

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA, ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIBACTERIAL *IN VITRO* DE *Flourensia retinophylla*, PLANTA ENDÉMICA
DEL SEMIDESIERTO DE COAHUILA

Tesis

Que presenta MARY CRUZ VICTORINO JASSO
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

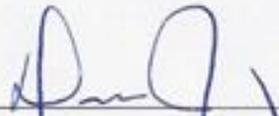
Saltillo, Coahuila

Julio 2016

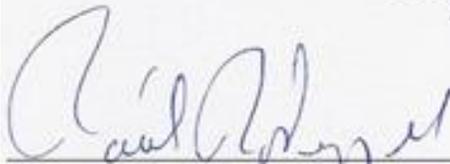
ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA, ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIBACTERIAL *IN VITRO* DE *Flourensia retinophylla*, PLANTA ENDÉMICA
DEL SEMIDESIERTO DE COAHUILA.

Tesis

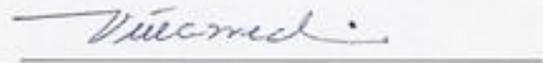
Elaborada por MARY CRUZ VICTORINO JASSO como requisito parcial para
obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de
Producción con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



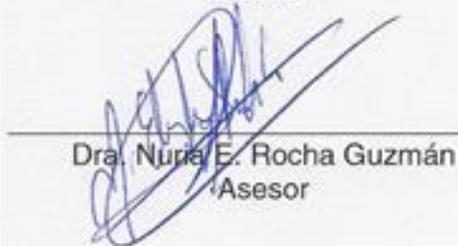
Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor principal



Dr. Raúl Rodríguez García
Asesor



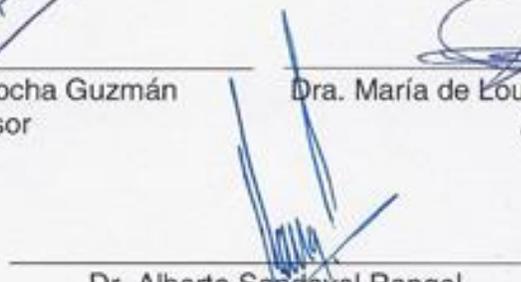
Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. Nuria E. Rocha Guzmán
Asesor



Dra. María de Lourdes V. Díaz Jiménez
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado
UAAAN

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron en la realización de este proyecto, gracias por su valioso tiempo y dedicación.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, es un honor haber estudiado en esta Universidad, gracias por su inestimable apoyo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** número de becario **618553** por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Diana Jasso Cantú** por motivarnos a redoblar esfuerzos para dar lo mejor de nosotros, por su valiosa e invaluable apoyo para la realización de la presente investigación, gracias por la gran oportunidad que me brindo de poder formar parte de su gran equipo de trabajo, por su confianza, tiempo y dedicación invertidos en este largo y arduo proceso, gracias tiene Usted mi más grande admiración, respeto y cariño, lo que un día fue una meta en mi vida culmina el día de hoy gracias a Usted, que orgullo haber sido su estudiante.

“Excelente maestro es aquel que, enseñando poco, hace nacer en el alumno un deseo grande de aprender” Arturo Graf.

Al **Dr. Raúl Rodríguez García** por sus consejos, aportaciones y apoyo incondicional y tiempo invertido en la elaboración de este trabajo, con admiración y respeto para Usted.

Al **Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla** por su acertada aportación en la realización de este proyecto de investigación así como también por su apoyo en la colecta e identificación de *Flourensia retinophylla*.

A la **Dra. Ma. De Lourdes V. Díaz Jiménez** quisiera expresarle mi agradecimiento por su gran colaboración, dedicación y entusiasmo que

demonstró en la realización de este proyecto, gracias por sus valiosas aportaciones y por permitirnos trabajar en el Laboratorio de Revaloración de Residuos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Saltillo con gran admiración y respeto para Usted.

A la **Dra. Nuria E. Rocha Guzmán** y **Dra. Martha R. Jiménez Moreno** les agradezco por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo de investigación por medio de la estancia de investigación realizada en el Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos de la Unidad de Postgrado de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UPIDET) del Instituto Tecnológico de Durango.

Al **M.C. Fidel Peña Ramos**, por su conocimiento transmitido y apoyo en el análisis de datos de este trabajo de investigación, gracias Maestro.

A la **M.C. Lourdes Candelaria García Hernández** gracias por tu apoyo.

Con agradecimiento para **T.A. María Guadalupe Moreno Esquivel**, **T.A. Edith Chaires Colunga** gracias Edith por tu apoyo, **T.A. Olga L. Solís Hernández**, **T.A. María L. Rodríguez González**, **C. Juan José Valenzuela** gracias por su colaboración, fue un placer formar parte de su gran equipo de trabajo, unido y emprendedor.

A mis compañeros de Maestría que juntos comenzamos este largo camino, **M.C. Lupita Ramírez Zavala**, **Ing. Martha Del Ángel**, **Ing. Yunior Hernández**, **M.C. Kelvin López**, **Ing. Verónica Cortez**.

Dedicatoria

A Dios principalmente, gracias por darme fuerzas cuando me sentí derrotada, cansada y sin ganas de seguir, por poner en mi camino a las personas indicadas para poder concluir una meta más en mi vida, las peores batallas las he librado de rodillas ante ti.

