, tristeza, incertidumbre y miedo.

A los profesores de la carrera, por brindarme parte de sus conocimientos, guiarme para ser un mejor profesional, a ser mi mayor crítico y siempre tratar de superar las expectativas impuestas en uno mismo.

<b>Índice de contenidos</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>La piel</b> .....	8
<b>Fases de la cicatrización</b> .....	8
<b>Fármacos usados en la cicatrización de heridas</b> .....	10
<b>Productos naturales</b> .....	11
<b>Plantas medicinales</b> .....	12
<b>Propiedades biomédicas</b> .....	12
<b>Compuestos fenólicos</b> .....	13
<b>Flavonoides</b> .....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	16
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	17
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	17
<b>METODOLOGÍA</b> .....	18
<b>Obtención del material biológico</b> .....	18
<b>Obtención del extracto</b> .....	18
<b>Evaluación de la toxicidad tópica aguda</b> .....	19
<b>Caracterización fitoquímica</b> .....	19
<b>Pruebas cualitativas</b> .....	20
<b>Capacidad antioxidante</b> .....	20
<b>Cuantificación de Fenoles</b> .....	20
<b>Cuantificación de Flavonoides</b> .....	20
<b>Actividades biológicas</b> .....	21
<b>1. Actividad antibacteriana</b> .....	21
<b>2. Actividad antifúngica</b> .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	22
<b>Rendimiento del extracto</b> .....	22
<b>Toxicidad tópica aguda</b> .....	22
<b>Histología</b> .....	23
<b>Capacidad antioxidante</b> .....	27

a) Pruebas cualitativas .....	27
b) Caracterización fitoquímica.....	27
c) Cuantificación de Fenoles totales.....	28
d) Cuantificación de flavonoides .....	28
e) Capacidad antioxidante media A <sub>50</sub> .....	29
Evaluación de la capacidad antibacteriana.....	29
a) Difusión en agar de Kirby-Baüer .....	29
b) Microtécnica de dilución en caldo .....	33
C) Efecto del extracto en el crecimiento bacteriano.....	33
Actividad antifúngica.....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	43
LITERATURA CITADA .....	44

### Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de un compuesto fenólico.....	13
<b>Figura 2.</b> Estructura general de un flavonoide.....	15
<b>Figura 3.</b> Mapa del Estado de México.....	18
<b>Figura 4.</b> Cromatograma del análisis por HPLC-DAD (280 nm) del extracto metanólico de <i>C. murale</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Capacidad antioxidante del extracto metanólico .....	29
<b>Figura 6.</b> Halos de inhibición del extracto y el control positivo en bacterias, Gram positivas y negativas.....	31
<b>Figura 7.</b> Prueba cualitativa de capacidad antibacteriana.....	32
<b>Figura 8.</b> Evaluación cuantitativa de la inhibición bacterian. ....	33
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento bacteriano de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33592.....	34
<b>Figura 10.</b> Halos de inhibición del extracto y el control positivo sobre diferentes cepas del género <i>Candida</i> (mm).....	35

<b>Figura 11.</b> <i>Chenopodium murale</i> L. ....	53
<b>Figura 12.</b> Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 1. ....	57
<b>Figura 13.</b> Espectro de luz ultravioleta del ácido fenólico encontrado número 2. ....	58
<b>Figura 14.</b> Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 3. ....	58
<b>Figura 15.</b> Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 4. ....	59
<b>Figura 16.</b> Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 5. ....	59
<b>Figura 17.</b> Espectro de luz ultravioleta de quercetina. ....	60
<b>Figura 18.</b> Curva patrón de ácido gálico .....	64
<b>Figura 19.</b> Curva patrón de la concentración de flavonoides .....	68

### Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Registro fotográfico del ensayo de toxicidad tóxica aguda.....	24
<b>Cuadro 2.</b> Registro fotográfico del ensayo de toxicidad tóxica aguda.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Microfotografías del ensayo de toxicidad tóxica aguda. ....	26
<b>Cuadro 4.</b> Pruebas colorimétricas para la presencia de fenoles y flavonoides.....	27
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos encontrados en extracto metanólico a través de HPLC-DAD .....	27
<b>Cuadro 6.</b> Halos de inhibición del extracto y control positivo (mm),en bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	30
<b>Cuadro 7.</b> Diámetro de los halos de inhibición del extracto sobre hongos levaduriformes (mm). ....	34
<b>Cuadro 8.</b> Técnica histológica.....	55
<b>Cuadro 9.</b> Cantidades necesarias para preparar curva de calibración de ácido gálico. ....	63
<b>Cuadro 10.</b> Cantidades necesarias para preparar la curva patrón de quercetina. ....	65

## **Índice de apéndices**

<b>Apéndice 1.</b> Descripción de la especie <sup>(78)</sup> .....	53
<b>Apéndice 2.</b> Técnica histológica ordinaria.....	54
<b>Apéndice 3.</b> Caracterización fitoquímica por medio de HPLC-DAD <sup>(79, 80)</sup> .....	57
<b>Apéndice 4.</b> Capacidad antioxidante evaluada por el método de reducción del radical 2,2 dinefil-1-picrilhidracil (DPPH) <sup>(81)</sup> .....	61
<b>Apéndice 5.</b> Cuantificación de fenoles totales <sup>(39)</sup> .....	62
<b>Apéndice 6.</b> Cuantificación de flavonoides <sup>(40)</sup> .....	65
<b>Apéndice 7.</b> Método de difusión en agar Kirby-Baüer <sup>(41)</sup> .....	69
<b>Apéndice 8.</b> Microtécnica de dilución en caldo <sup>(41)</sup> .....	71
<b>Apéndice 9.</b> Efecto del extracto en el crecimiento bacteriano <sup>(41)</sup> .....	73



## RESUMEN

Existen productos que favorecen al proceso de cicatrización, disminuyendo el tiempo del proceso, algunos de estos pueden tener efectos secundarios en la piel, además de ser de difícil acceso a la mayoría de la población. Se han reportado diversos estudios que apoyan el uso de productos naturales como alternativa, donde se ha encontrado que poseen propiedades biomédicas como son la capacidad antibacteriana, antifúngica, antioxidante además no presentan signos de toxicidad aguda. El objetivo general de este estudio fue evaluar las propiedades biomédicas antes mencionadas y poder determinar si el extracto metanólico de *C. murale* tiene la capacidad de ser una alternativa a los fármacos usados en el tratamiento de una herida.

El análisis de HPLC-DAD identificó la presencia de quercetina, así como siete compuestos no identificados. Por otra parte, la concentración de fenoles totales fue de 36 mg eAG/ g de extracto; la cantidad de flavonoides fue de 6.15 mg eQ/ g de extracto y por último su capacidad antioxidante media, a través del método de reducción del radical DPPH y donde la reducción del 50% del radical se calculó a 741.83 µg/ mL. El extracto tuvo actividad inhibitoria en bacterias Gram positivas y negativas, *S. epidermidis* y *E. coli* fueron las más susceptibles. Para complementar los datos se llevaron a cabo pruebas cuantitativas, donde se registró inhibición en *S. aureus* teniendo una CMI de 20 mg/mL y CBM de 40 mg/mL. También se evaluó el efecto que tendría el extracto en la curva de crecimiento de *S. aureus*, dando como resultado un efecto bacteriostático. Por último, el ensayo de toxicidad dérmica aguda propuesto por la OECD, dio como resultado que el extracto no presentó ocasionar signos de toxicidad aguda. Con estos resultados se concluyó que el extracto metanólico de *C. murale* tiene propiedades biomédicas que pueden favorecer al proceso de cicatrización.

**Palabras clave:** *Chenopodium murale*, productos naturales, plantas medicinales, cicatrización.

## ABSTRACT

Some products that further the wound healing process, decreasing the process time, but these can have secondary effects on the skin, besides being challenging to have access to most of the population, therefore in this work proposes the use of products of natural origin in an alternative way to the commercial products. It has been reported that enough studies support the use of natural products as an alternative; it has been found that they possess biomedical properties such as the antibacterial capacity, antioxidant capacity, antifungal capacity, and no acute toxicity signs. The general objective of this study was evaluating the biomedical properties, mentioned above and determine if *C. murale* extract has the capacity to be an alternative to the drugs used in wound healing.

The analysis by HPLC-DAD identified the presence of quercetin, as well as seven unidentified compounds. On the other hand, the antioxidant capacity was evaluated to determine the concentration of total phenolic content and was 36 AGe/ extract grams. The number of flavonoids, which was 6.15 mg Qe/ extract grams and finally it is medium antioxidant capacity, through by DPPH radical reduction method. The extract has and where the reduction of the 50% radical was calculated at 741.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The extract has inhibitory activity in Gram negative and positive bacteria, *S. epidermidis* and *E. coli* were the most susceptible. To complete the data, were made quantitative test, where *S. aureus* inhibition was registered, having MIC of 20 mg/mL and MBC of 40 mg/mL. Furthermore, the effect of the extract in the growth curve of *S. aureus* was evaluated, resulting in bacteriostatic effect. By last, the acute dermic toxicity assay proposed by OECD, resulted in the extract showed no signs of acute toxicity. With this result it was concluded that methanolic extract of *C. murale* has biomedical properties which further the wound healing process.

**Key words:** *Chenopodium murale*, natural products, medicinal plants, wound healing.

## **INTRODUCCIÓN**

### **La piel**

La piel es el órgano más grande y por tanto el más susceptible a sufrir heridas, debido a sus funciones es importante mantenerla en el mejor estado. Este órgano tiene por función ser la primera defensa física ante factores externos y agentes patógenos. Otras de sus funciones son termoregular, evitar pérdidas hídricas y protección contra los rayos UV. La piel es una capa fibroelástica que está constituida principalmente de dos capas: La epidermis y la dermis <sup>(1)</sup>.

La epidermis es la capa más externa, constituida por un tejido epitelial estratificado queratinizado y tiene principalmente cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. Mientras que la dermis es la capa intermedia de la piel ésta se constituye de tejido conectivo, fibras elásticas y colágeno, principalmente de tipo I y III, además de esto también hay una cantidad considerable de sustancia acelular amorfa. En esta capa de la piel se encuentran fibroblastos y células relacionadas al sistema inmunológico <sup>(1)</sup>.

La piel puede sufrir diferentes lesiones causadas por múltiples factores, desde infecciones por virus hasta cortes o pérdidas parciales del tejido cutáneo, éstas se clasifican en primarias y secundarias siendo las primarias las que presentan cambios en la piel sana, mientras que las secundarias son causadas por factores externos al cuerpo. Dentro las lesiones secundarias las laceraciones o úlceras son las más propensas a ocurrir, y las cuales pueden presentar repercusiones en la calidad de vida de las personas, además de ser las más propensas a no regresar a su aspecto común <sup>(2)</sup>. El proceso de reparación de una herida, mediante un complejo proceso de división, movimiento y síntesis proteica celular, que da como resultado el remplazo del tejido perdido por uno nuevo es llamado cicatrización y consta de tres fases <sup>(3)</sup>.

### **Fases de la cicatrización**

- 1) Fase inflamatoria: En esta fase hay una interrupción de vasos sanguíneos con la consiguiente extravasación de plasma, células sanguíneas y otros factores hacia el

intersticio, se forma un coágulo o también llamado tapón homeostático, posterior a esto comienza la integración de plaquetas. Donde éstas después de unirse son activadas por la trombina y el colágeno fibrilar expuesto. En esta fase la actividad de los neutrófilos que serán sustituidos posteriormente por monocitos, que serán estimulados por factores quimiotácticos, para iniciar la fagocitosis <sup>(3)</sup>.

2) Fase proliferativa: Esta fase está dividida en otras 4 fases:

- a) Fibroplasia: Los fibroblastos llegan al sitio de la herida desde el músculo, tendón y fascia entre las 48 y 72 horas posteriores a la herida. Después de esto, migran a través de movimientos activos en una matriz de fibronectina y en esta matriz se genera un molde para las fibrillas de colágeno.
- b) Angiogénesis: Este proceso ocurre al mismo tiempo que la Fibroplasia donde los vasos cercanos a la herida emiten yemas capilares, en cuyo extremo se encuentran las células endoteliales, que posteriormente migraran al espacio perivascular, formándose así nuevos vasos sanguíneos.
- c) Reepitelización: En esta fase los queratinocitos migran desde los bordes de la herida o desde los anexos remanentes con el fin de restablecer la barrera cutánea.
- d) Contracción de la herida: En esta fase los fibroblastos que han ido cambiando a través del proceso y que han sido de utilidad para la regeneración, cambian a un estado llamado miofibroblasto el cual ayuda a la unión célula-célula dado a que es rico en microfilamentos de actina.

3) Remodelación tisular: Esta fase comienza desde que la fibroplasia sucede, donde los fibroblastos que han producido diversas sustancias como la fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágenos que tienen papeles importantes en este proceso, debido a que son la base para la migración celular y el soporte tisular, comienzan a desaparecer por acción de proteasas y hialuronasas. Posterior a este proceso el colágeno será sustituido por nuevas variedades de éste llegando a tener 70% de resistencia máxima, comparada con el tejido sano <sup>(3)</sup>.

## **Fármacos usados en la cicatrización de heridas**

El uso de diversos fármacos en el proceso de recuperación de una herida está relacionado a distintas tareas que se deben cubrir, así como la herida en cuestión. Uno de los grupos de fármacos más empleados en la cicatrización son los corticosteroides, los cuales tienen diversos efectos, entre ellos destacan su capacidad para disminuir la respuesta inflamatoria, disminuyendo la agregación plaquetaria en el sitio, sin embargo también presentan efectos secundarios adversos entre los que destacan la baja producción de colágeno, disminuyendo la proliferación de fibroblastos. Asimismo, se ha encontrado que en dosis altas los corticosteroides no tienen efectos clínicos considerables, pero si son usados de manera crónica pueden afectar al proceso de cicatrización <sup>(4,5)</sup>.

Otro fármaco usado comúnmente es la pentoxifilina, ya que es un fármaco de amplio margen de acción, actúa de manera similar a los corticosteroides, disminuyendo la viscosidad de la sangre y evitando la agregación plaquetaria. Además, cumple un gran espectro de tareas como lo es la inhibición del factor necrótico tumoral  $\alpha$ , la interrupción en la producción de interleucina 1 y 6, además de evitar la activación de linfocitos T y B entre otros efectos secundarios <sup>(6)</sup>.

En las heridas de la piel se suelen usar fármacos para evitar infecciones por bacterias, dentro de los que destacan los antimicrobianos hechos a base de yodo y plata, siendo los últimos los más usados como la Sulfadiazina de plata, Estos últimos tienen diversos mecanismos de acción que atacan a distintos niveles celulares siendo la membrana celular el principal objetivo <sup>(7)</sup>.

Se sabe que los fármacos que son empleados para ayudar al proceso de cicatrización deben ser capaces de contrarrestar a los organismos que puedan llegar a causar algún tipo de infección al momento que el proceso de cicatrización es llevado a cabo, pero en algunos como la Sulfadiazina tiene niveles de toxicidad altos que con un uso continuo tiende a deteriorar o detener el proceso de reformación tisular <sup>(8)</sup>.

Es importante resaltar que, a pesar de la existencia de fármacos para la cicatrización de heridas, algunos como los anteriormente mencionados presentan efectos secundarios nocivos

además de tener un solo blanco de acción y que por tanto conlleva al uso de más de uno de estos para así tener un tratamiento completo, con lo cual vuelve inaccesible los tratamientos de recuperación para un segmento de la población, para ello se buscan alternativas que cumplan la función de dichos medicamentos, una alternativa que ha demostrado su eficacia en pruebas preclínicas son los productos naturales <sup>(6, 7, 8)</sup>.

## **Productos naturales**

Dentro de la gran diversidad de beneficios que ofrece la naturaleza, los productos naturales son un recurso invaluable que ha sido usado durante bastante tiempo en las sociedades humanas. Se considera que el uso de este término se remite a principios del siglo XIX. A su vez se entiende como productos naturales a diferentes materiales o sustancias que son producidos por un algún organismo vivo, entre ellos los de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico <sup>(9)</sup>.

Existen productos naturales que destacan por sus propiedades medicinales, y que han sido utilizados en la medicina tradicional. Entre los beneficios que ofrecen se encuentra la capacidad de ser un antiinflamatorios y analgésicos naturales, y dentro de este rubro existen algunos que logran disminuir el tiempo que es necesario para que una herida cicatrice <sup>(10)</sup>.

En relación con los productos naturales obtenidos de fuentes vegetales existe una gran variedad que considerar, algunos de estos que pueden destacar por su capacidad cicatrizante es el látex de distintas plantas como lo son *Jatropha curcas* y *J. neopauciflora* donde se reconoció que estas especies mexicanas de la familia Euphorbiaceae son buenos cicatrizantes en modelos murinos además la segunda especie mencionada aumenta la resistencia del tejido posterior a la cicatrización de las heridas <sup>(11, 12)</sup>.

Otro de los productos obtenidos de las plantas que destacan son los extractos que tienden a presentar actividades biomédicas particulares, entre ellas, propiedades antibacterianas, antifúngicas, hipoglicemiantes, antioxidantes, anticancerígenas, inmunoreguladoras, un ejemplo de la amplia variedad de beneficios que estos pueden llegar a tener es el caso del

extracto metanólico de la *Yucca aloifolia* el cual presenta actividad antibacteriana y fungicida comparable con fármacos estandarizados, esto por mencionar uno de muchos ejemplos que existen <sup>(13)</sup>.

Es por eso por lo que durante muchos años este tipo de productos han sido utilizados en la medicina tradicional para resolver problemas de salud, y que hoy representan una opción factible para muchas personas como la medicina en primer contacto cuando presentan alguna enfermedad o malestar, siendo esto destacable en los sectores menos desarrollados de la población mexicana. Considerando lo antes mencionado, es importante valorarlos como una fuente de investigación que puede generar resultados destacables o equiparables con los obtenidos por fármacos <sup>(14)</sup>.