*A mis dos más grandes amores que me impulsaron para lograr una meta más en mi vida, mi **María Fernanda Reyes Victorino** te amo con todo mi corazón mi pequeña gracias por esperarme siempre con los brazos abiertos pero cada sacrificio que hice fue por ti, eres el motivo más grande que Dios me dio para seguir adelante, María eres mi todo, y gracias a ti me levanto cada día, a mi esposo **Alejandro Reyes Sebastián** por el apoyo incondicional para seguir en este largo proceso, por motivarme y enseñarme que jamás debo abandonar, que puedo alcanzar cualquier cosa que yo me proponga, por creer en mí como lo has hecho, juntos vamos construyendo nuestros sueños de la mano de Dios, gracias por todo amor te amo y cada día yo te vuelvo a elegir. Los tiempos de Dios son perfectos y me lo confirmo contigo. Este logro es dedicado para Ustedes.*

*Gracias a mi familia por su apoyo incondicional y su amor, a mis padres **Cruz Victorino Gallegos** y **Cristina Jasso Galván** gracias por darme la vida y apoyarme para concluir una meta más en mi vida, por sus enseñanzas que han formado lo que soy el día de hoy. A mis hermanos **Gerardo** y **Ana Gabriela Victorino Jasso**, juntos vivimos grandes momentos y aventuras de niños y ahora agradezco su apoyo y cuidados y por querer a mi pequeña como suya. Los amo familia gracias por estar ahí para mí cuando más he necesitado de Ustedes.*

*Gracias infinitas a mi segunda familia Reyes Sebastián quien me acogió y acepto como miembro de su familia, al **Sr. Marcelino Reyes** y **Sra. Josefina Sebastián** gracias por sus consejos y su apoyo, el saber que cuento con Ustedes ha sido pieza fundamental para concluir con mis estudios de Maestría, gracias también a **Josefina, Vianey, Lorenzo, Pablo, Eduwiges** y **Emmanuel Reyes Sebastián** por estar presentes. Con gran cariño a mis amigas **Gricelda García Hernández** no tengo como agradecerle que hayas cuidado de mi Mafer, fuiste testigo de grandes acontecimientos en su vida y me hiciste parte de ello gracias por ser una Tía más de mi pequeña, a **Pamela Gamboa Báez** gracias por tu valiosa amistad y por estar siempre ahí para mí te quiero. Gracias a mi madrina **Julieta Hernández Vázquez** y a mi tía **Laura Jasso Galván** por sus consejos, cariño y motivación para continuar adelante y por enseñarme que mi único límite es el cielo, las quiero gracias por formar parte de mi vida.*

“El éxito es la habilidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo” Winston Churchill

Índice General

Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	v
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Figuras	ix
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo.....	3
Objetivos Específicos.....	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Cáncer Colorrectal	4
Actividad antiinflamatoria	4
Bacterias que afectan a los seres humanos	6
Uso de plantas medicinales	8
<i>Flourensia cernua</i>	9
<i>Flourensia retinophylla</i>	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Colecta y preparación del material vegetal	12
Obtención del extracto de etanol y fraccionamiento para el aislamiento de los principios activos.....	12
Obtención del extracto de etanol	12
Fraccionamiento del extracto para el aislamiento de los principios activos	12
Contenido total de fenoles y flavonoides	13
Contenido de flavonoides totales (TFC).....	13
Actividad antioxidante	13
Composición química del extracto de etanol de <i>F. retinophylla</i>	14
Cromatografía de gases y Espectroscopía de (GC-MS)	14
Identificación de compuestos.....	14
Cromatografía de Líquidos /Interfase de Ionización Electrospray/ Espectroscopía de Masas/ Espectroscopía de Masas (LC/ESI/MS2)	15

Análisis de Infrarrojo FTIR	15
Células HT-29; Cinética celular.....	16
Metodología	16
MTT Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico)	18
Pruebas antibacteriales.	20
Material Biológico.....	20
Preparación de la solución madre del extracto	20
Diseño experimental del ensayo bactericida.....	20
Análisis estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Contenido fitoquímico y actividad antioxidante	21
Composición química del extracto y fracciones de <i>F. retinophylla</i> por LC-ESI-MS2.....	25
Composición química del extracto de etanol de <i>F. retinophylla</i> por GC-MS	32
Espectro de Infrarrojo (FTIR)	35
Actividad Anticancerígena y Actividad Antiinflamatoria.....	38
Cinética celular	38
Efecto antibacterial del extracto de <i>F. retinophylla</i>	40
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

Lista de Cuadros

Tabla 1. Contenido de polifenoles y flavonoides y actividad antioxidante del extracto de <i>F. retinophylla</i> y fracciones	24
Tabla 2. Compuestos bioactivos identificados en el extracto y fracciones de <i>F. retinophylla</i>	27
Tabla 3. Compuestos identificados en la fracción volátil del extracto de etanol de <i>F. retinophylla</i> por GC-MS	33
Tabla 4. Señales de banda y las asignaciones de los grupos funcionales en el extracto de etanol de <i>F. retinophylla</i> (2016) por análisis de FTIR, en comparación con <i>Flourensia retinophylla</i> espectros FTIR (Jasso de Rodríguez et al., 2007).....	36
Tabla 5. Medias de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) y del porcentaje de inhibición (%) de 4 bacterias evaluadas de etanol de <i>F. retinophylla</i>	42
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (MIC50 y MIC90) del extracto de etanol de <i>F. retinophylla</i>	43
Tabla 7. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>F. retinophylla</i> en dos bacterias estudiadas.....	44
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (MIC50 y MIC90) del extracto etanólico de <i>F. retinophylla</i>	44

Lista de Figuras

Figura 1. Los factores etiológicos asociados para el desarrollo y progresión de cáncer colorrectal (CCR), las mutaciones genéticas, la dieta, el sistema inmunológico, y la microbiota	5
Figura 2. <i>Flourensia retinophylla</i> , planta endémica de Coahuila.	11
Figura 3. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en el extracto crudo de <i>F. retinophylla</i> . El 2 y 3, derivado de ácido 4-o-cafeoilquínico; 5, miricetina; 7, derivado de ácido dicafeoilquínico; 9, quercetina; 10, kaempferol isómero; 11, kaempferol.....	28
Figura 4. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción de acetato de etilo de <i>F. retinophylla</i> . 6, Ácido 4,5- o-dicafeoilquínico; 7, derivado de ácido di-cafeoilquínico; 8, Ácido 3,4- o-dicafeoilquínico; 9, quercetina; 10, kaempferol isómero; 11, kaempferol.	29
Figura 5. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción acuosa de <i>F. retinophylla</i> . 1, 2, 3, Derivados de Ácido 4-ocafeoilquínico; 6, Ácido 4,5- o-di-cafeoilquínico; 8, Ácido 3,4- o-dicafeoilquínico; 9, quercetina.....	30
Figura 6. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción de hexano de <i>F. retinophylla</i> 11, kaempferol. .	31
Figura 7. Cromatograma del extracto de etanol de hojas de <i>F. retinophylla</i>	34
Figura 8. Espectro Infrarrojo de extracto de etanol de <i>F. Retinophylla</i>	37
Figura 9. Efecto del extracto de etanol sobre la funcionalidad enzimática mitocondrial de células HT-29 a concentraciones que no afectan pH, y estabilidad de compuestos en el Sistema.	38
Figura 10. Efecto citotóxico de <i>F. retinophylla</i> en la línea celular HT-29 ...	39

Resumen

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA, ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIBACTERIAL *IN VITRO* DE *Flourensia retinophylla*, PLANTA ENDÉMICA
DEL SEMIDESIERTO DE COAHUILA.

POR

MARY CRUZ VICTORINO JASSO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERIA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. DIANA JASSO CANTÚ-ASESOR-

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

Flourensia retinophylla S.F. Blake, nombre común yerba de mula, es un arbusto endémico del centro y sureste de Coahuila. Esta especie ha sido poco estudiada por su actividad biológica. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antibacterial *in vitro* del extracto de etanol de las hojas de *F. retinophylla* contra seis bacterias y células de cáncer HT-29 e identificar los compuestos químicos responsables de la bioactividad. Se obtuvo el extracto de etanol de las hojas de *F. retinophylla*, se evaluó el extracto contra cuatro bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus hauseri* y *Proteus mirabilis* a concentraciones de 50, 75, 125, 250, 500 y 1000 ppm y en la segunda prueba se evaluó a *E. coli* y *P. vulgaris* 125, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm. Se evaluó la actividad anticancerígena del extracto por la técnica de viabilidad celular (MTT) y la actividad antiinflamatoria por medio de la técnica “Western blot” en células HT-29, además de determinar en el extracto de etanol y fracciones el contenido total de polifenoles y flavonoides y actividad antioxidante así como la composición química que se analizó por LS/ESI/MS2 y CG-MS. El extracto reportó una actividad antioxidante de 86.81%, lo cual puede atribuirse al contenido de fenoles totales y flavonoides. Se identificaron por LS/ESI/MS2 once compuestos de naturaleza flavonol y compuestos derivados de ácidos cafeoilquínicos en el extracto de etanol y fracciones de *F. retinophylla*. Los análisis de composición química del extracto de etanol por CG-MS reportaron la presencia de compuestos de naturaleza amida. Los extractos de *F. retinophylla*, mostraron actividad antibacterial contra las seis bacterias estudiadas y actividad anticancerígena y antiinflamatoria.

Palabras clave: *F. retinophylla*; Extracto de etanol de las hojas; Actividad Anticancerígena, Actividad Antiinflamatoria y Actividad Antibacterial, Composición química; Contenido de fenoles y flavonoides; Actividad antioxidante.

Abstract

Anticancer Activity Study, Anti-inflammatory and *In Vitro* Antibacterial *Flourensia retinophylla*, Endemic of Semidesierto of Coahuila.

BY

MARY CRUZ VICTORINO JASSO

MASTER OF SCIENCE PRODUCTION SYSTEMS ENGINEERING
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. DIANA JASSO CANTÚ -ADVISOR-

Saltillo, Coahuila

July 2016

Flourensia retinophylla S.F. Blake, common name yerba de mula, is an endemic bush of central and southeastern Coahuila. This species has been little studied for their biological activity. The objectives of this study were to evaluate the anti-cancer, anti-inflammatory and antibacterial activity *in vitro* ethanol extract of the leaves of *F. retinophylla* against six bacteria and cancer cells HT-29 and identify chemical compounds responsible for the bioactivity ethanol extract of leaves was obtained from *F. retinophylla*, the extract was evaluated against four bacteria *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus hauseri* y *Proteus mirabilis* at concentrations of 50, 75.125, 250, 500 and 1000 ppm and in the second test he was evaluated *E. coli* and *P. vulgaris* 125, 250, 500, 1000, 1500 and 2000 ppm. The anticancer activity of the extract was evaluated by the technique (MTT) of cell viability and anti-inflammatory activity by the technique "Western blot" in cells HT-29 also determining in the ethanol extract and fractions the total content of polyphenols and flavonoids and antioxidant activity as well as chemical composition is analyzed by LS/ESI/MS2 y CG-MS. The extract antioxidant activity reported 86.81%, which can be attributed to the content of total phenols and flavonoids. They are identified by LS/ESI/MS2 eleven flavonol compounds nature and compounds derived cafeoilíqunicos acids in the ethanol extract and fractions *F. retinophylla*. The chemical composition analysis of the ethanol extract by GC-MS reported the presence of amide compounds nature. The extracts they exhibited antibacterial activity against bacteria studied six and anticancer and anti-inflammatory activity.

Keywords: Ethanol extract of the leaves; Anticancer activity, Anti-inflammatory activity and Antibacterial Activity, Chemical composition; Total phenolic content and flavonoids; antioxidant activit.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica de protección del cuerpo para activar el sistema inmune en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo infecciones y lesiones de tejidos. Sin embargo, la respuesta inflamatoria crónica puede inducir diversas enfermedades como la sepsis, artritis reumatoide, y cáncer (Dinarello, 1997; Palladino et al., 2003; Jeong et al., 2013). En México, el cáncer es la segunda causa principal de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, y el cáncer colorrectal representa el 4% de todas las muertes. Más del 80% de los pacientes con cáncer colorrectal son detectados y tratados en estados tardíos (García-Osogobio et al., 2015).