### **Plantas medicinales**

En las actividades del día a día las personas están sujetas a diversos peligros los cuales pueden causar alguna herida o pueden ser objetivo de enfermedades, por eso mismo las personas han buscado diversos métodos para poder curarlas, uno de los más empleados han sido las plantas medicinales, a todas aquellas que contienen en algunos de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en enfermedades de las personas <sup>(15)</sup>. Se estima que en México alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir, que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies <sup>(16)</sup>.

### **Propiedades biomédicas**

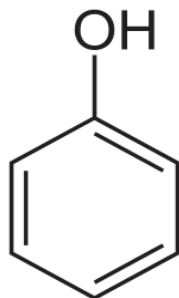
Existen grupos botánicos que por sus compuestos son mayormente eficaces para solucionar algunos padecimientos específicos. La familia Chenopodiaceae es una de estos, las plantas de esta familia presentan distintas sustancias que pueden ser de utilidad para contrarrestar enfermedades como infecciones gastrointestinales o disminuir procesos inflamatorios cutáneos dado a sus principios activos. Donde el género *Chenopodium* destaca por ser uno

de los más empleados, este taxa tiene cerca de 200 especies y es de distribución mundial <sup>(17)</sup>. A su vez en este grupo se encuentran especies como *Chenopodium ambrosioides* (Epazote), la cual ha destacado por tener diversos efectos medicinales, entre ellos destacan su capacidad antibacteriana y antihelmíntica <sup>(18, 19)</sup>, *C. album*, la cual ha presentado diversos efectos antimicrobianos <sup>(20)</sup> y *C. murale*, la cual es una planta que se ha usado en la medicina tradicional como antiinflamatorio y cicatrizante pero no se han tenido registros de su actividad biomédica y por lo tanto es de gran interés <sup>(21)</sup>.

Los efectos medicinales de las plantas se deben en gran medida a los compuestos que son capaces de producir en su metabolismo, dentro de éstos destacan el grupo de los compuestos fenólicos, los cuales son unos de los más importantes dadas sus características químicas, entre las que se han reportado están: su capacidad antioxidante, anticancerígena, antibacteriana y antiinflamatoria <sup>(22)</sup>.

### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas producto del metabolismo secundario; en plantas, su biosíntesis es principalmente en las vías del ácido siquímico, la vía de las pentosas fosfatos y la vía de los fenilpropanoides <sup>(23,24)</sup>. Una de sus principales características es la presencia de uno o varios grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, siendo este grupo el que le confiere la capacidad de reaccionar como ácido, esto se debe a que el oxígeno se encuentra unido débilmente al hidrógeno permitiendo la liberación de un protón (+H) al medio <sup>(25)</sup> (Figura 1).



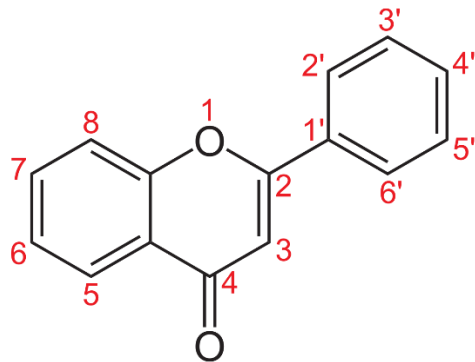
**Figura 1.** Estructura básica de un compuesto fenólico.



Otra característica destacable de los fenoles es su solubilidad en agua y solventes orgánicos la cual es en gran parte conferida por los grupos hidroxilo (-OH) presentes en sus estructuras, así como la capacidad de unirse entre ellos o con otras moléculas mediante puentes de hidrógeno <sup>(25)</sup>. De igual manera es común encontrar algunos fenoles o moléculas derivadas de uno, unidos a glúcidos pudiendo ser monosacáridos o polisacáridos formando así glicósidos <sup>(26)</sup>. Bajo estas premisas, los compuestos en la naturaleza son muy diversos estructuralmente hablando, pudiendo ser simples o muy complejos, siendo los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos los más destacables dentro de los compuestos fenólicos. Los fenoles cumplen papeles importantes en la vida de las plantas y la gran diversidad de estos demuestra su importancia, sirviendo como atractores de polinizadores, formando parte del desarrollo de algunos órganos vegetales, en la pigmentación de órganos reproductores, agentes antifúngicos, así como otros papeles en la ecología de las plantas, además siendo utilizados como moléculas con posibles usos terapéuticos en humanos <sup>(25, 26, 27)</sup>.

## **Flavonoides**

Dentro de las moléculas más estudiadas en la actualidad se encuentran los flavonoides, el interés por ellos radica principalmente por sus cualidades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias y cardioprotectivas las cuales están dadas por sus características estructurales <sup>(28, 29, 30)</sup>. En principio los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos, caracterizado por la presencia de dos anillos de fenilos (anillo A y anillo B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico), todo formando un esqueleto de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Figura 2). El Anillo B se caracteriza porque los carbonos en él se cuentan del 2' al 6', mientras que los anillos A y C, se enumeran del 1 al 8 <sup>(31)</sup>. Bajo esta estructura básica, los flavonoides que se encuentran en la naturaleza pueden presentar múltiples variaciones que confieren diferentes características, las diferencias que se dan en el anillo C dan como resultado la clasificación de subgrupos de flavonoides entre ellos las flavononas, flavonoles, flavonas, isoflavonoides y antocianinas <sup>(26, 28)</sup>.



**Figura 2.** Estructura general de un flavonoide.

Los flavonoides derivan de la combinación de dos vías metabólicas, siendo la primera, la vía del ácido siquímico posteriormente pasando a la vía del acetato/malonato <sup>(26)</sup>. Esta combinación de rutas da como consecuencia que los anillos de los flavonoides deriven de diferentes rutas metabólicas, siendo que el anillo A deriva de la vía del acetato/malonato, mientras que el anillo B deriva de la fenilalanina, dentro de la vía del ácido siquímico <sup>(32)</sup>.

Una de las propiedades de mayor interés en la investigación de flavonoides es su actividad antioxidante, la cual está asociada a sus capacidades de secuestro de radicales libres, quelantes de hierro, inhibición de enzimas como las oxidasas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ERO), estimulación de enzimas antioxidantes como la catalasa, así como aumentar la disposición de antioxidantes endógenos, además de otros mecanismos <sup>(33, 31)</sup>. La capacidad antioxidante de los flavonoides está ligada directamente a la estructura de la molécula en sí misma, diversos estudios reportan que las moléculas que presentan un grupo catecol en el anillo B, la cual le confiere mayor estabilidad, de igual manera la presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 3, 4 y 5 del mismo anillo <sup>(34, 35)</sup>. También se ha reportado que la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4, esto en conjunto con el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, además del grupo hidroxilo del carbono 3, todo esto en el anillo C, confieren una capacidad antioxidante mayor <sup>(27, 31, 35)</sup>.

## ANTECEDENTES

- Kaour *et al.*, (2018), reportaron que el extracto metanólico de *C. murale* tuvo resultados significativos en cuanto al halo de inhibición de *Escherichia coli* siendo este de 16 mm, en *Lactobacillus* presentó un halo de 12 mm y en *Bacillus subtilis* no tuvo inhibición.
- Mohammad *et al.*, (2014) reportaron la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico en el extracto acuoso de *C. murale*.
- Al-Jaber (2009), reportó que *Chenopodium murale* presentó siete flavonoides identificados como, kampfrol (1), quercetina (2), kampfrol-3-0- $\alpha$ -L-rhamnoside-7-0- $\beta$ -D-xyloside (1 -2) -O- $\alpha$ -L-rhamnoside (3), kampfrol-3-galactorhamnoside (4), kampfrol 3,7-0-dirhamnoside (5), kaempferol-4'-metoxi-rutinoside (6), kampfrol-7-0-ramnosido (7).
- Gracia (2007) reportó que *C. murale* tiene una concentración de 19.755 mg fenoles que están reportados en equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg eGA/g extracto). A su vez la planta presentó 12.963 mg de flavonoides y que fueron reportados en equivalentes de catequina por gramo de extracto (mg eCat/g extracto).
- Ahmad *et al.* (2003) reportaron la actividad antifúngica, antibacteriana, insecticida y actividad tóxica del extracto metanólico de *C. murale*, este extracto presentó ser un buen antifúngico contra *Trichophyton longifusus* teniendo cerca del 70% de inhibición, así como 30% ante *Microsporum canis*. Mientras que en la actividad antibacteriana presentó una inhibición del 64% contra *Pseudomonas aeruginosa*, 50% contra *E. coli* y 58.06% contra *B. subtilis*. El extracto no presentó capacidad insecticida igualmente en el bioensayo de toxicidad con *Artemia salina* donde no hubo actividad significativa.

## JUSTIFICACIÓN

Los fármacos empleados como cicatrizantes suelen tener un nivel de citotoxicidad alta, pese a que presentan capacidades antimicrobianas altas, producen un retraso en el proceso, afectando a la viabilidad de las células encargadas de llevarlo a cabo, por eso mismo se

buscan alternativas en las plantas que presenten los mismos resultados en lo que refiere a capacidades inhibitorias en microorganismos y que tengan niveles de citotoxicidad bajos. El uso de plantas del género *Chenopodium* en la medicina tradicional lleva un largo tiempo haciéndose en culturas del medio oriente, de igual manera en México se han realizado estas actividades con este grupo de plantas, sin embargo, el insuficiente estudio que se ha puesto en ello conlleva a plantearse el hecho de saber qué tan útiles son estas plantas, evaluando así sus propiedades biomédicas como primer paso para conocer el grado de utilidad. En el caso de *C. murale*, los estudios en nuestro país son precarios, y ya que en otras partes del mundo se le da diferentes utilidades relacionadas a la medicina y la alimentación se propone usar un extracto de esta planta para evaluar la capacidad de sus componentes y ser usado como un cicatrizante.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar las actividades biomédicas de *Chenopodium murale* L. que están relacionadas con el proceso de cicatrización.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la toxicidad dérmica aguda del extracto metanólico de *C. murale*
- Analizar la composición química del extracto por cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD).
- Determinar la capacidad antioxidante (cuantificar fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante media).
- Determinar la actividad antibacteriana (método de difusión en agar según Kirby-Bäuer contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).
- Determinar la actividad antifúngica (método de difusión en agar) contra dos cepas de *Candida albicans* y dos cepas de *C. tropicalis*.



metanólico crudo eliminando el exceso de solvente por destilación con el rotavapor, el rendimiento del extracto se determinó mediante la relación del peso de la materia seca y el peso del extracto obtenido <sup>(36)</sup>.

### **Evaluación de la toxicidad tóxica aguda**

Para evaluar la toxicidad tóxica, se empleó la metodología establecida por la OECD (2017) <sup>(37)</sup>, donde se usaron 6 ratones CD1, 3 machos y 3 hembras. Se les retiró el pelo de la parte dorsal con una rasuradora y con crema para depilar de la marca *Nair*. Estos fueron expuestos al tratamiento, que consistió en extracto metanólico de *C. murale* diluido en gel quirúrgico de la marca Sonic. La concentración usada fue 2000 mg/ kg, y para ello se diluyeron 350 mg de extracto en 250 mL del gel antes mencionado.

Para saber si el extracto es tóxico, el tratamiento se colocó vía tóxica en la parte dorsal, durante 14 días. Durante estos días los ratones fueron provistos de comida y agua *ad libitum*, además de ser observados, especialmente las primeras 4 horas de exposición ante el extracto, para saber si existió algún tipo de comportamiento de toxicidad como lo es la producción excesiva de saliva, diarrea, somnolencia o pérdida del conocimiento. Posterior a ello los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras que fueron procesadas por histología común para conocer los efectos del extracto en la composición de los tejidos (Apéndice 2).

### **Caracterización fitoquímica**

El extracto se caracterizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD por sus siglas en inglés) (Apéndice 3). Para conocer las moléculas presentes en el extracto, estas se compararon con los estándares de la biblioteca del equipo según su tiempo de retención y el pico de absorción máxima bajo luz ultravioleta ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).

## **Pruebas cualitativas**

Para saber si en extracto había presencia de compuestos fenólicos se llevaron a cabo pruebas colorimétricas, donde se usó cloruro férrico  $\text{FeCl}_3$  para la detección de fenoles y cloruro de aluminio  $\text{AlCl}_3$  para la detección de flavonoides.

## **Capacidad antioxidante**

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto mediante la técnica de reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) propuesta por Brand *et al.* (1995)<sup>(38)</sup>, se usaron las concentraciones de 100 a 1000 partes por millón del extracto diluido en metanol grado HPLC. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración más 150  $\mu\text{L}$  de solución metanólica de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) (Apéndice 4).

## **Cuantificación de Fenoles**

Se realizó una modificación a la técnica de Singleton *et al.* (1999)<sup>(39)</sup>. Donde se midió por espectrofotometría la cantidad de fenoles presentes en el extracto, utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante (Apéndice 5). Para ello se usó el ácido gálico como estándar de referencia debido a su estructura fenólica, las muestras y el estándar fueron leídas a 760 nm. Los resultados se expresaron en equivalente de ácido gálico (e AG/g de extracto).

## **Cuantificación de Flavonoides**

La cantidad de flavonoides en el extracto fue cuantificada por el método de Dowd donde se usó un estándar de quercetina (10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y una solución de  $\text{AlCl}_3$  2% (Apéndice 6). La longitud de onda a emplearse fue de 410 nm y los resultados se expresaron en equivalentes de quercetina por gramo de extracto (eq Q/g)<sup>(40)</sup>.

## **Actividades biológicas**

### **1. Actividad antibacteriana**

#### **1.1 Pruebas cualitativas**

Se realizó una prueba cualitativa mediante el método de difusión en agar Kirby-Baüer, propuesta por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio por sus siglas en inglés CLSI (2020) (Apéndice 7) <sup>(41)</sup>. Se usaron cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*) así como Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Como medio de cultivo se usó el medio Müeller-Hinton. Las bacterias se incubaron durante 24 horas a 37° C. Se impregnaron sensidiscos con una solución stock de extracto con una concentración de 40 mg/200 µL, tomando 10 µL para cada sensidisco (2 mg de extracto por sensidisco). Como control positivo se usó un stock de cloranfenicol con una concentración de 1 mg/400 µL 2 (25 µg de cloranfenicol por sensidisco). La densidad del cultivo bacteriano que se empleó fue de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, que corresponde al 0.5 del estándar de turbidez de McFarland. Las pruebas se hicieron por triplicado <sup>(42)</sup>.

#### **1.2 Pruebas cuantitativas**

Se determinó la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CBM (concentración bactericida mínima) por el método de la microtécnica de dilución en caldo con distintas concentraciones del extracto obtenido (Apéndice 8). Las bacterias se incubaron durante 24 horas a 37° C y se realizó una dilución para obtener una densidad de  $1.5 \times 10^5$  UFC/mL. Posteriormente 50 µL de estos cultivos se colocaron en una placa ELISA de 96 pozos junto al extracto. Después de 24 horas de cultivo a 36 °C, se agregaron 100 µL de una solución al 0.08% del indicador de viabilidad celular TTC <sup>(41)</sup>.

##### **1.2.1 Efecto del extracto en la curva de crecimiento bacteriano**

Con fin de conocer la actividad del extracto en la curva del crecimiento bacteriano se usó una cepa Gram positiva, se registró su actividad durante un plazo de 24 horas en contacto con el extracto a distintas concentraciones (1/2 CMI, CMI y CBM y) además de agregar un grupo



testigo sin extracto<sup>(41)</sup> los resultados fueron registrados según la cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias) (Apéndice 9).

## **2. Actividad antifúngica**

La prueba antifúngica fue llevada a cabo por el método de difusión en agar contra hongos levaduriformes. Se usó una solución stock con una concentración de 80 mg/200 µL del extracto metanólico; se tomaron 10 µL para cada sensidisco (4 mg de extracto por sensidisco). Para el control positivo se usó un stock Nistatina a una concentración de 1 mg/400 mL (25 µg por sensidisco)<sup>(42)</sup>.

## **RESULTADOS**

### **Rendimiento del extracto**

A partir de 560 g de materia seca y 5.6 litros de metanol se obtuvieron 60.4913 g de extracto, esto representa 10.78 % del peso total de materia seca.

### **Toxicidad tóxica aguda**

Tras una hora de colocar el extracto en los ratones hembra se notó pigmentación en dos de tres de ellas, de igual manera se observó la presencia de heridas en la parte dorsal, causadas principalmente por mordidas y heridas hechas por la rasuradora. Cabe destacar que las hembras tenían la piel en una coloración más rosada además el pelo les comenzó a crecer a los 8 días de iniciado el ensayo. A nivel macroscópico las hembras no presentaron signos de algún efecto tóxico.

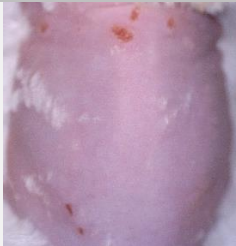



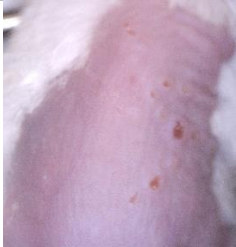


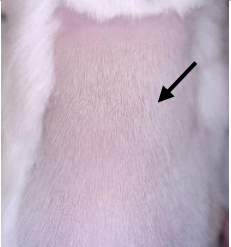




De igual manera para a los ratones macho, se notó pigmentación tras una hora de haberse colocado el extracto; en este caso todos presentaron heridas por mordidas, no hubo signos de toxicidad a lo largo del ensayo y el pelo les comenzó a crecer desde el día 9, se notó un crecimiento destacable en el macho 1.

## **Histología**

A nivel histológico, la piel de la parte dorsal de los ratones hembra presentó una arquitectura bien organizada, notándose las tres capas principales, (epidermis dermis e hipodermis) bien diferenciadas, así mismo se observó una cuantiosa cantidad de glándulas sebáceas como de folículos pilosos en diferentes estadios de maduración. Cabe destacar que en el grosor de la dermis uno de los ratones macho fue menor con respecto a las demás incluidos en el experimento (Cuadro 3).




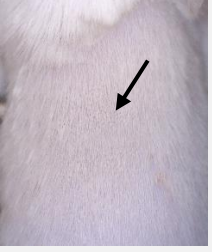

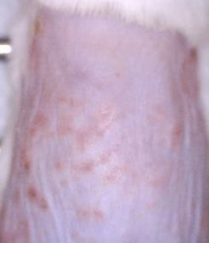






Tras analizar las muestras de los ratones macho, se encontró que la organización de las tres capas de la piel no se perdió, a pesar de ello se encontraron diferencias en las muestras, siendo los machos los más sensibles, destacando el grosor de la epidermis y la menor cantidad de glándulas sebáceas con respecto a los demás organismos. Considerando los resultados obtenidos, se determinó que la solución usada no tuvo actividad suficiente para considerarse tóxica (Cuadros 1 y 2).

**Cuadro 1.** Registro fotográfico del ensayo de toxicidad tóxica aguda, las imágenes muestran la parte dorsal de los ratones donde se colocó el extracto diluido en gel. Solo se observan organismos hembras.

<b>Días</b>	1	3	7	14
<b>Individuo</b>				
Hembra 1				
Hembra 2				
Hembra 3				

La flecha indica crecimiento significativo de pelo.

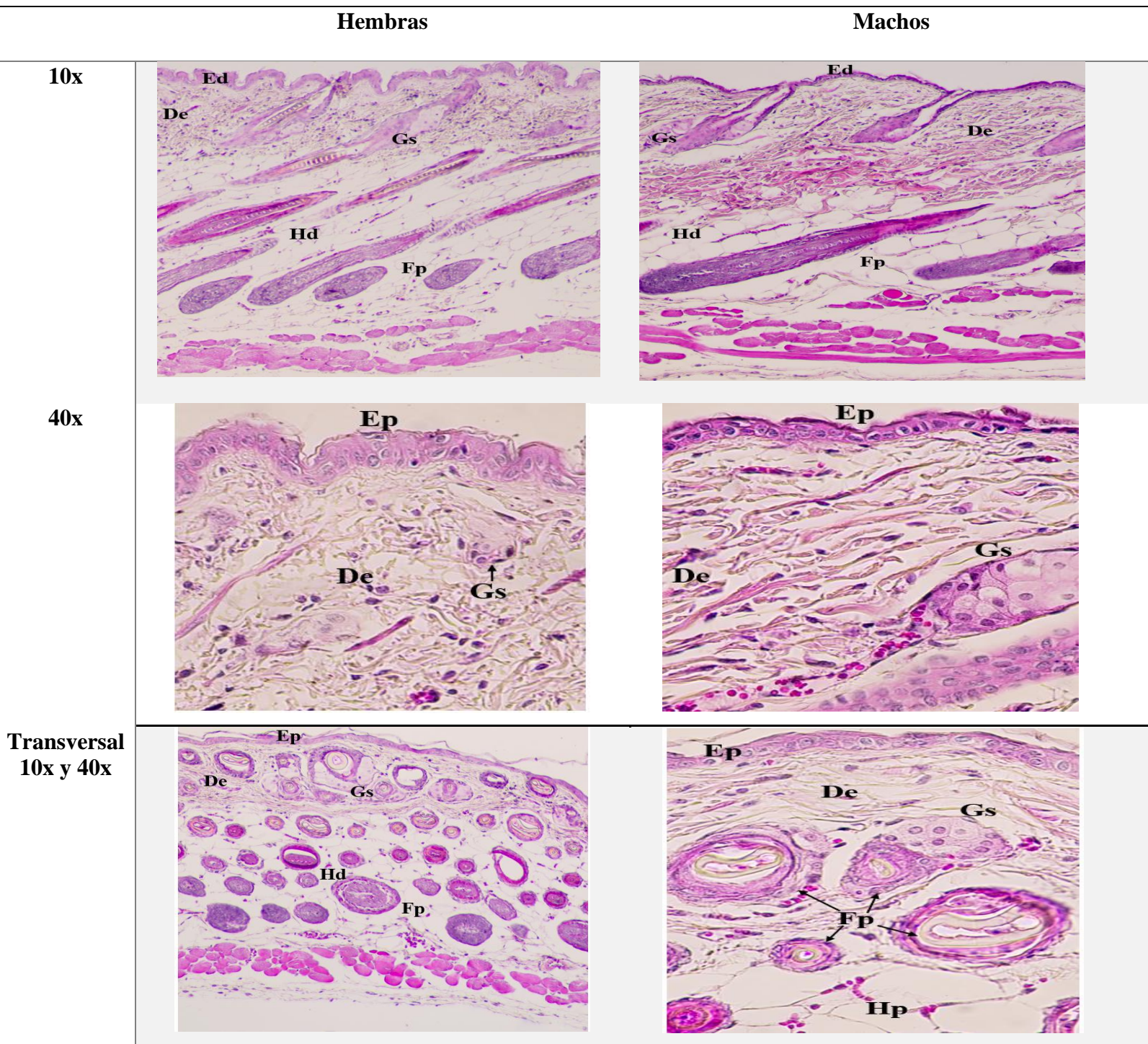
**Cuadro 2.** Registro fotográfico del ensayo de toxicidad tóxica aguda, las imágenes muestran la parte donde se colocó el extracto diluido en gel. Solo se observan organismos machos.

<b>Días</b> <b>Individuo</b>	1	3	7	14
Macho 1				
Macho 2				
Macho 3				

La flecha indica crecimiento significativo.

## Fotos histología

**Cuadro 3.** Tinción hematoxilina-eosina. Microfotografías del ensayo de toxicidad tóxica aguda, piel de ratón, en el cuadro se muestran cortes de piel de ratones macho y hembras, en la muestra de machos 4x se muestra una pérdida mayor de la epidermis con respecto a la muestra de las hembras.



Ep= Epidermis, De= Dermis, Hp= Hipodermis, Fp= Folículo piloso y Gs= Glándula sebácea.

## Capacidad antioxidante

### a) Pruebas cualitativas

Para la detección de grupos de metabolitos secundarios, la primera prueba fue evidenciar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. Esto se llevó a través de reacciones colorimétricas los resultados se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Pruebas colorimétricas para la presencia de fenoles y flavonoides.

Prueba	Resultado
Fenoles	+++
Flavonoides	+

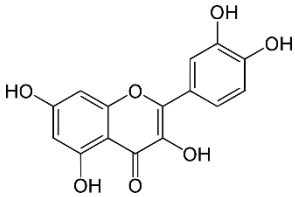
+ = concentración de compuestos fenólicos con respecto a la reacción colorimétrica.

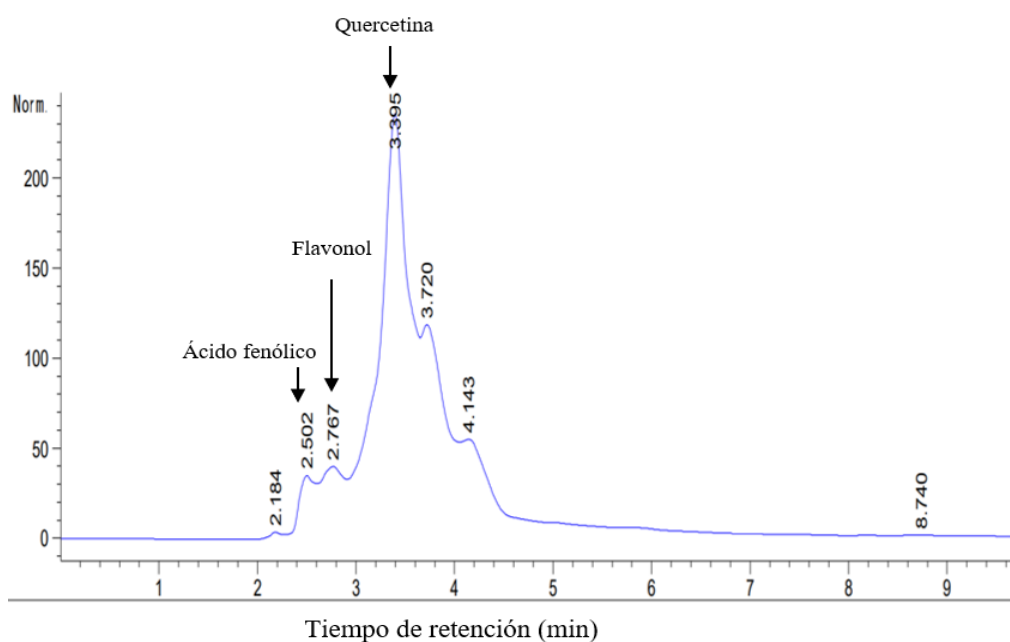
### b) Caracterización fitoquímica

A través del HPLC-DAD se determinaron los compuestos presentes en el extracto metanólico, esto se hizo con base en los tiempos de retención y el espectro UV, fueron comparados con los compuestos presentes en la biblioteca del equipo. En el cromatograma de la figura 4, se observa que hay dos picos que fueron identificados como: quercetina y un ácido fenólico. El compuesto con mayor abundancia fue la quercetina. Por otra parte, se logró determinar la presencia de un ácido fenólico y un flavonol, sin embargo, no se lograron identificar.

**Cuadro 5.** Compuestos encontrados en extracto metanólico a través de HPLC-DAD

No. compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV $\lambda$ máx. (nm)	Tipo de compuesto	Estructura química
1	2.184	204	N. I	-
2	2.502	332	Ácido fenólico	-
3	2.767	266, 344	Flavonol	-

4	3.395	266.334	Quercetina	
---	-------	---------	------------	---



**Figura 4.** Cromatograma del análisis por HPLC-DAD (280 nm) del extracto metanólico de *C. murale*.

### c) Cuantificación de Fenoles totales

Dentro del metabolismo secundario de las plantas los fenoles representan uno de los grupos más ampliamente distribuidos, en este caso después de comprobar que el extracto metanólico de *C. murale* presentaba fenoles, se cuantificaron, dando como resultado 36 mg equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto (36 mg eAG/ g).

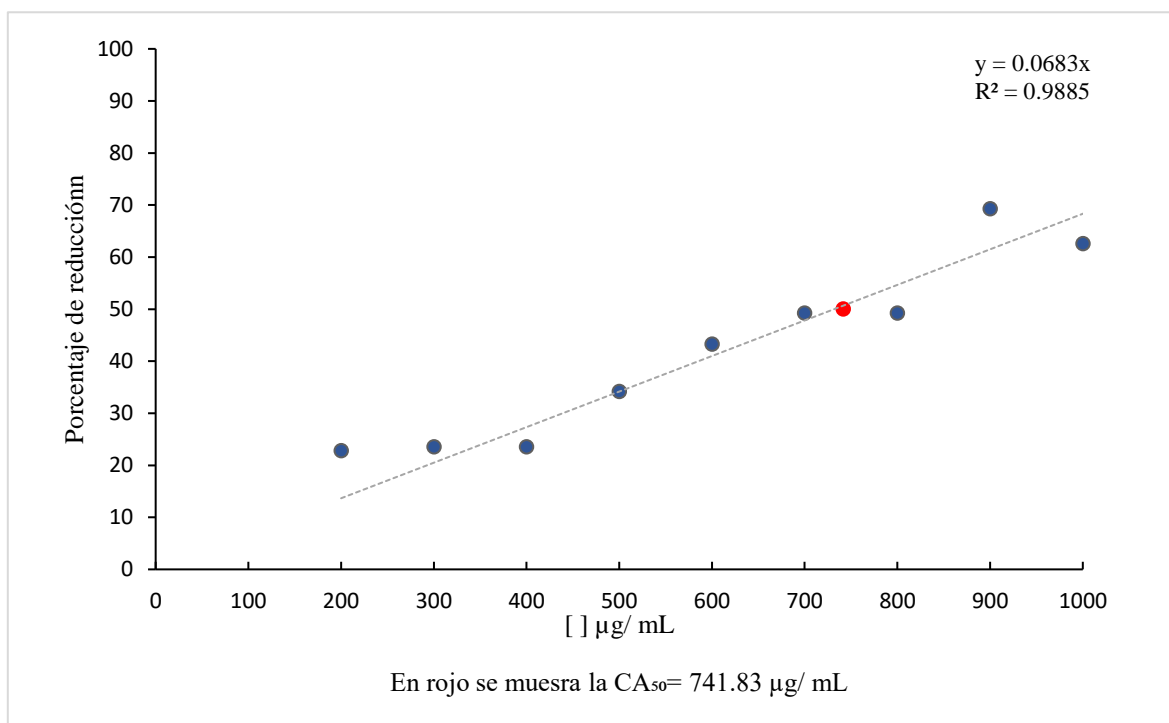
### d) Cuantificación de flavonoides

Después de cuantificar a los fenoles se determinó la presencia un subgrupo de estos, los flavonoides, que es un grupo que se caracteriza por una estructura benceno-gamma-pirano y

así como una alta capacidad antioxidante. El resultado de la cuantificación fue de 6.15 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (6.15 mg eQ/ g).

#### e) Capacidad antioxidante media A<sub>50</sub>

El extracto presentó una actividad antioxidante baja, esto se ve reflejado en el hecho de que la CA<sub>50</sub> fue de 741.83 µg/ mL (Figura 5).



**Figura 5.** Capacidad antioxidante del extracto metanólico

#### Evaluación de la capacidad antibacteriana

##### a) Difusión en agar de Kirby-Baier

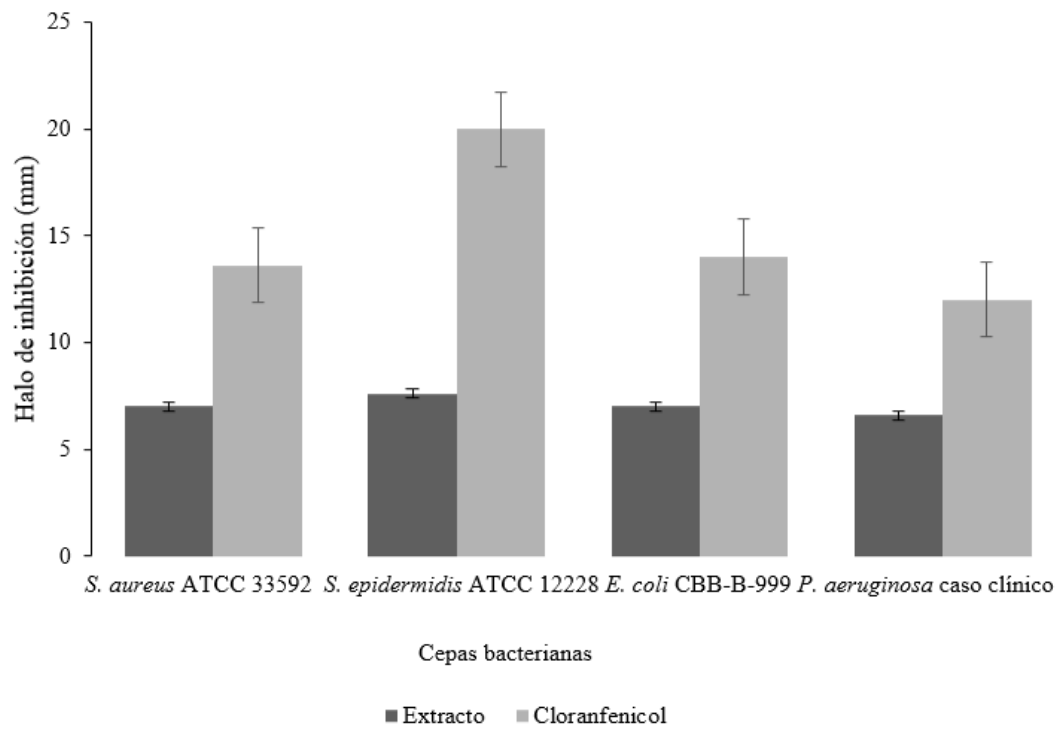
El extracto presentó halos de inhibición en todas las bacterias, sin embargo, sólo tuvo actividades significativas en *S. epidermidis*. Mientras que el control positivo tuvo la mayor actividad significativa en esta misma cepa. Los halos de inhibición del control positivo y del extracto se muestra en el cuadro 6.