Desde el descubrimiento de la quimioterapia, los científicos han desarrollado agentes bioactivos que permiten el éxito de tratamientos de una gran variedad de enfermedades, incluyendo infecciones bacterianas y cáncer. Sin embargo, con el tiempo, el tratamiento de estas dolencias se asocia frecuentemente con efectos secundarios y el desarrollo de resistencia, haciendo que los fármacos sean inútiles (Kuethe et al., 2011 y Hu et al., 2007). Esto ha aumentado la importancia de la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas y anticancerígenas. (Joray et al., 2015).

Por lo anterior y tomando en cuenta el incremento e incidencia de nuevas enfermedades infecciosas y cancerígenas, los investigadores se han enfocado en la búsqueda de nuevas fuentes naturales a partir de las plantas para la obtención de compuestos antimicrobianos, con estructuras químicas diversas y nuevos mecanismos de acción, que permitan el control de los microorganismos resistentes. (Jasso de Rodríguez et al., 2011; Molina-Salinas et al., 2007).

En el norte de México se localiza el estado de Coahuila ubicado en las zonas semiáridas, con un clima generalmente seco y semicálido a cálido extremo y con baja precipitación, en donde crecen silvestres un gran número y variedad de plantas silvestres que se han utilizado tradicionalmente como medicina alternativa por los habitantes del medio rural, para curar diferentes enfermedades como son indigestión, problemas gastrointestinales, bronquitis,

afecciones pulmonares y tuberculosis. De las especies del género *Flourensia*, el hojásén (*Flourensia cernua*), ha sido ampliamente utilizada como medicina tradicional para estos fines con excelentes resultados. Además ha sido investigada en su composición fitoquímica y actividad biológica (Jasso de Rodríguez et al., 2011; Jasso de Rodríguez et al., 2012; Ríos, 2015). *Flourensia retinophylla* S.F. Blake, nombre común yerba de mula, es un arbusto endémico del centro y sureste de Coahuila, muy ramificado y resinoso, de 1 a 2.5 m de alto. Se distribuye en un amplio rango altitudinal desde el nivel del suelo del desierto hasta las partes más altas de muchos cañones. Se han publicado sólo dos reportes científicos en relación a la composición química de *F. retinophylla*. Stuppner and Müller (1994) identificaron flavonoid aglycone en la fracción del extracto de cloroformo de las partes aéreas de *F. retinophylla*: 5,7,3'-trihidroxi-3-isobutyroylflavanonol; 5,7,3'-trihydroxyflavanone and 5,7-dihydroxy-3'-methoxyflavanone. Dillon and Mabry (1977) identificaron en *F. retinophylla*: 5,7- dihyd. Por lo anterior los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto de la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antibacterial *in vitro* del extracto de etanol de *F. retinophylla* en células de cáncer de colon HT-29 y contra seis bacterias que producen enfermedades infecciosas recurrentes en los humanos: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus hauseri*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*; e identificar los compuestos químicos responsables de la bioactividad.

Objetivo

Estudiar la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antibacterial *in vitro* del extracto de etanol de las hojas de *F. retinophylla*.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la actividad anticancerígena *in vitro* del extracto de *F. retinophylla* en células de cáncer de colón HT-29.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria en células HT-29 *in vitro* del extracto de *F. retinophylla*
3. Estudiar la actividad antibacterial *in vitro* del extracto de *F. retinophylla* contra seis bacterias que producen enfermedades infecciosas recurrentes en los humanos: *Staphylococcus epidermidis* (Gram+), *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus hauseri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* (Gram-).
4. Identificar los compuestos bioactivos del extracto y fracciones de *Flourensia retinophylla*.
5. Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto de etanol de *F. retinophylla*, así como de las fracciones hexano, acetato de etilo y agua.

Hipótesis

Flourensia retinophylla contiene compuestos bioactivos que le confieren actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antibacterial.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cáncer Colorrectal

El cáncer es un problema importante de salud pública en todo el mundo. Los cánceres más comunes son los de mama, próstata, pulmón, colorrectal (CCR), cuello del útero y estómago (Ferlay et al., 2013). El cáncer de colorrectal es uno de los más altos de incidencia y mortalidad en todo el mundo. De acuerdo con los últimos datos publicados por Globocan en 2012, el CCR y de estómago se colocaron el cuarto y sexto, respectivamente, para ambos sexos en México (Ferlay et al, 2013). La edad es un factor de riesgo principal, sin embargo, el estilo de vida y una dieta baja en fibra y rica en hidratos de carbono Y el elevado consumo de carne roja, alcohol y tabaco, aunado a la obesidad favorece al desarrollo de este tipo de cáncer (American Cancer Society, 2015 ; González y Riboli, 2010)

Estudios indican que los pacientes con cáncer comúnmente recurren a terapias alternativas como recurso simultáneo a encontrar una cura, particularmente plantas medicinales, Alonso-Castro et al., (2011) mencionan que más de 3000 plantas con propiedades anticancerígenas son reconocidas en todo el mundo. Según lo indicado por este y otros estudios realizado por Gerson-Cwilich et al. (2006) y Gómez-Martínez et al. (2007), muestran la importancia del uso de plantas medicinales como una cura alternativa a enfermedades como el cáncer e incluso infecciones producidas por bacterias.

Actividad antiinflamatoria

Las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, muestran un aumento de riesgo importante para desarrollar cáncer de colón colorectal (Zheng et al., 2016). Se ha demostrado que la tasa de cambios neoplásicos aumenta con la mayor duración de la colitis y el grado o la gravedad de la inflamación (Herszenyi et al., 2014). La inflamación crónica promueve la carcinogénesis mediante la inducción de la producción de una variedad de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor

de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), que estimulan procesos proliferativos y anti-apoptóticos que contribuyen a la carcinogénesis colitis asociada (Francescone et al., 2015; Talero et al., 2016).