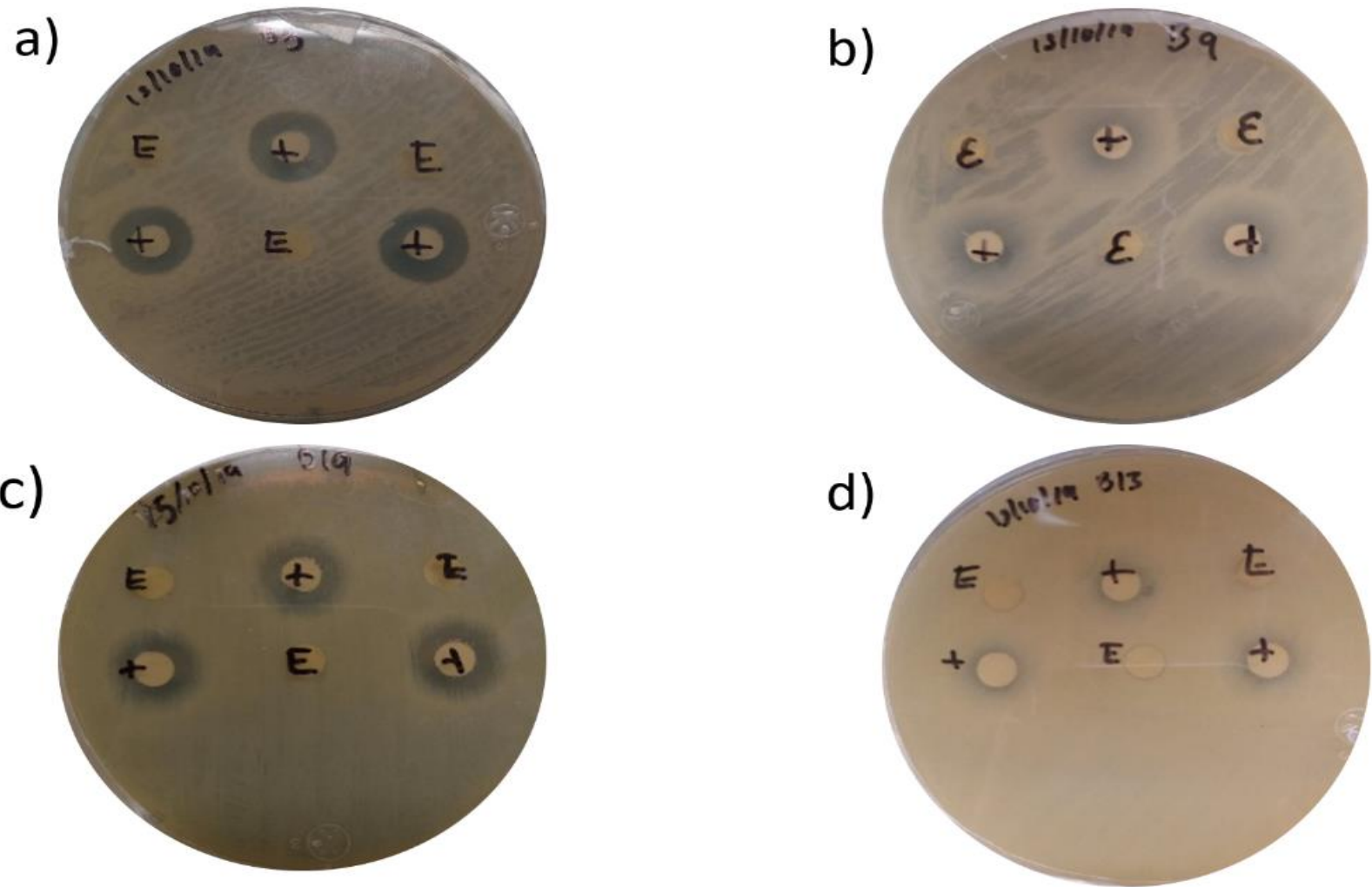
**Cuadro 6.** Actividad antibacteriana del extracto metanólico de *C. murale* determinada por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer. Halos de inhibición del extracto y control positivo (mm), valor promedio de 3 repeticiones

<b>Bacteria</b>	<b>Extracto</b>	<b>Cloranfenicol</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 33592	7±0	13. 6±0.577
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	7.6±0.577	20±0
<i>E. coli</i> CBB-B-999	7±0	14±0
<i>P. aeruginosa</i> Donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la FES Iztacala caso clínico 1	6.6±0.577	12±0

A pesar de que los sensidiscos fueron impregnados con 2 mg de extracto, tuvieron actividad antibacteriana en todas las cepas probadas, las bacterias Gram positivas fueron las que presentaron un promedio mayor de inhibición. Tomando en cuenta los datos antes mencionados se observa que *S. epidermidis* fue la bacteria más sensible al extracto (figura 6 y 7).



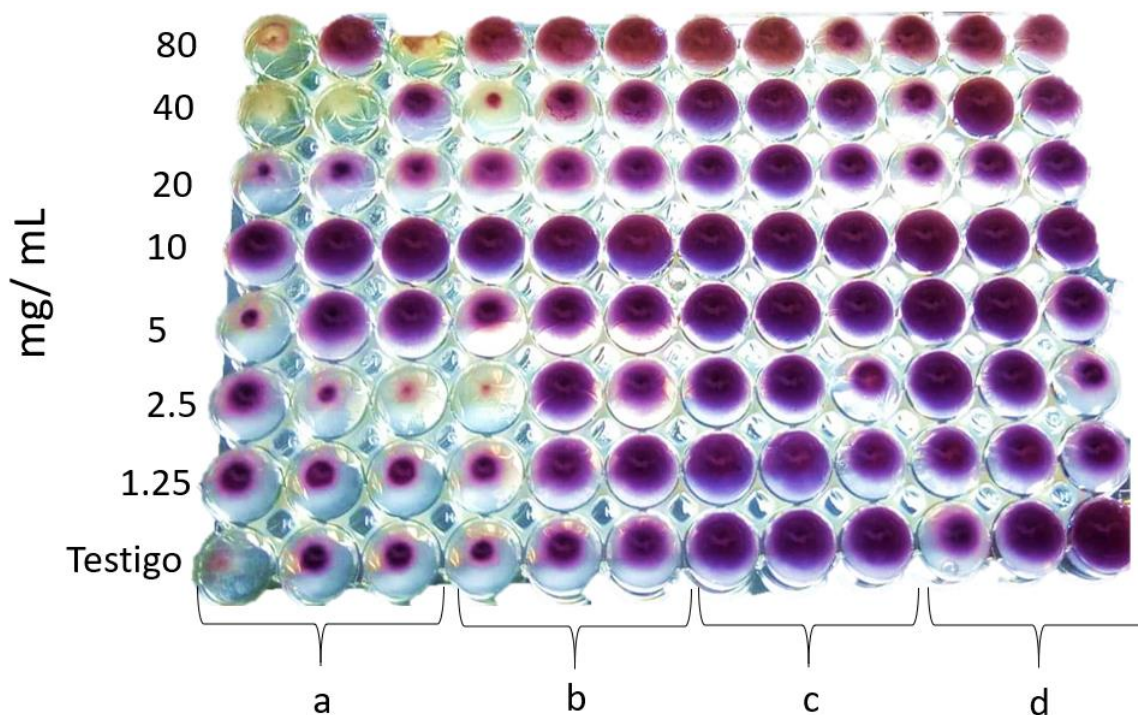
**Figura 6.** Halos de inhibición del extracto y el control positivo en bacterias, Gram positivas y negativas.



**Figura 7.** Prueba cualitativa de actividad antibacteriana del extracto metanólico de *C. murale*. a) *Staphylococcus aureus*, b) *S. epidermidis*, c) *Escherichia coli* y d) *Pseudomonas aeruginosa*

## b) Microtécnica de dilución en caldo

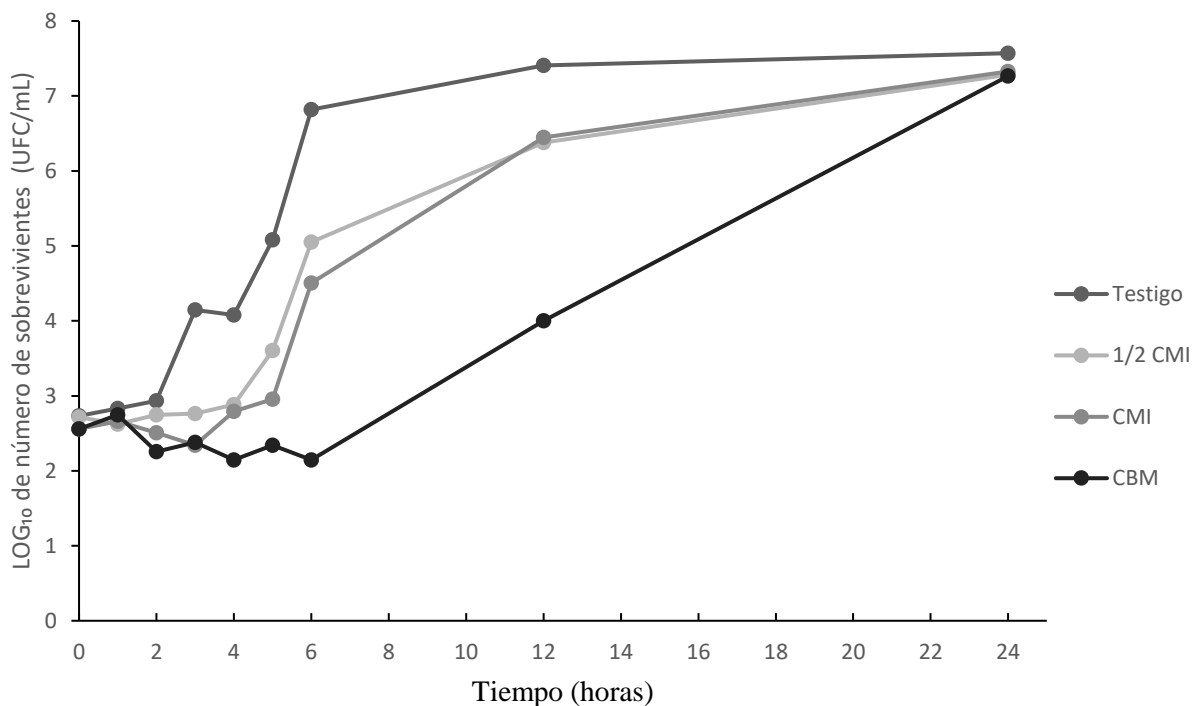
Se determinó la concentración inhibitoria media (CMI) y concentración mínima bactericida (CBM) para dos cepas Gram positivas y dos negativas, donde sólo se registró inhibición en la cepa de *S. aureus* ATCC 33592, los valores fueron 20 mg/mL y 40 mg respectivamente, mientras que en las demás cepas no hubo un efecto significativo (figura 8).



**Figura 8.** Evaluación cuantitativa de la inhibición bacteriana por la microtécnica de dilución en caldo, a) *S. aureus* ATCC 33592, b) *S. epidermidis* ATCC 12228, c) *E. coli* CBB-B-999 y d) *Pseudomonas aeruginosa* caso clínico.

## C) Efecto del extracto en el crecimiento bacteriano

Posteriormente de realizar la prueba cuantitativa de la actividad antibacteriana se evaluó el efecto que tenía el extracto en el desarrollo de colonias, para ello se seleccionó la cepa ATCC 33592 de *S. aureus*. El extracto presentó un efecto bacteriostático en contacto con la cepa, mostrándose un decaimiento en la curva de crecimiento en los primeros seis tiempos, este comportamiento se registró en la concentración de CBM, mientras que en las concentraciones de CMI y  $\frac{1}{2}$  CMI, se notó un leve equilibrio en los primeros 4 tiempos y un posterior aumento en los siguientes dos tiempos, el comportamiento de las curvas se observa en la figura 9.



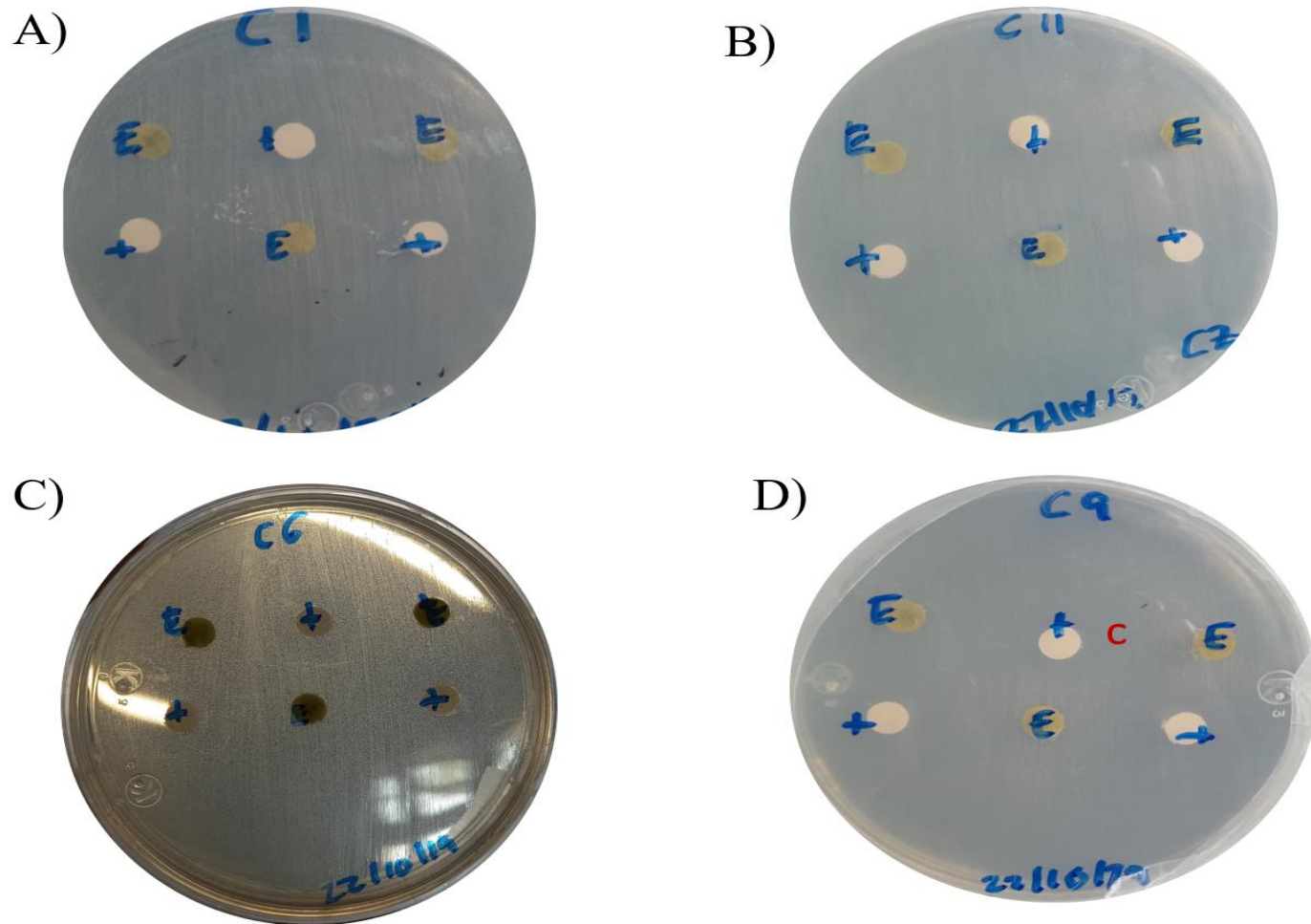
**Figura 9.** Comportamiento de las curvas de crecimiento bacteriano de la cepa *S. aureus* ATCC 33592 en contacto con el extracto, con respecto al tiempo.  $\frac{1}{2}$  CMI= 10 mg/ mL, CMI= 20 mg/ mL y CBM=40 mg/ mL.

### Actividad antifúngica

El extracto no presentó actividad antifúngica para el caso de los hongos levaduriformes, de igual manera se observó que el control positivo tampoco tuvo actividad en la cepa de *C. albicans* ATCC10231 (Cuadro 7, figura 10).

**Cuadro 7.** Diámetro de los halos de inhibición del extracto sobre hongos levaduriformes (mm).

Hongo	Extracto	Nistatina
<i>Candida albicans</i> Caso clínico	NA	11.3±0.577
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-NA	NA
<i>C. tropicalis</i> Donada por el hospital los Ángeles	NA	15.30±0.577
<i>C. tropicalis</i> Donada por el hospital los Ángeles	NA	15±1



**Figura 10.** Halos de inhibición del extracto y el control positivo sobre diferentes cepas del género *Candida* (mm). A) *Candida albicans* Caso clínico, B) *C. albicans* ATCC10231, C) *C. tropicalis*, Donada por el hospital los Ángeles, D) *C. tropicalis* Donada por el hospital los Ángeles

## DISCUSIÓN

Desde un punto químiotaxonómico, las especies del género *Chenopodium* contienen compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, como es el caso de *C. quinoa* <sup>(43)</sup>, *C. album* <sup>(44)</sup>, *C. ambrosioides* <sup>(45)</sup> entre muchas otras especies <sup>(46)</sup>. De igual manera que los reportes antes mencionados el extracto de *C. murale* tuvo presencia de fenoles, así como flavonoides y de ácidos fenólicos. Posteriormente a la identificación mediante HPLC-DAD, se determinó la presencia de quercetina en el extracto.

La quercetina fue uno de los componentes que se lograron determinar luego de la identificación fitoquímica. Diferentes autores reportaron encontrar el mismo compuesto en extractos del mismo solvente y de plantas de la misma especie, pero de una distribución distinta, por tanto, la presencia de esta puede ser factible <sup>(47, 48)</sup>. Sin embargo, estos autores mencionan la presencia de otros compuestos, entre ellos el kaempferol. Se ha reportado que cinco compuestos derivados del kaempferol, así como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico se han encontrado en diferentes extractos de *C. murale* <sup>(47,48)</sup>. Lo cual coincide con el ácido fenólico encontrado, pero que no pudo ser identificado. De igual manera se han hecho reportes del análisis de extractos hexánico y clorofórmico de *C. murale* donde por cromatografía de gases acoplada a masas, se detectó la presencia de monoterpenoides, ácidos grasos y precursores de esteroides <sup>(49)</sup>. Dentro del reino vegetal la quercetina se encuentra bien distribuida, pudiéndose encontrar en distintas familias botánicas, como es el caso de la familia Rutaceae, en el género *Citrus* <sup>(50)</sup>, así como en la familia Ericaceae y Liliaceae <sup>(51)</sup>. Con lo anterior mencionado se entiende que los compuestos con propiedades biomédicas pueden encontrarse en distintas plantas que normalmente son empleadas en la medicina tradicional.

Se sabe que los compuestos fenólicos haciendo hincapié en los flavonoides, son un grupo de moléculas de interés debido a sus actividades biomédicas, las cuales han sido atribuidas a su capacidad antioxidante, en donde se ha descrito que este proceso es llevado por tres mecanismo principales: La supresión de especies reactivas de oxígeno, a través de la inhibición de enzimas o quelantes de oligoelementos relacionados en la producción de

radicales libres, otra es donando protones (+H) a los radicales generando radicales estables y la última es protegiendo o regulando las defensas antioxidantes <sup>(52, 53)</sup>.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se procedió a evaluar su capacidad antioxidante, y para ello se dividió en tres secciones básicas, la primera de ellas fue conocer la cantidad de fenoles totales del extracto. En este estudio se cuantificaron en 36 mg eAG/ g, siendo mayor a lo reportado por otros autores <sup>(54)</sup>, donde se reportaron 19.75 mg eAG/ g, esto podría deberse a que en este estudio se usó el método soxhlet como técnica de extracción además de que se usó acetona y hexano como disolventes. Sin embargo, se ha reportado que el extracto acuoso de *C. murale* tiene una mayor cantidad de fenoles siendo esta de 79.9 mg eAG/ g, esto podría deberse a que se disolvió en una solución de etanol/ agua (80: 20 v/v) además de que fue filtrado. Otra explicación a la diferencia de fenoles obtenidos sería que los compuestos fenólicos son solubles en sustancias polares y que el solvente usado logro arrastrar una mayor cantidad de estos en función a esta característica, siendo el agua una sustancia que tiene la capacidad de atraer más moléculas debido a que puede formar puentes de hidrogeno y que pueden unirse a una mayor cantidad de sustancias. Asimismo, junto al solvente, la composición fitoquímica del extracto podría determinar esta diferencia, se sabe que los compuestos fenólicos que se encuentran glicosilados son más solubles en agua y si parte de los fenoles que encuentran en el extracto metanólico de *C. murale* son glicosilados esta sería la razón por la cual se encontró una mayor cantidad de fenoles en extractos con solventes acuosos <sup>(55, 56, 26)</sup>.

Por otro lado, el contenido de fenoles totales encontrado en este estudio también es superior a los reportados por otros autores donde los valores de fenoles totales más altos fueron para *C. rubrum* (L.) con  $3.92 \pm$  mg eAG/ g, semillas de *C. urbicum* (L.) con  $3.87 \pm$  mg eAG/ g y semillas de *C. hybridum* (L.) con  $3.72 \pm$  mg eAG/ g <sup>(57)</sup>. Esto podría deberse a las condiciones del sitio y la fecha de colecta, ya que se sabe que la cantidad de estos puede aumentar o disminuir bajo ciertas condiciones del medio, como lo son diferentes condiciones de estrés, entre ellas infecciones por hongos o bacterias, o la misma incidencia de luz <sup>(58, 59)</sup>.

Los flavonoides encontrados en esta especie han sido caracterizados y aislados por diferentes autores, entre ellos destacan la quercetina y el kaemferol además de varios de sus derivados glicosilados <sup>(45, 47, 49)</sup>. Sabiendo ésto se llevó a cabo la cuantificación del contenido de



flavonoides totales, la cual fue de 6.15 mg eQ/ g. Las investigaciones de esta especie se remiten a los datos reportados por pocos autores, uno de ellos cuantificó 12.963 mg eQ/ g<sup>(54)</sup>. De igual manera se ha evaluado el porcentaje de flavonoides presente en 10 gamos de planta deshidratada diluida en 100 mL de metanol al 80%, dando como resultado que 3.29 %  $\pm$  0.002 eran flavonoides<sup>(60)</sup>. También se ha encontrado que el extracto acuoso de *C. murale* tuvo 12.77  $\pm$  0.07 mg eQ/ g. Tomando en cuenta lo antes explicado, se consideró que la cantidad de flavonoides presentes en el extracto de este estudio fueron menores comparados con los estudios anteriormente mencionados<sup>(55)</sup>. Esto puede deberse a las diferencias entre los lugares de colecta ya que se sabe que algunos de los flavonoides no son sintetizados si no hay condiciones de estrés oxidativo, tomando en cuenta esto los resultados obtenidos por otros autores<sup>(61)</sup>.

A pesar de esto, al contrastar los resultados del presente estudio con los de Nowak *et al.*, (2016), se observa que los datos son similares en cuanto a las concentraciones de flavonoides, esto en plantas del mismo género, siendo *C. rubrum*, *C. hybridum* y *C. album* plantas con niveles de antioxidantes similares, siendo de 7.80  $\pm$  0.43, 7.20  $\pm$  0.65 y 6.20  $\pm$  0.28 mg eQ/ g<sup>(57)</sup>. Estos datos son equiparables a lo encontrado en este trabajo.

Por último, se evaluó la capacidad del extracto para poder reducir un agente oxidante a través del método DPPH. La CA<sub>50</sub> del extracto fue de 741.83  $\mu$ g/ mL, comparando con lo reportado anteriormente, donde se evaluaron distintas plantas de distintos géneros y se concluyó que la capacidad antioxidante era de un nivel bajo<sup>(57)</sup>. Por otro lado, se ha reportado que plantas del género *Chenopodium* tuvieron actividades antioxidantes por debajo de lo antes expuesto, los valores fueron: *Chenopodium spp.* con una reducción del 70.9% del radical DPPH con 125 mg/ mL, *C. album* con una reducción del 50% a los 45 mg/ mL, *C. hybridum* a los 35 mg/ mL y *C. urbicum* con 15 mg/ mL<sup>(63, 57)</sup>. Considerando esto, es pertinente realizar un análisis más detallado de esta actividad, así como otros métodos para evaluarla, siendo el método ABTS, una opción factible y recomendada<sup>(62, 63, 64)</sup>.

Una explicación a esto sería que la cantidad de flavonoides presentes en el extracto tendría algún efecto, pues considerando lo reportado anteriormente, donde resultó haber una mayor concentración de flavonoides, se mostró que era necesario una menor concentración del extracto acuoso para poder reducir 50% del radical DPPH<sup>(55)</sup>. Otro dato que tomar en cuenta

es la concentración del radical usado, en los estudios antes mencionados el radical se usó en una concentración de 100 mM <sup>(63)</sup> y 60 µM <sup>(57)</sup> mientras que en este estudio se usó una concentración de 100 µM, pudiendo afectar así a la diferencia entre los resultados obtenidos.

También se menciona que una de las características que confiere esta capacidad se remite a la estructura que puedan tener los flavonoides, así como los arreglos que puedan tener en los anillos heterocíclicos. Por tanto, otra opción factible sería la composición de cada uno de los diferentes extractos <sup>(35)</sup>.

Las infecciones en la piel suelen ser factores que disminuyen la eficacia en el proceso de cicatrización, por ello se buscó el efecto que podría tener el extracto sobre cuatro bacterias que son comúnmente las que causan estas infecciones <sup>(65)</sup>. Con relación a lo anterior se encontró que extractos de diferentes plantas del género *Chenopodium* han tenido reportes de actividad antibacteriana. El extracto metanólico de *C. album*, presentó actividad sobre distintas bacterias siendo *S. aureus* y *E. coli* las bacterias que fueron más sensibles al extracto, con halos de inhibición de 25.0 y 21.0 mm respectivamente <sup>(66, 67)</sup>. de igual manera se demostró que el extracto de acetato de etilo de *C. ambrosioides* tuvo actividad antibacteriana destacable sobre *Enterococcus faecalis*, así mismo el extracto clorofórmico de la misma especie también tuvo actividad sobre *P. aeruginosa*, cabe destacar que el extracto evaluado en este estudio no presentó inhibición sobre esta bacteria <sup>(68)</sup>. En otro estudio se reportó que plantas de este género también presentaron actividad antibacteriana destacable en *E. coli*. Sin embargo, los resultados de este estudio no coinciden con los resultados antes mencionados <sup>(20)</sup>.

En general las pruebas con bacterias Gram positivas mostraron en promedio un resultado destacable, ya que el extracto presentó actividad contra las bacterias puestas a prueba, siendo *S. epidermidis* la bacteria que tuvo el mayor halo de inhibición en la prueba de Kirby-Baüer, esto coincide con lo reportado por otros autores en donde reportan actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *C. album*. Siendo *S. aureus* la otra bacteria evaluada <sup>(20)</sup>. El extracto metanólico de *C. murale* usado en este estudio también tuvo actividad antibacteriana, al igual que lo reportado por otro autor, resaltando una vez más el efecto sobre las bacterias Gram positivas <sup>(60)</sup>.

Posterior a realizar las pruebas cualitativas se decidió buscar la concentración necesaria para inhibir las bacterias, para ello se utilizó la técnica de microdilución en caldo, buscaron las CMI's y CBM's para cada bacteria anteriormente evaluada.

Los resultados mostraron una relación entre el efecto del extracto y los grupos de bacterias evaluadas, ambos estudios demostraron que existe efecto antibacteriano sobre organismos Gram positivos, siendo *S. aureus* la especie que mostró un claro efecto inhibitorio, remitiéndonos a la literatura, se ha reportado que el extracto acuoso de *C. album* tuvo actividad inhibitoria contra diferentes patógenos, de igual manera en el estudio de Njume *et al.* se calcularon la CMI y CBM de este extracto, las concentraciones fueron de 0.063 a 7.5 mg/mL y de 2.4 a 10 mg/ mL respectivamente <sup>(69)</sup>.

En otro estudio se expuso que extractos de diferentes solventes de *C. ambrosioides* tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de distintas bacterias, siendo destacado el caso del extracto de acetato de etilo el cual tuvo las CMI más bajas (4.29 mg/ mL), siendo *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*, las bacterias más sensibles a este extracto <sup>(68)</sup>. Esto corrobora los resultados de este estudio donde se puede decir que el género *Chenopodium* tiene capacidades antibacterianas.

Para conocer más a fondo el efecto del extracto sobre las bacterias se determinó su efecto sobre la curva de crecimiento, dando resultados ilustrativos. Se observa que el crecimiento bacteriano con la concentración de CBM del extracto, tiende a mantenerse por abajo del testigo entre 4 y 5 unidades logarítmicas durante las primeras cuatro horas, sin embargo, posterior a esto hay un incremento notable de la UFC/ mL, ésto daría como respuesta que el extracto tiene cierta actividad que no permite el incremento poblacional a las primeras horas de haberse colocado y que es necesaria una segunda dosis para poder mantener una determinada inhibición del crecimiento bacteriano. Si bien se sabe que *S aureus* ha desarrollado distintos mecanismos de supervivencia como lo son la expulsión de sustancias tóxicas por medio de bombas, la capacidad de selectividad en la permeabilidad de membrana y modificación de enzimas en las cuales los antibióticos tiene actividad, entre muchos otros <sup>(70)</sup>. Por ello es importante resaltar que, pese a estos mecanismos, el extracto metanólico de *C. murale* ha tenido un efecto bacteriostático sobre la cepa utilizada. Este es un resultado de la acción de todos los componentes en el extracto, pero dentro de los cuales, los flavonoides

son un grupo al cual se le atribuye parte de esta actividad <sup>(71)</sup>. Existen reportes de los mecanismos por los cuales estos metabolitos inhiben a organismo patógenos, en el caso especial de la quercetina, la cual fue la única sustancia identificada, se ha encontrado que este flavonol tiene la capacidad de inhibir la acción de la DNA girasa en *E. coli*, que está atribuido a la hidroxilación en el anillo B del flavonoide <sup>(72)</sup>. Otra de las propuestas planteada por distintos autores es la acción de estas biomoléculas sobre las enzimas de adhesión de la pared celular a través de uniones hidrógeno-hidrogeno, así como por enlaces covalentes, los cuales resultan en formación de proteínas que pueden inactivar estas enzimas, así como desestabilización de la membrana celular <sup>(73, 74)</sup>.

Al igual que las infecciones por bacterias, aunque menos recurrentes, las infecciones por hongos son un problema sanitario que afecta a varias secciones de la población, haciendo un énfasis en la parte vulnerable de la misma, en los que entran ancianos diabéticos, así como personas con problemas de depresión en el sistema inmune <sup>(75, 76)</sup>. En el caso especial de infección en heridas existen registros donde se ha encontrado que las infecciones por *Candida albicans* es un problema recurrente en personas con heridas, siendo un caso especial las personas que se han expuesto a algún tipo de operación y que en el trascurso de recuperación suelen tener problemas para completarla. Tomando en cuenta el papel que pueda tener el extracto metanólico de *C. murale* contra infecciones por hongos, especialmente por organismos del género *Candida* <sup>(77)</sup>; los resultados mostraron que el extracto metanólico no presentó actividad inhibitoria en las cepas de hongos utilizados, a pesar de ello plantas de este género tienen reportes de actividad antifúngica, se ha reportado que el extracto hexánico de *C. ambrosioides* tuvo actividad contra una especie del género *Candida* <sup>(78)</sup>. Sin embargo, otros autores reportaron que el extracto metanólico crudo de *C. murale* no tuvo actividad inhibitoria ante las dos levaduras mencionadas. Esto puede estar relacionado a los compuestos que se encuentran en esa fracción, y que pueden ser de interés para futuras investigaciones <sup>(60)</sup>.

El hecho de conocer las actividades biomédicas como la capacidad antioxidante, antibacteriana y antifúngica es algo primordial para saber si el extracto de *C. murale* puede ser candidato para ser un buen cicatrizante, bajo este aspecto es importante conocer el nivel

de toxicidad que pueda tener. Ahmad *et al.*, (2003) reportaron que el extracto metanólico de *C. murale* no tuvo efecto tóxico significativo en un modelo de *Artemia salina* y por lo cual se puede decir que el extracto no presenta efectos tóxicos de manera preliminar <sup>(60)</sup>.

Con relación a la toxicidad tópica los estudios de este tipo son escasos, siendo el estudio de Pereira *et al.*, 2009 el más cercano donde se evaluó la toxicidad crónica del extracto etanólico de *C. ambrosioides* mediante un tratamiento oral y en el que se reportó que no hubo signos de toxicidad <sup>(79)</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que los ratones macho que tuvieron contacto con el extracto presentaron una reducción de la epidermis, siendo este un factor determinante en la evaluación toxicológica de productos usados en la piel, por ello mismo un estudio más a fondo de los compuestos es necesario <sup>(37)</sup>.

## CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se llegaron a las conclusiones de que el extracto metanólico de *C. murale*:

- Es un buen candidato para probarse en un modelo de cicatrización.
- No tuvo un efecto tóxico en la piel de ratones.
- Tuvo presencia de compuestos fenólicos, así como flavonoides como la quercetina, los cuales están asociados a la capacidad antioxidante.
- Presentó una capacidad antioxidante baja.
- Fue efectivo al inhibir bacterias tanto Gram positivas como negativas.
- Tuvo efecto bacteriostático sobre *S. aureus*.
- Mostró no tener la capacidad de inhibir a hongos levaduriformes del género *Candida*

Los resultados son preliminares para confirmar que el extracto de *C. murale* tenga capacidad para favorecer al proceso de cicatrización. Sin embargo, tiene propiedades biomédicas que están relacionadas a la cicatrización, siendo la capacidad antibacteriana una de las más importantes. Así mismo una de las cuestiones más importantes a futuro es conocer los compuestos activos de la planta y así determinar el camino que se puede tomar con respecto a esta especie.

## LITERATURA CITADA

1. Ferrándiz Carlos. (2014). Anatomía y fisiología de la piel humana. Puig Sanz L. Dermatología clínica. 1-8. Barcelona. España. Elsevier España.
2. Serna, J., Vitales M., López M.C. y Molina A. Sin fecha. Dermatología. 4. 841-844.
3. Bermúdez S., Herrera M., Hochman A., Moreno H., Mosca I., Rodríguez M., y Videla E. (2008). Consenso sobre cicatrización de heridas. *Sociedad argentina de dermatología*. 1-5 pp.
4. Enoch S., Grey J.E., Harding G.K. (2006). Non-surgical and drug treatments. *ABC of wound healing*. 332. 900-903.
5. Wang A., S. Armstrong E. J., & Armstrong, A. W. (2013). Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. *American Journal of Surgery*, 206 (3): 410–417.
6. Zargari, O. (2008). Pentoxifylline: A drug with wide spectrum applications in dermatology. *Dermatology Online Journal*. 14(11). En: <https://escholarship.org/uc/item/6270c6vm>.
7. Enoch S. y Leaper D.J. (2008). Basic Science of Wound Healing. *Surgery*. 26 (2): 31-37.
8. Atiyeh B., M. Costagliola, S. N. Hayek, S. A. Dibo. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*. 1.139-148.
9. Abozenadah H., Bishop A., Bittner S., Lopez O., Wiley C. y Flatt P.M. (2017) Consumer Chemistry: How Organic Chemistry Impacts Our Lives.
10. Balderas Cordero D. (2019). Evaluación de la actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
11. Salas J., Tello V., Zavaleta A., Villegas L., Salas M., Fernández I. y Vaisberg A. (1994). Actividad cicatrizante del látex de *Jatropha curcas*. *Revista Biología Tropical*. 42 (1): 323-326.

12. Hernández A. B. (2018). Actividad cicatrizante y caracterización química del látex de *Jatropha neopauciflora* en un modelo experimental de diabetes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México
13. Sobia M. Z., Nasir R., Asim M., Fozia A., Munawar I., Muhamad M. y Muhammad S. (2013). Antioxidant, antibacterial, antifungal activities and phytochemical analysis of dagger (*Yucca aloifolia*) leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7 (6): 243-249.
14. Jiménez A.A. (2017). Medicina tradicional. Boletín CONAMED-OPS. 31-34.
15. Cosme Pérez, I. (2008). El uso de plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 24-26. Universidad Veracruzana Intercultural. Consultado el 2 de Agosto del 2019, en: [https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6\\_p23-26\\_2010-0.pdf;jsessionid=8710ABFEA8AA18C70A062193414D76D1?sequence=1](https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6_p23-26_2010-0.pdf;jsessionid=8710ABFEA8AA18C70A062193414D76D1?sequence=1)
16. Ocegueda S., E. Moreno y P. Koleff. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*. 62 (1): 12-15 pp.
17. Boulos L. (1983). Medicinal Plants of North Africa. Algonac, MI: Reference Publications. 103.
18. Gibson, T. E. (1965). Veterinary Anthelmintic Medication, St. Albans, Herts. Technical Communication No.33 of the Commonwealth Bureau of Helminthology
19. Quinlan, M. B., Quinlan, R.J., Nolan, J.M. (2002). Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *Journal Ethnopharmacology*. 80 (1): 75-83.
20. Kaour M., Sharma S., Garg S. y Arora M. (2018). Study of Antibacterial Activity of *Chenopodium album* Leaves Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 10 (1): 1-4.
21. Molina-Mendoza J.L., A. Patiño-Siciliano, R. Galván-Villanueva, A. Patiño-Siciliano y R. Fernández-Nava. (2012). Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica*. 1 (34): 239-271.