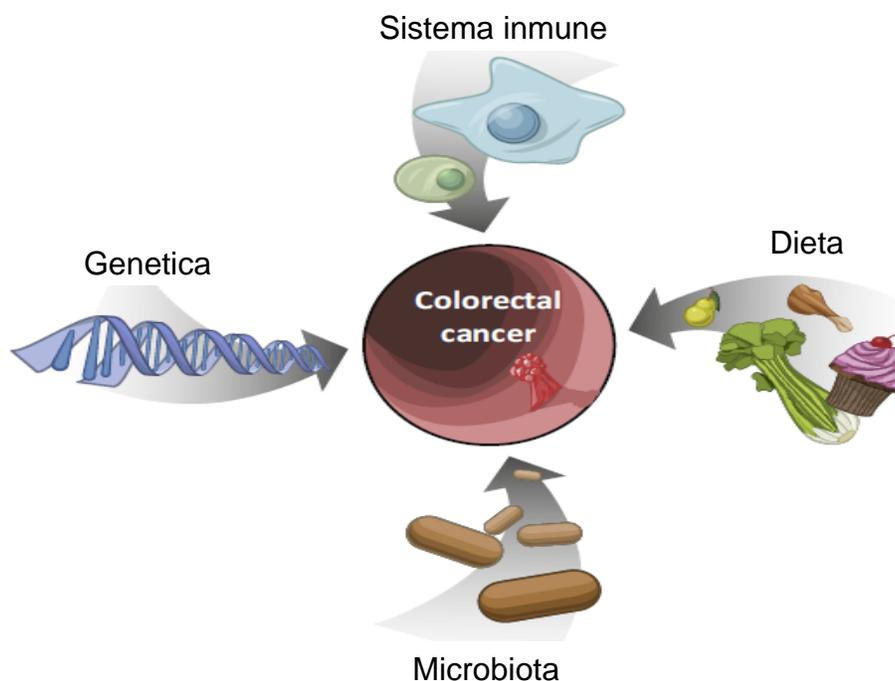


Figura 1. Los factores etiológicos asociados para el desarrollo y progresión de cáncer colorrectal (CCR). Las mutaciones genéticas, la dieta, el sistema inmunológico y la microbiota. (Fuente Li et al., 2016).

Cuando ocurre la inflamación, los mediadores, tales como citoquinas proinflamatorias, incluyendo la interleucina IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (INF) - γ , y la de granulocitos y macrófagos factor estimulante de colonias, se liberan; esta respuesta es antagonizado por citoquinas anti-inflamatorias, tales como la interleucina IL-4, IL-10, IL-13, y el factor de crecimiento transformante IFN- α . El factor-kappa B nuclear (NF- κ B), factor de transcripción, también juega un papel importante en la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la expresión de diversos genes que codifican las citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas, factores de crecimiento y enzimas inducibles tales como la ciclooxigenasa -2 (COX-2) (Mueller et al., 2010). En la inflamación crónica, el mecanismo de regulación negativa parece ser disfuncional. Aunque la inflamación es

principalmente una respuesta de protección (contra los microorganismos, toxinas o alérgenos, por ejemplo), la inflamación que es crónica y no controlada se vuelve perjudicial para los tejidos (Gil, 2002).

Bacterias que afectan a los seres humanos

Entre las bacterias que producen enfermedades infecciosas con mayor frecuencia en los humanos podemos citar a *Staphylococcus epidermidis* bacteria Gram positivo que causa enfermedades infecciosas del torrente sanguíneo, cardiovasculares, de ojos, oídos, nariz y garganta (Gelosia et al., 2001) esta bacteria es la causante de infecciones nosocomiales afecta predominantemente a los recién nacidos y pacientes con dispositivos médicos permanentes (Gabriel et al., 2015; Ishiwada et al., 2016). *Enterobacter Aerogenes* bacteria Gram negativo también es causante de infecciones del torrente sanguíneo siendo el octavo patógeno más común en las infecciones asociadas a la salud en los Estados Unidos (Hidron et al., 2008). Así mismo podemos mencionar que *Escherichia coli* es el patógeno más común que causa diarrea, las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas (SINAVE, 2012), este grupo de edad presenta entre 2 y 4 episodios diarreicos al año. *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, y *P. hauseri* son bacterias Gram negativo que causan infecciones severas principalmente en el tracto urinario representando una carga para la salud pública y la sociedad, pues cerca del 40% de las mujeres y el 12% de los hombres tendrán al menos un caso de infecciones del tracto urinario (ITU) durante su vida adulta; la infección se asocia con altas tasas de frecuencia de las bacterias que producen estos contagios, si no se instaura un manejo adecuado de antibiótico, puede progresar rápidamente a sepsis severa y muerte. (Monali et al., 2015; Nagarjuna et al., 2015). Después de la anemia, las infecciones urinarias debido a estas bacterias son la segunda complicación

común en las mujeres embarazadas el control inadecuado de la infección puede afectar negativamente a la salud del bebé o de la madre embarazada, la infección bacteriana tiene un papel destacado en el aumento del número de partos con muerte fetal intrauterina y sus complicaciones asociadas y son la causa de casi 150 millones de muertes por año en todo el mundo (Amiri et al., 2015). El género *Proteus* pertenece a la tribu *Proteeae* de la familia *Enterobacteriaceae* y comprende cinco especies: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus myxofaciens*, y *Proteus hauseri*, su tamaño es de 0,4 a 0,8 mm de diámetro y 1,0 a 3,0 mm de longitud. Este género se distribuye ampliamente en el medio ambiente. Como un patógeno humano oportunista, se encuentra en el tracto gastrointestinal humano y animal, la piel y la mucosa oral, así como en las heces, el suelo, el agua y las plantas, es causante del deterioro de los alimentos, de carne cruda, mariscos, verduras, y comida en conserva. La detección de esta bacteria en la comida indica que no fue preparada con medidas de higiene adecuadas, las cepas de *Proteus* son capaces de crecer a temperaturas de 10 a 43 ° C siendo la óptima de 25 ° C. (Wang et al., 2014) son bacterias que causan infecciones severas principalmente en el tracto urinario (Monali et al., 2015).