22. Kumar S. y A.K. Pandey. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Vol. 2013.
23. Morandi M., Silva V. y Maróstica M.R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. En M.R. Segura. (Ed). *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications*. (pp 33-50). United Kingdom.
24. Babenko L.M., Smirnov O.E., Romanenko K.O., Trunova O.K. y Kosakivska I.V. (2019). Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. *Ukrainian Biochemistry Journal*. 91 (3): 5-18.
25. Viña S. (2013). Compuestos fenólicos. En Ringuélet J y Viña S. (Ed). *Productos Naturales Vegetales*. (pp 91-109). Editorial Universidad de la plata. Argentina.
26. Harborne J.B. (1989). General Procedures and Measurement of Total Phenolics. *Methods in plant Biochemistry*. Vol 1. 1-28.
27. Balasundram N., Sundram K. y Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.
28. Russo R.O. y Spermaza M. (2006). Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de cardiología*. 8 (1). 1-6.
29. Middleton E., Kandaswami C. y Theoharides T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Reviews*. 52 (4). 673-751.
30. Puupponen- Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A. y Oksman-Candente y K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90. 494-507.
31. Pérez G. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 22 (1). 48-57.
32. Merken H.M. y Beecher G. R. (200). Measurement of food by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (3). 587-599.

33. Böhm H., Boeing H., Hempel J., Raab B. y Kroke A. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungsswiss.* 2: 147-163.
34. Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg D. J., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom. W. P., Van Der Vijgh W. J. F. y Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine.* 20 (3): 331-342.
35. Pietta P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products.* 63 (7): 1035-1042.
36. Domínguez X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica.* Ed. Limusa. México. 281.
37. OECD. (2017). OECD guideline for the testing of chemicals. Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure. En: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-402-acute-dermal-toxicity\\_9789264070585-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-402-acute-dermal-toxicity_9789264070585-en)
38. Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology.* 28 (1): 25-30.
39. Singleton, V., Orthofer R. and Lamuela-Reventos R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology.* 299. 152-178.
40. Ramamoorthy P. y Bono A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology.* 2 (1): 70-80.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
42. Nava Solís U. (2017). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de las flores de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M.C Johnst. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Iztacala, Unidad de Biotecnología y Prototipos, laboratorio de Farmacognosia. México.

43. Dini I. G., Tenore C. y Dini A. (2010). Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium* quinoa seeds. *LWT Food science and Technology*.43 (1): 447-451.
44. Dasgupta, N. y De B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. *Food Chemistry*.101 (2): 471-474.
45. Gohar A. A. y M. A. Elmazar. (1997). Isolation of hypotensive flavonoids form *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytochemical research*. 11 (1): 564-567.
46. Vysochina G.I. (2010). Flavonoids of *Chenopodium* L. Genus of World Flora. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 36 (7): 787-792.
47. Al-Jaber, N. (2006). Phytopharmacology and therapeutic values. en: T. C. Li, ed., *Taiwanese native medicinal plants*. USA: Singh, V. K.; Govil, J. N.71-79.
48. Mohammad S., Bilal A., M. I.Q., Mahrukh, Rafiq M. Mubasher A. y Bashir A. (2014). Hepatoactive effect of *Chenopodium murale* in mice. *Bangladesh Journal Pharmacology*. 9 (1): 124-128.
49. Muthanna S. F., Amjed H.K., Omar H.A., Amani A.T. y Yahya S.Y. (2019). GC/MS Analysis of n-Hexane and Chloroform extracts of *Chenopodium murale* leaves in Iraq. *Journal of Pharmaceutical Researchers International*. 31 (6): 1-6.
50. Domínguez Tenorio M. (2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*. 7 (4): 419-431.
51. Evans W.C. (1989). Farmacognosia. Trease-Evans. 13 ed. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill.
52. Halliwell B. y Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press: Oxford.
53. Carvajal C. (2019). Especies reactivas de oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Revista medicina legal de Costa Rica*. 36 (1): 91-100.

54. Gracia Nava Manuel Alejandro. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
55. Abdel-Aziz M.S., Shaheen M. S., El-Nekeety A.A. y Abdel-Wahhab M.A. (2013). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leave extract. *Journal of Chemical Society*. 18 (1): 353-356.
56. Cartaya O. y Reynaldo I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22 (2): 5-14.
57. Nowak R., K. Szewczyk, U. Gawlik-Dziki, J. Rzymowska y L. Komsta. (2016). Antioxidative and cytotoxic potential of some *Chenopodium* L. species growing in Poland. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23 (1): 15-23.
58. Dixon R. A., Dey P. M., and Lamb C. J. (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 55 (1): 2-44.
59. Du F., Zhang F., Chen F., Wang A., Wang Q., Yin X., y Wang S. (2011). Advances in microbial heterologous production of flavonoids. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (18): 2566-2574.
60. Abbas M.N., Rana S.A., Shahid M., Rana N., Mohamood-ul-Hassan M., Hussain M. (2012). Chemical evaluation of weed seed mixed with wheat grains at harvest. *The Journal of Animal & Plants Sciences*. 22 (2): 283-288.
61. Ahmad B., Jan Q., Bashir S., Nisar M., Shaheen F y Ahmad M. (2003). Pharmacological and Biological investigations of *Chenopodium murale* Linn. *Asian Journal of Plant Sciences* 2 (15-16): 1107-1111.
62. Barros Mariutti L.R., Mattos Borreto G.P., Bragagnolo N. y Zerlotti Mercadante A. (2008). Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extracts from Herbs and Spices Commercialized in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51 (6): 1225-1232.
63. Román-Cortés N.R., García-Mateos M.R. Castillo-González A.M., Sahagún-Castellanos J. y Jiménez-Arellanes M.A. (2018). Características nutricionales y nutracéuticas de hortalizas de uso artesanal en México. *Revista Fitotecnológica Mexicana*. 41 (3): 245-253.

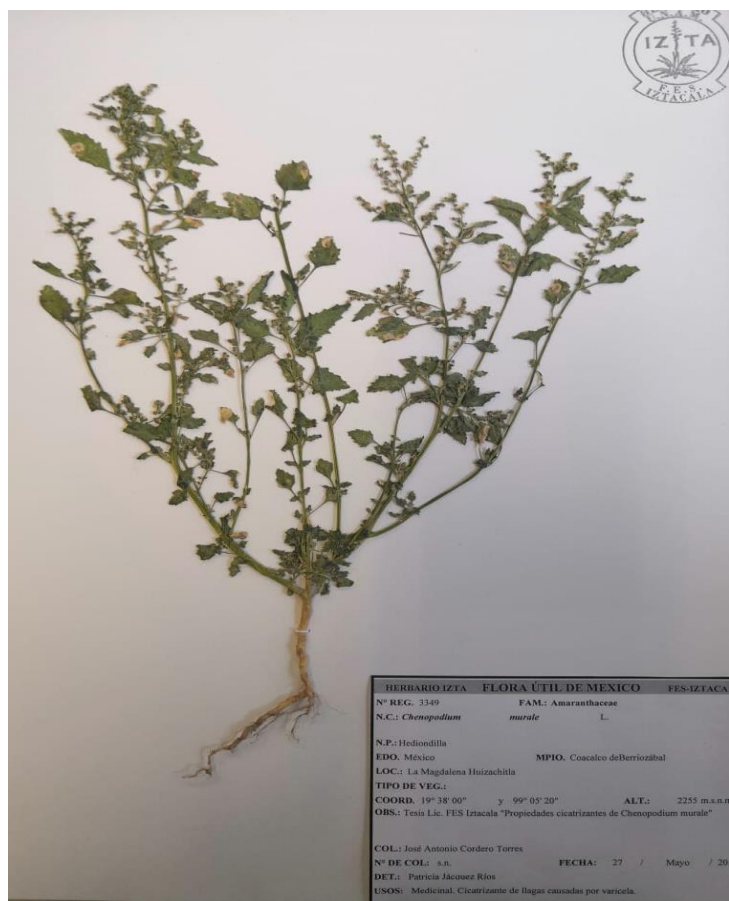
64. Floegel A., Kim D.O., Chung S.J., Koo S. I. y Chun O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal Food Compos. Anal.* 24 (7): 1043–1048.
65. Houghton P., Hylands P., Mensah A., Hensel A. & Deters A. (2005). In vitro test and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of ethnopharmacology.* 100 (1-2): 100-107.
66. Singh K.P., Dwevedi A.K. y Dhakre G. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology.* 2 (3): 398-401.
67. Pandey S. y Gupta S. K. (2014). Screening of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Chenopodium album* (Bathua). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 3 (3): 1-9.
68. Jesus, R. S., Piana, M., Freitas, R. B., Brum, T. F., Alves, C., Belke, B. V., Mossmann, N. J., Cruz, R. C., Santos, R., Dalmolin, T. V., Bianchini, B. V., Campos, M., & Bauermann, L. F. (2017). In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian Journal of Microbiology.* 49 (2): 296–302.
69. Njume C., Gqaza B.M., George G. y Goduka N.I. (2014). In vitro antimicrobial evaluation of two indigenous functional food-plants (*Chenopodium album* and *Solanum nigrum*) used in the Oliver Reginald (O. R.) Tambo district municipality of South Africa. *African Journal of Microbiology Research.* 8 (41): 3612-3616.
70. Lacueva Arnedo Manuel. (2017). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*, evolución y perspectiva actual. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
71. Cushnie T.P.T. y Lamb A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26. 343-356.
72. Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P. y Barret J.F. (1992). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity if some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 3 (2): 225-230.

73. Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
74. Mishra A.K., Mishra A., Kehri H.L., Sharma B. y Pandey K. (2009). Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 8 (9):1-7.
75. Calle J. y Cardona N. (2009). Micosis más prevalente en pacientes con VIH/SIDA, correlación con el estado inmunológico del huésped. *Revista de Asociación Colombiana de Dermatología*. 17. 211-220.
76. Mayayo E., Klock C., Goldani L.Z., Zanella A.C. y Capilla J. (2010). Infección múltiple fúngica en un paciente diabético. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27 (3): 140-143.
77. Malani P.N., McNeil S.A., Bradley S.F. y Kauffman C.A. (2002). *Candida albicans* Sternal Wound Infections: A Chronic and Recurrent Complication of Median Sternotomy. *Clinical Infectious Diseases*. 35 (11): 1316-1320.
78. Sousa Z. L., F. Faustino de Oliveira, A. Oliveira da Conceição, L. A. Mattos Silva, M.H. Rossi, J. da Silva Santos y J. Luciano Andrioli. (2012). Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11 (20): 1-7.
79. Pereira W.S., Ribeiro B.P., Anidales I.P., Serra C.P. B., Mattar N.S., Fortes T.S., Reis A.S., Silva L.A., Borraqueiro E.S.B., Guerra R.N.M. y Nascimento F.R.F. (2010). Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 127. 602-605.
80. Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
81. Gross E. G., Pomilio A.B., Seldes A.M., Burton G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaria general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. D.C. 25-31.

82. Mathews C.K., Holde K.E. Ahern K.G. (2002). Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. España. 166-170.
83. Okusa P. Penge O., Devleeschouwe y Duez M. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*.112. 476-481.
84. Mateos-Maces L., Chávez-Servia J.L., Vera-Guzmán A. M., Aquino-Bolaños E.N., Alba-Jiménez J.E. y Villagómez-González B.B. (2020). Edible Leafy from Mexico as Sources of Antioxidant Compounds, and Their Nutritional, Nutraceutical and Antimicrobial Potential: A Review. *Antioxidants*. 9 (541): 1-24.
85. Kalita P., Barman T.K., Pal T. K. y Kalita R. (2013). Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3 (4): 33-37.

**Apéndice 1.** Descripción de la especie <sup>(80)</sup>

*Chenopodium murale* L. (Figura 11), es una hierba anual, erguida o ascendente, de 10 a 60 cm de alto; tallo por lo general profusamente ramificado desde la base, a veces algo farinoso; peciolo delgados, hojas ovadas o rómbicoovadas, de 2 a 7 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, irregularmente sinuado-dentadas, farinosas en el envés, sobre todo cuando tiernas; inflorescencias en forma de pequeños glomérulos de cimas o panículas axilares o terminales, más bien cortas; perianto de 1mm de largo lobulado, los lóbulos farinosos, algo aquillados, envolviendo el fruto de manera incompleta; pericarpio adherente, semilla horizontal, finamente punteada, biconvexa, de 1.5 mm de diámetro, con el borde atenuado. Coloquialmente llamada “Hediondilla”, se registra en el centro de México en Epazoyucan, Teotihuacán, Texcoco, Ciudad de México, Tláhuac, Xochimilco y Milpa Alta. Se encuentra en alturas de 2250-3000 msnm. Se considera una maleza bastante común. Nativa de Occidente, pero ampliamente naturalizada en América.



**Figura 11.** *Chenopodium murale* L. Ejemplar depositado en el herbario IZTA.



## **Apéndice 2.** Técnica histológica ordinaria

La técnica se basa en 4 puntos a seguir; deshidratación del tejido, impregnación en solvente, infiltración, y tinción. Dentro de cada uno existen puntos a tratar que se desarrollaran a continuación.

### **Deshidratación**

En este paso los tejidos son sumergidos en formol 4% durante 24 horas, posterior a esto se coloca en un tren de alcohol, que incluye concentraciones de 70% al 100%, esto se realiza de manera ascendente. En las concentraciones de 70,80, 90% se dejan los tejidos durante 2 horas en cada uno, mientras que en el alcohol 100% se deja una hora como máximo de tiempo.

### **Impregnación**

Posterior al tiempo de deshidratación, los tejidos son colocados en Butanol I durante 1 hora, luego de esto se colocan en Butanol II durante otra hora, se debe retirar el exceso de butanol antes de pasar las muestras a parafina.

### **Infiltración**

Las muestras son colocadas en un frasco con parafina I dentro de un horno a 60° C, esto se realiza durante 24 horas. Después se realiza el mismo procedimiento en parafina II, durante otras 24 horas.

### **Inclusión en parafina**

Se llenan moldes de metal con parafina para inclusión recién salida del horno, los tejidos son retirados del frasco donde de llevo a cabo la infiltración, con una pinza se flamea en un mechero la muestra y se coloca en el monde anteriormente mencionado.

### **Baño de flotación**

Previo a los cortes en el microtomo, se coloca agua destilada y grenetina en el baño de flotación.

### Corte en el micrótopo

En un micrótopo se coloca el bloque de parafina con la muestra incluida, que anteriormente fue refrigerada durante 24 horas (en caso de que el bloque se caliente con la fricción de la navaja, se cambia de muestra). Antes de realizar cortes, la muestra debe ser rebajada, esto se puede realizar en cortes de 10  $\mu\text{m}$ , luego de esto se hacen cortes a 5  $\mu\text{m}$ , se colocan en un portaobjetos y se agrega alcohol al 50% para extender el tejido. Después de esto se lleva al baño de flotación para acomodar y extender los tejidos. Las muestras se dejan en el portaobjetos.

### Tinción de Hematoxilina-Eosina

Las muestras son colocadas en canastillas de metal y se desparafinan en una estufa durante 3 horas aproximadas. Después de esto se llevan al siguiente tren de tinción.

**Cuadro 8.** Pasos de la técnica histológica

No.	Alcohol	Tiempo
1	Xilol I	5 minutos
2	Xilol II	10 minutos
3	Alcohol etílico 100%	10 lavados
4	Alcohol etílico 90%	10 lavados
5	Alcohol etílico 80%	10 lavados
6	Alcohol etílico 70%	10 lavados
7	Agua	10 lavados
8	Hematoxilina	5 minutos
9	Agua	10 lavados
10	Alcohol ácido	1 lavado
11	Agua	10 lavados
12	Carbonato de litio	Hasta que vire
13	Agua	1 lavado
14	Alcohol etílico 100%	10 lavados
15	Eosina	7 minutos
16	Alcohol etílico 70%	10 lavados

17	Alcohol etílico 80%	10 lavados
18	Alcohol etílico 90%	10 lavados
19	Alcohol etílico 100%	10 lavados
20	Xilol III	10 lavados
21	Xilol IV	Hasta que las muestras se monten con parafina

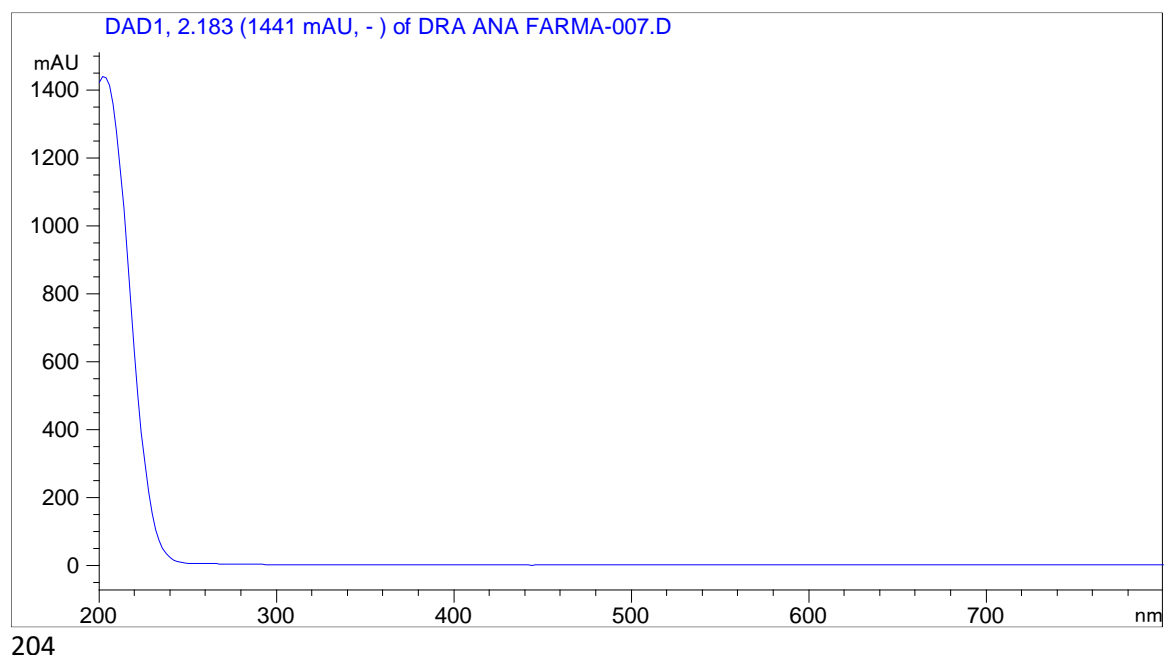
### Apéndice 3. Caracterización fitoquímica por medio de HPLC-DAD <sup>(81, 82)</sup>

Este método es utilizado con distintos fines, la identificación, purificación y cuantificación de componentes en productos naturales. Este tipo de cromatografía en columna se basa en las interacciones que pueden tener con las distintas fases que hay en la columna cromatográfica.