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de muerte en el mundo, tanto para adultos y niños, y es reconocido como un problema de salud pública importante. Las afecciones ocasionadas por estas bacterias han requerido el uso de antibióticos para su tratamiento efectivo, pero la recurrencia de estas y la continua aplicación e incremento de los antibióticos, han ocasionado resistencia entre los patógenos, lo cual ha limitado el control de estos. (Kalhapure et al., 2014) El uso irracional de antibióticos amenaza a la seguridad de la salud pública, debido a una mayor tasa de resistencia a los medicamentos, y es una importante carga económica para el sistema sanitario, así como alta morbilidad para los pacientes. Antes de 2008, sólo el 15% de los tratamientos en México consistió en la prescripción de antibióticos por un médico y que era un hecho conocido que alrededor del 80% de las prescripciones fueron efectuadas por empleados de las farmacias. En ese año

las autoridades de salud de México destacaron el problema de la resistencia a los antimicrobianos, y establecieron la regulación del mercado de antibióticos, los cuales solo podrían ser adquiridos cuando fueran prescritos por un médico. (Dreser et al., 2008; Reyes and Blandon-Vigil 2015).

Por lo anterior es fundamental la búsqueda de nuevas alternativas naturales efectivas contra estos patógenos que sustituyan el uso de las drogas sintéticas.

Uso de plantas medicinales

Las plantas medicinales han sido utilizadas ampliamente en el mundo como remedios o suplementos para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, estas presentan una rica fuente de compuestos biológicamente activos (Newman et al., 2003). Son una fuente importante de fármacos aproximadamente el 25% de estos en todo el mundo provienen de plantas. En México es un país con una flora muy diversa, hay más de 23,400 especies vasculares y 5000 especies se utilizan con fines medicinales (Alonso et al., 2011; Bye, 1993; CONABIO, 2006) además es un país con una flora muy diversa, y muchas de sus culturas indígenas tienen una extensa farmacopea de plantas medicinales, (López- Rubalcava and Estrada-Camarena 2016).

Existen en las regiones semiaridas del norte de México, un gran número y variedad de plantas silvestres que crecen bajo condiciones climáticas extremas (Adame y Adame, 2000; Jasso de Rodríguez et al., 2011), que se utilizan en el tratamiento de enfermedades respiratorias y tienen actividad antibacteriana (Encarnación et al., 1998; Rojas et al., 2001; Jiménez-Arellanes et al., 2003; Molina-Salinas et al., 2007), son utilizadas actualmente para aliviar los problemas de afecciones pulmonares y expectorantes (*Marrubium vulgare*), bronquitis (*Mentha spicata*), tos, neumonía (*Artemisia ludoviciana*), gripe, resfriado y asma (*Ambrosia Chaenopodium*), expectorante (*Flourensia cernua*). (Verni et al., 2011, Molina- Salinas et al., 2007). Compuestos fenólicos se encuentran comúnmente en estas plantas, principalmente derivados de los taninos hidrolizables (Ventura et al., 2008), estos son metabolitos secundarios de las plantas, su papel es fundamental en la defensa contra la radiación UV o

contra la agresión por patógenos (Beckman, 2000; Wong et al., 2014). Plantas de la familia Asteraceae son una familia grande y extensa, formado con más de 23,000 especies actualmente aceptadas, que están distribuidos en 1,620 géneros y 12 subfamilias. (Negri, 2015). El género *Flourensia* pertenece a la subtribu Ecliptinae, tribu Heliantheae, y subfamilia Asteroideae que es la más diversa Asteraceae, este género consta de 42 especies de subarbustos, arbustos y pequeños árboles, resinosos y aromáticos, que se caracterizan por sus flores amarillas abundantes (Ríos, 2015). Se encuentra principalmente en hábitats áridos y las regiones subtropicales de América, es endémico de este continente en donde se localiza en Estados Unidos, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, México, siendo en este último donde se distribuyen 13 de sus especies, de las cuales 7 se localizan en el estado de Coahuila: *Flourensia retinophylla*, *Flourensia laurifolia*, *Flourensia cernua*, *Flourensia dentata*, *Flourensia ilicifolia*, *Flourensia solitaria*, *Flourensia microphylla*, *Flourensia colludes*, *Flourensia glutinosa*, *Flourensia resinosa*, *Flourensia monticola*, *Flourensia pulcherrima*, *Flourensia pringlei* (Dillon, 1984).

Flourensia cernua

Es conocida como tarbush, hojas,-Tarbush americano, negro-pincel, barniz cepillo, y hojasén en Estados Unidos de América y en México, se conoce como hojaseñ, tarbush, negro-cepillo (Jasso de Rodríguez et al., 2012). Son arbustos de 2 m de altura, tallos muy ramificados, resinosos, aromáticos, de color marrón a negro, sus hojas son elípticas a ovadas de 17-25 mm de largo y de 5-12 mm de ancho, se ubica largo del estado de la región desértica del norte-centro de México, incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas (Dillon, 1984). La planta es bebida en forma de infusión de las hojas, se para el tratamiento de diversas dolencias gastrointestinales, tales como dolor de estómago, indigestión, la diarrea y la disentería, también es utilizada como purgante, expectorante y remedio reumático se restringen solamente a unas pocas áreas (Mata et al., 2003) es la especie más estudiada de su género reportando actividad

antifúngica (De León et al., 2016, Jasso de Rodríguez et al., 2007; Tellez et al., 2001), los extractos de *F. cernua* tienen actividad antioxidante, anti-VIH, antitumoral y propiedades antidiabéticas (De León et al., 2013; Luo et al., 1998).

Flourensia retinophylla

Flourensia retinophylla S.F. Blake (Fig. 1), nombre común yerba de mula, es un arbusto endémico del centro y sureste de Coahuila, muy ramificado y resinoso, de 1 a 2.5 m de alto. Se distribuye en un amplio rango altitudinal desde justo el nivel del suelo del desierto hasta las partes más altas de muchos cañones. Cohabita con especies como: *Acacia berlandieri*, *Agave lechuguilla*, *Arctostaphylos*, *Dasyilirion*, *Hechtia*, *Pinus pinceana*, *Quercus intricata*, *Rhus virens*, y *Viguiera stenoloba*. (Dillon et al., 1984; Jasso de Rodríguez et al., 2007).