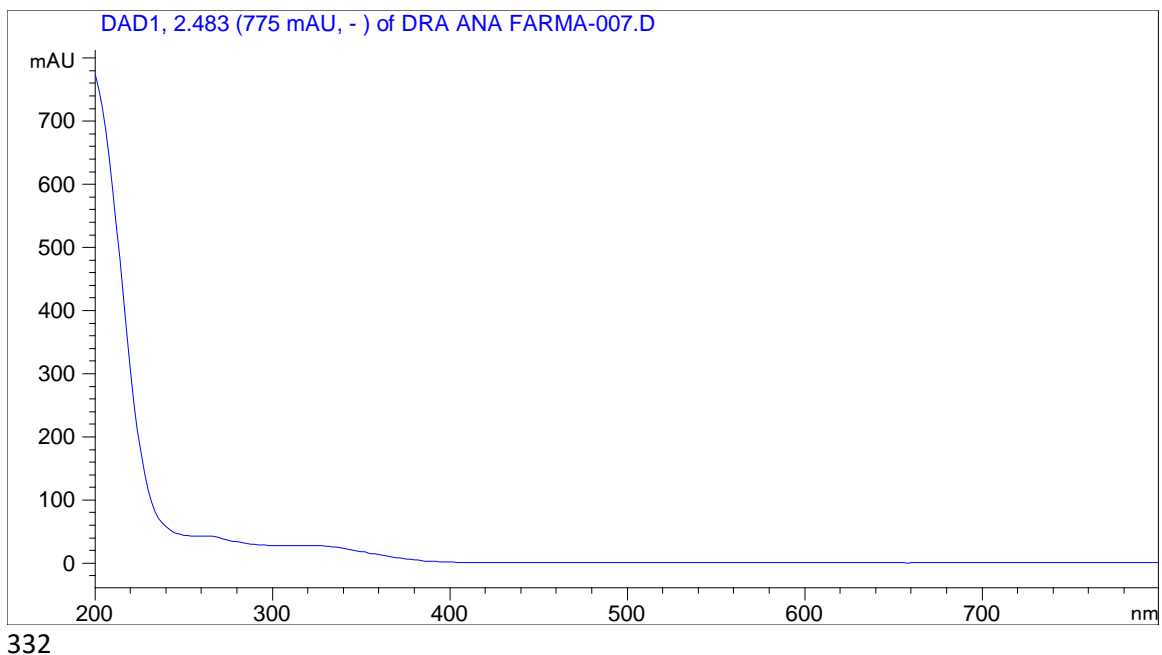
#### Condiciones del HPLC

Se inyectaron 30  $\mu$ L del extracto metanólico, a una concentración de 3 mg/ mL, se utilizó una columna ALLSPHERE ODS-1, con una fase móvil de Metanol: Acetonitrilo: Agua (25:25:50).

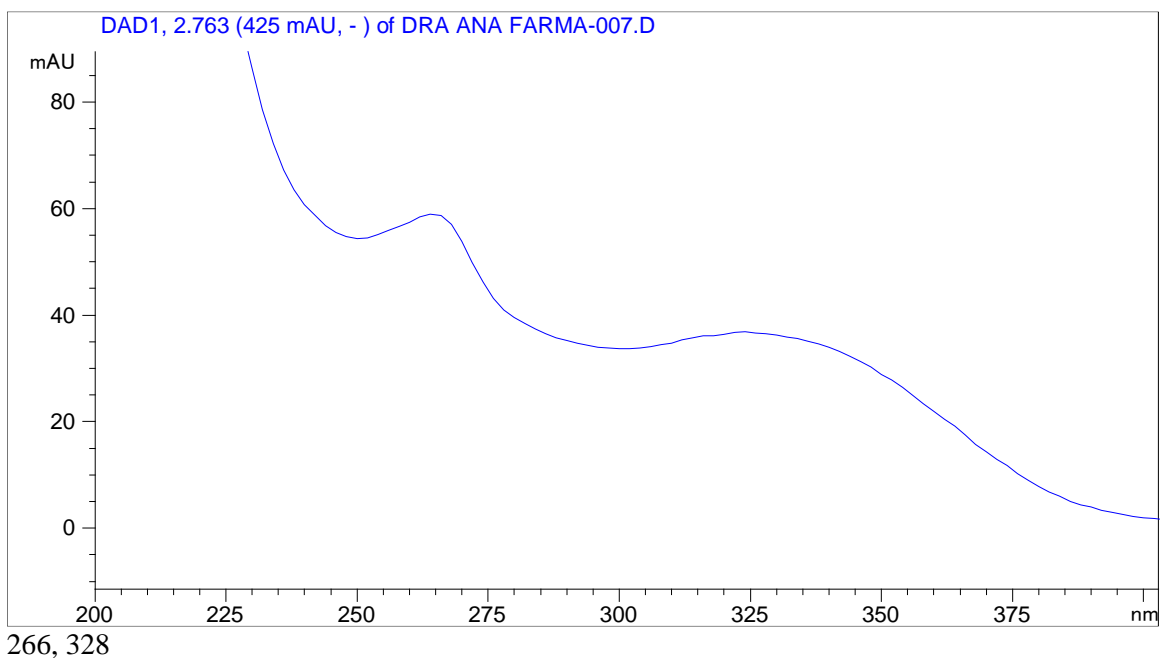
#### Espectros de luz UV



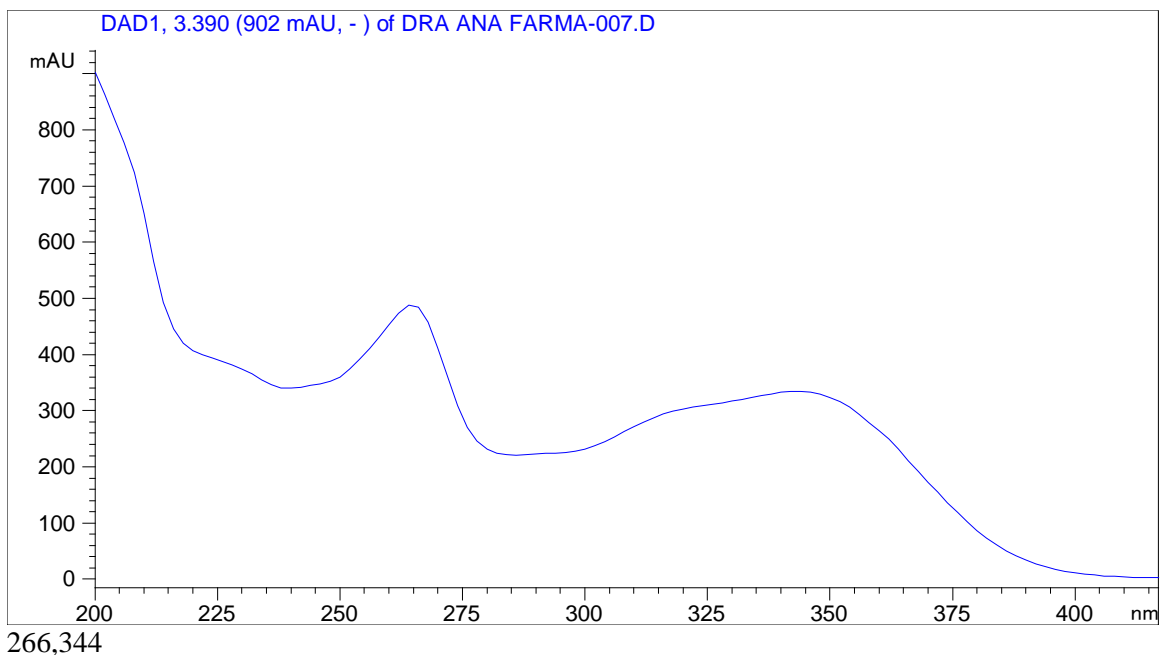
**Figura 12.** Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 1.



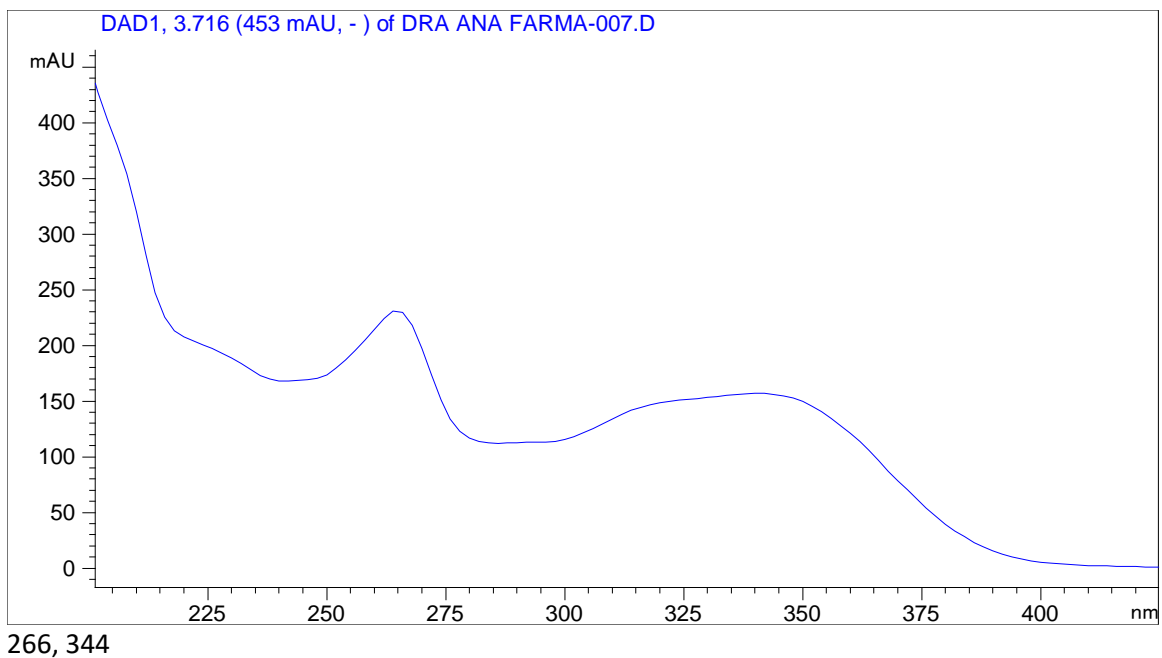
**Figura 13.** Espectro de luz ultravioleta del ácido fenólico encontrado número 2.



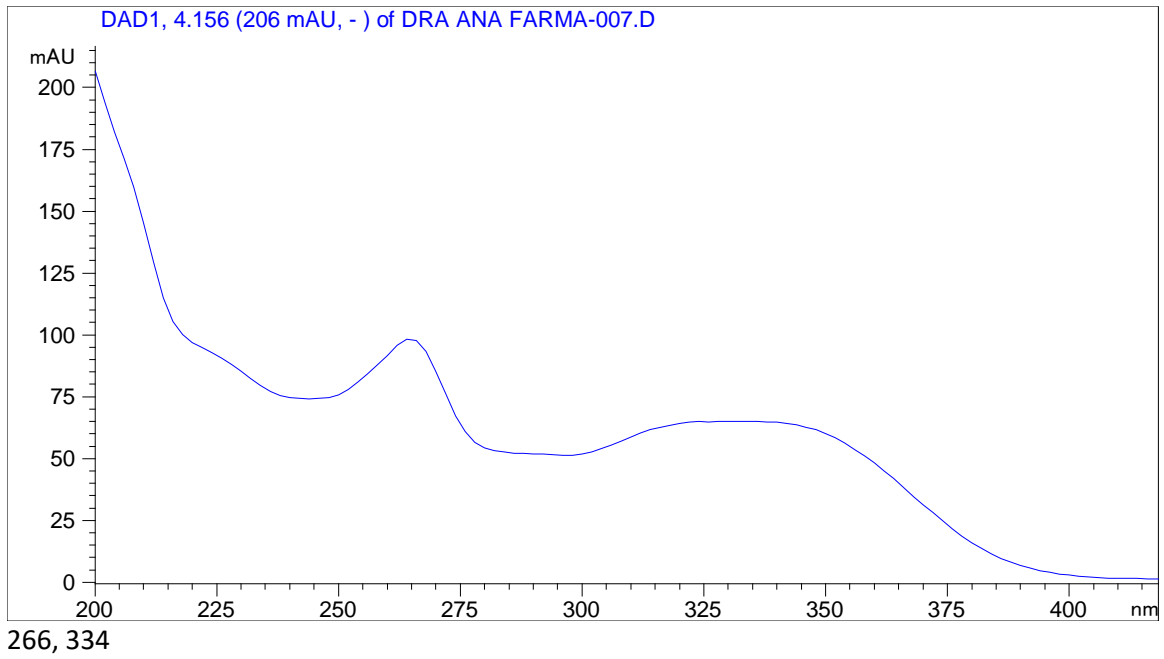
**Figura 14.** Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 3.



**Figura 15.** Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 4.



**Figura 16.** Espectro de luz ultravioleta de compuesto no identificado número 5.



**Figura 17.** Espectro de luz ultravioleta de quercetina.

**Apéndice 4.** Capacidad antioxidante evaluada por el método de reducción del radical 2,2-dinofil-1-picrilhidracil (DPPH) <sup>(83)</sup>.

### **Fundamento**

Existen distintos grupos de compuestos químicos como los fenólicos entre ellos los fenoles y flavonoides, así como los alcaloides, carotenoides, betalainas y saponinas que confieren propiedades antioxidantes <sup>(84)</sup>. Para poder medir esta capacidad se utilizó el método de reducción del (DPPH), el cual se basa en una reacción oxido-reducción y la característica de este radical, al presentar un electrón desapareado y tener una coloración azul-violácea, se puede medir el cambio de color a un amarillo pálido en contacto con alguna sustancia con propiedades antioxidantes. Este cambio es medible por espectrometría UV-VIS, cuantificando la concentración a la cual el radical es reducido en un 50%.

### **Solución metanólica de DPPH**

Para la preparación de la solución DPPH se pesan 0.002 g de este compuesto en polvo y se colocan en un matraz aforado junto a 50 mL de metanol grado HPLC.

### **Metodología**

Se prepara una curva de concentraciones de la solución problema que tenga 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg/mL usando metanol grado HPLC como solvente y se colocan 50 µL en una placa ELISA de 96 pozos (tres pozos por concentración), a esto se le adiciona 150 µL de la solución DPPH. Posteriormente se cubre con papel aluminio y se coloca en una incubadora durante 30 minutos a 37° C. Luego de esto se lee a una longitud de onda de 540 nm.

### **Interpretación de los resultados**

El porcentaje de reducción del radical DPPH se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de Reducción de DPPH} = (C - E / C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH disuelto en metanol

E= Absorbancia experimental (Absorbancia DPPH + solución problema)



## **Apéndice 5.** Cuantificación de fenoles totales <sup>(39)</sup>.

### **Fundamento**

Las técnicas para evaluar el contenido de fenoles totales, tiene como base las características de estos compuestos. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfomolibdico y fosfotungstónico, tiene una coloración amarilla y se encuentran en un estado de oxidación  $6^+$ . Debido a una transferencia de electrones a pH básico, estos agentes son oxidados y forman especies cromógenas de color azul, como el tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La cantidad de estos cromógenos es proporcional a la cantidad de grupos hidroxilos presentes en los fenoles.

### **Metodología**

#### **Curva patrón**

Se prepara una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se forman alícuotas para poder obtener las concentraciones de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL). a cada una se le agrega la cantidad suficiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

#### **Solución problema**

Para el problema se realiza una solución estándar 200  $\mu$ g/mL, y a partir de esta se toman 250  $\mu$ L y a ello se le agregan 750  $\mu$ L de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Después de esto de cada concentración se toma 1 mL y se coloca en un tubo de ensaye con 7 mL de agua destilada, posteriormente se agregan 500  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 minutos se añaden 1.5 mL de una solución de  $Na_2CO_3$  a una concentración de 200 g/L, adicional a esto se agrega la cantidad suficiente de agua destilada para completar un volumen de 10 mL.