Se han publicado sólo dos reportes científicos en relación a la composición química de *F. retinophylla*. Stuppner and Müller (1994) identificaron flavonoid aglycone en la fracción del extracto de cloroformo de las partes aéreas de *F. retinophylla*: 5,7,3'-trihidroxi-3-isobutyroylflavanonol; 5,7,3'-trihydroxyflavanone and 5,7-dihydroxy-3'-methoxyflavanone. Dillon and Mabry (1977) identificaron en *F. retinophylla*: 5,7- dihydroxy flavanone (pinocembrin), Kaempferol y 3,7-dimethyl ether (Kumatakenin) (Flavonol previamente identificado en *F. cernua*). Esta especie ha sido poco estudiada por su actividad biológica, a la fecha solo se ha encontrado un reporte científico sobre la actividad antifúngica del extracto de etanol, que inhibió el crecimiento micelial de *Alternaria* sp. (90%), *Rhizoctonia solani* (100%), y *Fusarium oxysporum* (95%) a concentraciones de 1000, 1000 y 500 ppm, respectivamente (Jasso de Rodríguez et al., 2007).

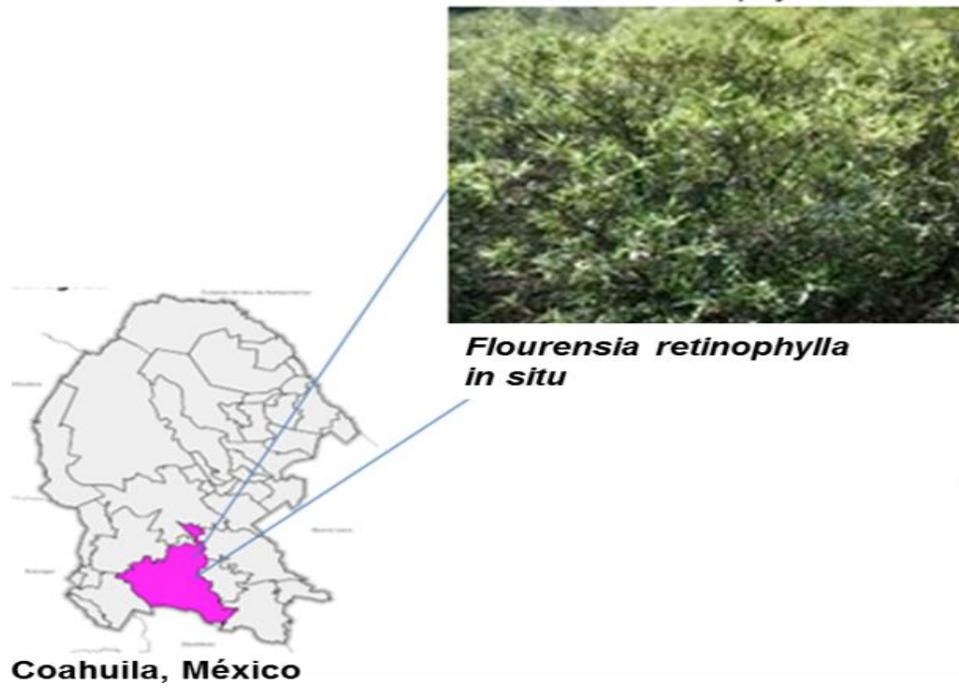


Figura 2. *Flourensia retinophylla*, planta endémica de Coahuila.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y preparación del material vegetal

Las ramas con hojas de 15 plantas de *F. retinophylla* se colectaron al azar, en un sitio silvestre en la Sierra de Paila localizado a 25° 59' latitud N y 101° 28' longitud O, altitud de 1300 msnm. Se colocaron en bolsas de polietileno negro y se transportaron al laboratorio de Fitoquímica de la Universidad. Se separaron las hojas de los tallos y se secaron a 60°C durante 24 horas, en una estufa marca MAPSA. Enseguida se molieron en un molino Thomas Wiley Model 4 con un tamiz de 2 mm, y se almacenaron en un dispositivo adecuado, hasta su procesamiento.

Obtención del extracto de etanol y fraccionamiento para el aislamiento de los principios activos.

Obtención del extracto de etanol

En un frasco de 3.4 L se colocaron 115 g de hojas molidas y 1,250 mL de etanol, el cual se mantuvo en agitación, en un agitador marca IKA C-MAG MS10, durante 72 h a temperatura ambiente. Al término de la reacción, el disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio (Büchi Laboratoriums-Technik, Schweiz). Enseguida el extracto se colocó en una estufa a 40°C durante 4h para eliminar los residuos de etanol y a continuación se determinó el rendimiento del extracto seco. Se determinó la composición química del extracto de etanol por GC-MS.

Fraccionamiento del extracto para el aislamiento de los principios activos

Se llevó a cabo mediante una extracción líquido-líquido, y para la cual se pesaron 5g del extracto y se le añadieron 500 ml de una solución etanol-agua (1:1). Enseguida la muestra se colocó en un sonicador marca (Bransonic Ultrasonic cleaner 5510 R-MT) por un minuto. A continuación se rotaevaporó en un rotavapor marca (Buchi Rotavapor R II 230 V) para eliminar el etanol. El

extracto acuoso fue colocado en refrigeración durante 24 h. A continuación el extracto fue colocado en un embudo de separación y se prepararon fracciones con hexano, acetato de etilo y agua (200 mL por tres veces para cada solvente). Al término de cada fraccionamiento, se conjuntaron los tres volúmenes del solvente correspondiente, el cual fue evaporado y liofilizado (Liofilizador Freeze Dryer Modulyo). Las fracciones fueron inyectadas en el equipo LC-ESI-MS2 para la identificación de compuestos bioactivos.

Contenido total de fenoles y flavonoides

El contenido de fenoles totales (TPC) del extracto de etanol y las fracciones acetato de etilo y agua, se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Ainsworth and Gillespie (2007), usando ácido gálico (GA) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de GA por gramo de corno seco (mg GAE/g of dry sample). El TPC se estimó a partir de la absorbancia de la mezcla a 750 nm. El análisis para cada una de las muestras se llevó a cabo por triplicado.