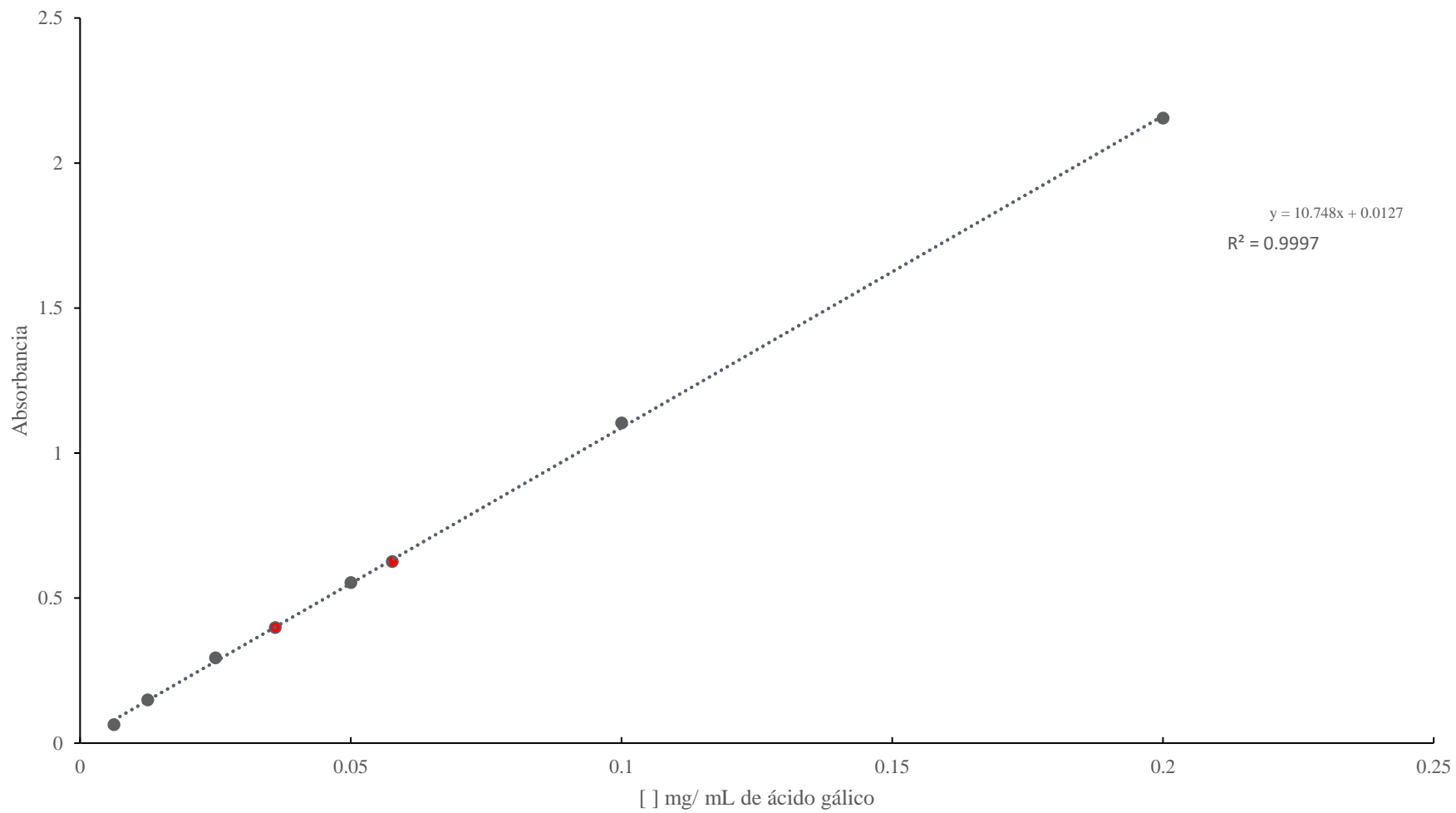
Para la cuantificación de fenoles totales se utiliza espectrometría UV-VIS, para ello se mide la proporción de cambio que hay entre el color amarillo del reactivo Folin-Ciocalteu y el resultado de agregar una sustancia que contenga algún fenol y de un color azul, para esto el espectrofotómetro se ajusta a una longitud de onda de 750 nm.

**Cuadro 9.** Cantidades necesarias para preparar curva de calibración de ácido gálico.

<b>Tubo</b>	<b>Ácido gálico (mg/mL)</b>	<b>Patrón (ácido gálico <math>\mu</math>L)</b>	<b>Agua destilada (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Agua destilada (mL)</b>	<b>Folin-Ciocalteu (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (mL)</b>
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	969.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.0250	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5
Problema	-----	500	500	7	500	1.5

### **Interpretación de los resultados**

Para obtener la concentración de fenoles totales se grafica la concentración en el eje de las abscisas y la absorbancia en el eje de las ordenadas (y), con esto se realiza la curva patrón de ácido gálico. Después de esto se realiza un análisis de regresión lineal, y se interpola la absorbancia de las muestras problema. Los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico.



**Figura 18.** Curva patrón de ácido gálico, en rojo muestras problema.

## Apéndice 6. Cuantificación de flavonoides <sup>(40)</sup>.

### Fundamento

Este método se basa en la característica que tiene el  $\text{AlCl}_3$  de virar a un color amarillo debido a la formación de complejos estables ácidos, junto a l grupo ceto que hay en el C-4, el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de las flavonas y flavonoides. También considera la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides <sup>(85)</sup>.

### Metodología

#### Curva patrón

Se prepara una solución stock de quercetina, para ello se pesan 3 mg del reactivo en cuestión y se disuelven en 3 mL de metanol grado HPLC. Posteriormente se toman alícuotas necesarias del stock para preparar la curva con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 ppm.). Después de esto se le agrega 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% a la curva de calibración y la solución problema.

Para las diluciones de 1 a 5 ppm se realiza el siguiente procedimiento:

Del stock de quercetina se toma 20  $\mu\text{L}$  y se agregan 180  $\mu\text{L}$  de metanol, obtenido un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , luego de este stock se toman las siguientes cantidades:

**Cuadro 10.** Cantidades necesarias para preparar la curva patrón de quercetina.

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ de stock de quercetina	$\mu\text{L}$ de Metanol	$\text{AlCl}_3$ al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Para las demás concentraciones se usa el primer stock de quercetina (3 mg en 3 mL de metanol). Para ello se toman las siguientes cantidades.

[ ] ppm	μL stock de quercetina	μL de metanol
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

### **Solución stock del problema**

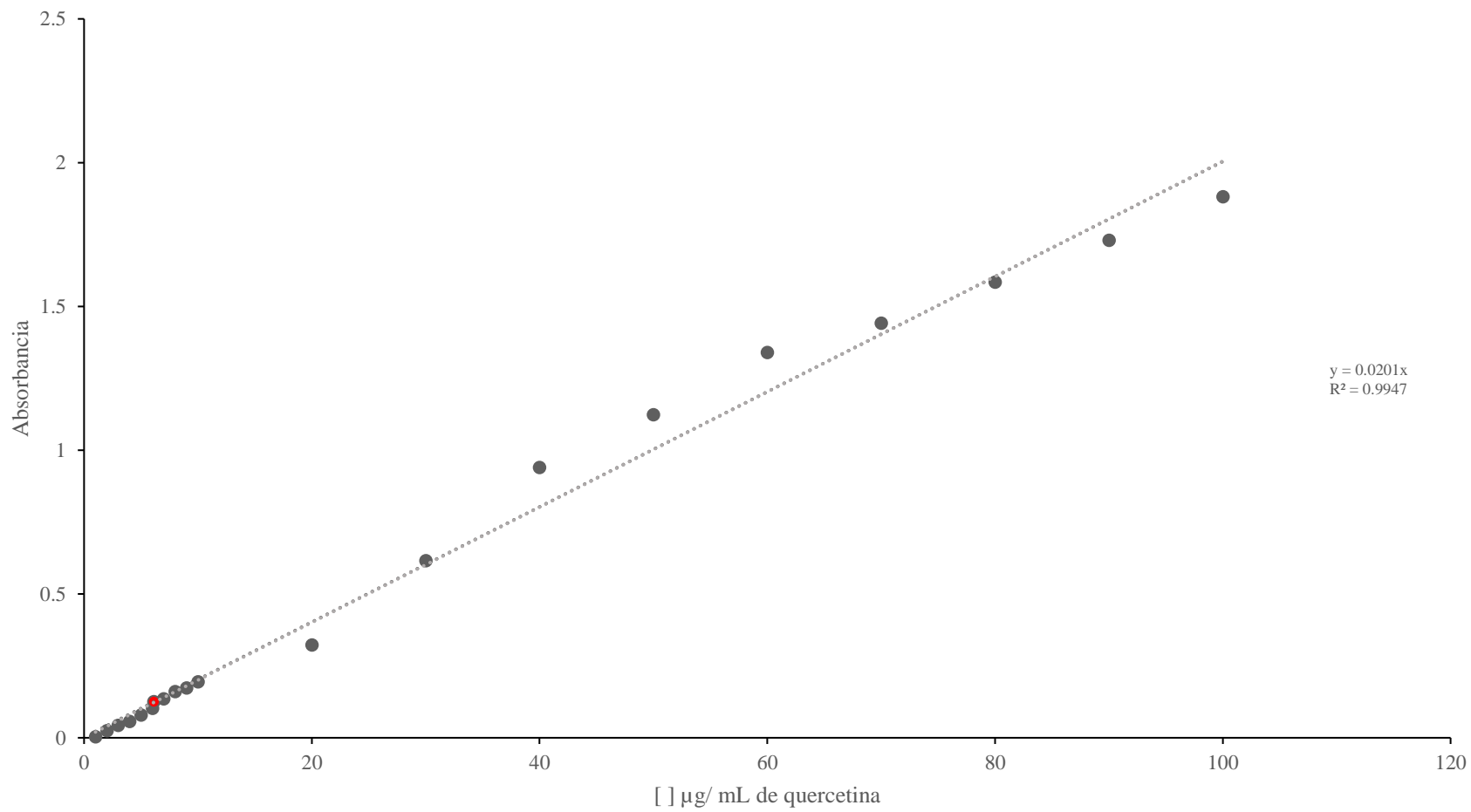
Se pesa 3 mg del extracto metanólico y se disuelven en 3 mL de metanol grado HPLC.

Después de esto se vierte 200 μL de las soluciones preparadas, la curva patrón, problema y los blancos (metanol grado HPLC y AlCl<sub>3</sub>) en una placa ELISA de 96 pozos (se colocan 3 pozos por solución). Luego de 10 minutos se lleva a un espectrofotómetro y se lee a 450 nm.

## **Interpretación de los resultados**

Para obtener los valores de absorbancia de la curva de calibración, así como la muestra problema se realiza una corrección. Al stock de quercetina se le resta la absorbancia del blanco de  $\text{AlCl}_3$  y la solución problema se le resta la absorbancia del blanco de metanol.

Para saber la concentración de flavonoides totales en el extracto se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia del extracto en la curva calibración, para ello se grafica la concentración en el eje de las abscisas y la absorbancia en el eje de las ordenadas (y). Los resultados son expresados en equivalentes de quercetina por gramo de extracto (eq Q/g).



**Figura 19.** Curva patrón de la concentración de flavonoides, en rojo se muestra la solución problema.

## **Apéndice 7.** Método de difusión en agar Kirby-Baüer<sup>(41)</sup>.

### **A) Bacterias**

#### **Medio**

El medio seleccionado para el cultivo de bacterias fue el medio Müller-Hilton, el cual fue seleccionado debido a que es rico en nutrientes y por no ser un medio selectivo, por tanto, promueve el crecimiento de colonias bacterianas de una forma eficiente comparado a otros medios, para su preparación se pesan 22.8 g de medio en polvo y se diluyen en 300 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se lleva a punto de ebullición en una parrilla eléctrica y se esteriliza en una autoclave. Posteriormente se coloca en cajas Petri de medidas estándar, procurando que el espesor sea de 4 mm. Esta medida es la recomendada debido a que cuando hay un espesor menor, los antibióticos tienden a difundirse de manera lateral aumentando la zona de inhibición en esa fracción de la caja, en el caso de ser al contrario y que el espesor fuera mayor, los antibióticos tienden a difundir de manera vertical disminuyendo el área de inhibición.

#### **Inóculo**

Para esta preparación con un asa bacteriológica de siembra, se toman de 3 a 5 colonias de la cepa seleccionada, posteriormente se colocan en un tubo con 10 mL de caldo nutritivo Müller-Hinton y se coloca en una incubadora durante 24 h a 37° C o hasta que se note una turbidez equivalente al estándar número 0.5 de McFarland que equivale a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ mL. Después de esto un hisopo de poliéster estéril se sumerge (es importante considerar retirar el exceso de líquido) en el tubo y la muestra tomada se inocula en la superficie de la placa anteriormente preparada. Para conseguir una distribución parcial de la muestra se realiza una línea al medio de la caja, cada mitad se estría a manera de cubrir la mayor superficie posible.

#### **Sensidiscos**

Se impregnaron sensidiscos de 0.5 mm con una solución stock de 40 mg/ 200 µL de extracto, tomando 10 µL para cada sensidisco. Como control positivo se usó un stock 1 mg/ 400 µL de cloranfenicol.



## **B) Hongos levaduriformes**

### **Medio**

En el caso de hongos levaduriformes el medio seleccionado es el agar PDA (agar Papa-Dextrosa). Para este caso la preparación del medio se realiza pesando 11.7 g del medio sólido y se disuelve en 300 mL de agua destilada (esto es para la preparación de 10 cajas). Las indicaciones siguientes son las mismas expuestas para la preparación del medio de cultivos bacterianos.

### **Inóculo**

Se siguen las indicaciones descritas para el inóculo de bacterias, solo que en este caso el medio para su crecimiento será caldo Sabouraud, para su preparación se pesan 3 g y se disuelven en 100 mL (preparación para 10 tubos de caldo).

### **Sensidiscos**

Para los hongos se usó una solución stock 8 mg/ 200 µg del extracto metanólico y se tomaron 10 µL para cada sensidisco. Para el control positivo se usó un stock de 1 mg/ 200 µL de Nistatina y del cual se tomó 10 µL para cada disco

## **Apéndice 8.** Microtécnica de dilución en caldo <sup>(41)</sup>.

Con esta técnica se usa para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) y la concentración mínima bactericida (CBM de igual manera por sus siglas en inglés).

### **Medio**

En esta técnica se usa el mismo principio ocupado en la macrodilución en agar, solo que en este caso la actividad antimicrobiana se determina en fase líquida, para ello se colocan diluciones del extracto en una placa ELISA junto a bacterias en medio líquido. Primero se prepara una solución stock del extracto disuelto en caldo con una concentración de 80 mg/mL de la cual se toman alícuotas para obtener concentraciones en orden descendente.

### **Inóculo**

Con un asa de siembra se toman de 3 a 4 colonias de la cepa con las que se quiere trabajar, posteriormente se coloca en un frasco con 10 mL de caldo Müller-Hinton y se colocan en una incubadora durante 24 horas a 37° C o hasta que haya turbidez en el medio, posterior a esto se realiza una dilución tomando 1 mL del suspendido de bacterias y se deposita en un frasco con 5 mL de solución salina al 0.9%.

### **Testigo**

El grupo testigo se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton junto a 50 µL de la dilución de bacterias.

### **Metodología**

Se colocan 50 µL de caldo Müller-Hinton en todos los pozos de la placa exceptuando la primera fila, en esta se colocan 100 µL del stock del extracto, posteriormente se realizan diluciones tomando 20 µL de estos pozos y colocándolos en las pozos contiguo-inferiores, esto se realiza hasta la penúltima fila, en la última fila se colocan los testigos. Posteriormente se añade 50 µL de la cepa seleccionada y se incuba la placa durante 24 horas a 37° C.

### **Interpretación de los resultados**

Después del tiempo de incubación se agregan 50  $\mu$ L de una solución al 0.08% del revelador TTC (Sal de tetrazolio oxidasa). Después de esto se incuba por 30 minutos.

Una vez hecho esto en los pozos que exista desarrollo de organismos, el colorante será reducido a formazán, este tiene una coloración violácea. En caso de que no existiera desarrollo bacteriano el pozo permanecerá traslucido.

Para conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC) se observa la placa y en los pozos en los que se note una disminución en el crecimiento bacteriano, mientras que la concentración bactericida media es en la que no haya presencia de desarrollo bacteriano.

## **Apéndice 9.** Efecto del extracto en el crecimiento bacteriano<sup>(41)</sup>.

Esta técnica es usada para conocer el efecto del extracto sobre el crecimiento bacteriano, esto se basa principalmente en la MIC y CBM. Para ello se tendrán las bacterias en contacto con el extracto durante 24 horas divididos en 9 tiempos (T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub>).

### **Medio**

Se coloca agar Müller-Hinton en cajas septadas, como se mencionó anteriormente, se procura que el espesor sea de 4 mm, y que esta difundido uniformemente.

### **Inóculo**

Se colocan bacterias recogidas con un asa de siembra, en un frasco con 10 mL de caldo Müller-Hinton y se colocan en una incubadora a 37° C durante 24 horas, se estima que la concentración después del tiempo transcurrido es de  $1 \times 10^8$  bacterias/ mL, con una micropipeta se inoculan 0.1 mL de la cepa bacteriana en frascos con las concentraciones del extracto a evaluar.

### **Concentraciones del extracto**

En tubos con caldo Müller-Hinton, se preparan las concentraciones a evaluar, en este caso se utilizó la MIC, ½ MIC y la CBM además de un tubo testigo solo con caldo e inóculo de bacterias.

Cada hora se debe realizar una siembra de baterías (esto solo se hace del T<sub>0</sub> al T<sub>4</sub>), colocando una muestra en cada septo de la caja. Después de este proceso los sembrados se harán cada dos horas hasta el T<sub>6</sub>, después de esto se dejan las muestras el tiempo suficiente para completar 12 horas, de igual manera se hace una siembra en este tiempo, después pasadas 24 horas se realiza la última siembra. En cada tiempo se realizan dos diluciones para conocer las unidades formadoras de colonias.

### **Interpretación de los resultados**

Para obtener los resultados se hace un conteo de las colonias formadas en cada concentración, así como en las diluciones. Después se grafica el logaritmo base 10 del número de colonias sobrevivientes contra el tiempo, así con esto se conoce la cantidad de dosis necesaria para

que haya un efecto de inactivación. Esto se hace obvio en la curva de supervivientes una vez esta se logra mantener de manera paralela al eje de las abscisas.