Contenido de flavonoides totales (TFC)

El contenido de flavonoides totales (TFC) del extracto de etanol y las fracciones de acetato de etilo y agua se determinó usando el método colorimétrico descrito por Heimler et al. (2005), usando catequina como estándar de referencia, los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina (mg CE/g dry sample). El contenido de flavonoides se determinó a partir de la absorbancia de la mezcla a 570 nm. El análisis para cada una de las muestras se llevó a cabo por triplicado.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto y las fracciones de acetato de etilo y agua se determinó por el método de DPPH^{*} descrito por (Brand-Williams et al., 1995),

con algunas modificaciones (Manzocco et al., 1998). Una curva de calibración a 515 nm (UV/Vis Spectrophotometer Varian, Cary 50, Varian, Palo Alto, CA, USA) se realizó para calcular la concentración de DPPH[·] (0–1000 µg/mL). Un volumen de 2.9 mL de metanol y DPPH[·]. La reacción se inició por la adición de 100 µL de las muestras del extracto y fracciones de acetato de etilo y agua por 5 min la eficiencia del radical fue calculada de acuerdo a la siguiente formula

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}^{\cdot}]_T}{[\text{DPPH}^{\cdot}]_{T=0}}$$

Donde $[\text{DPPH}^{\cdot}]_T$ es la concentración de la constante DPPH[·]
 $[\text{DPPH}^{\cdot}]_{T=0}$ es la concentración inicial.

Composición química del extracto de etanol de *F. retinophylla*

Cromatografía de gases y Espectroscopía de (GC–MS)

Se llevaron a cabo los análisis de composición química del extracto de etanol de *F. retinophylla* por cromatografía de gases y espectroscopía de masas, los análisis se llevaron a cabo en un equipo Agilent Technologies utilizando las siguientes condiciones: columna HP-5MS (30 m × 0.25 mm 1D X 0.25). Para la detección, se utilizó un sistema de ionización de energía de 70 eV. Como gas portador, en un flujo constante 1.1 mL/min y un volumen de inyección de 1 µL fue utilizado, a temperatura de inyección fue de 250 °C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmica durante 5 min a 60 °C seguido de un calentamiento of 5 °C /min hasta 100 °C/min (2 min), y 10 °C/min hasta 250 °C/min (5 min).

Identificación de compuestos

La interpretación de los espectros de masas fue llevada a cabo, usando la librería NIST (National Institute of Standard and Technology), que se encuentra en el equipo.

Cromatografía de Líquidos /Interfase de Ionización Electrospray/ Espectroscopía de Masas/ Espectroscopía de Masas (LC/ESI/MS2)

El análisis del extracto de etanol y las fracciones se llevó a cabo con un sistema de Acquity UPLC (Agua Corp., Miliford, MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas tándem Xevo TQ-S triple cuadrupolo (Waters Corp). El Sistema LC consistió en un gestor de muestra (20°C) y un gestor de disolvente binario. La columna utilizada para la determinación de flavan-3-ol, flavanoles, ácido elágico y derivados del ácido cafeoilquinico fue una Acquity UPLC BEH C8 150 mm X 2.1 X 1.7 μm (Waters Corp) operada a 20-40°C. El perfil de elución utilizado para la determinación incluyó dos disolventes: agua acidificada con ácido fórmico 1% (A) y Acetonitrilo (B); al inicio 98% de A en B; 0-2 min, 68% de A en B; 2-3.8 min 55% de A en B; 3.8-4.5 min 45% A en B; 4.5-6.0 min 5% en B (gradiente lineal) el lavado de la columna y posteriormente, 6.0-9.5 min, 98% de A en B y la estabilización de la columna. Los datos de MRM se tomaron desde 0 a 9.5 min. Se empleó el modo de ionización negativo para los ensayos de MS. Las condiciones ESI fueron las siguientes: Voltaje de capilar 2.85 kV; temperatura de desvoltación 500°C; temperatura de la fuente, 150°C; flujos de gas de desvoltación y de cono, 794L/h y 151L/h, respectivamente, y gas de colisión, 0.14 ml/min. La rutina (20 ng/L) se utilizó para controlar la estabilidad de la eficiencia de ionización del espectrómetro de masas y una mezcla de diferentes compuestos fenólicos (20 ng/L) se utilizó para monitorear en tiempo de retención y los valores de m/z. para la cuantificación de la curva de los flavonoides se empleó un estándar de rutina. El procesamiento de control y datos del espectrómetro UPLC y del tándem Xevo TQ-S de triple cuadrupolo de masas se realizaron con el software MassLinx (Waters Corp.).

Análisis de Infrarrojo FTIR

El extracto de etanol de *F. retinophylla* no requiere ningún tratamiento especial para el análisis, las muestras se realizaron directamente en un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR, utilizando un dispositivo de ATR con el

modelo de punta de diamante GX00 a temperatura ambiente en un rango de 600-4000 cm^{-1} y 32 barridos por espectro.

Células HT-29; Cinética celular

Material biológico

Línea celular HT-29 (ATCC® HTB-38™) de cáncer de colon humano.

Materiales

- ✓ Pipetas estériles de 2, 5 y 10 ml
- ✓ Cajas Petri estériles
- ✓ Placa de 24 pozos

- ✓ Tubos graduados Corning de 50 ml
- ✓ Vaso de precipitados estéril
- ✓ Puntillas estériles azules y amarillas de 1 y 0.5ml
- ✓ Estufa de CO2 al 6.5%

Reactivos

- ✓ Medio RPM estéril
- ✓ Verseno (EDTA al 0.02%)
- ✓ PBS 1X
- ✓ Tripsina al 15 %
- ✓ DMEM al 10% (medio de cultivo celular)

Metodología

1.- Descongelamiento celular

Las células están ultra congeladas a una temperatura de -80°C por lo cual los cristales son pequeños, por lo tanto no se debe hacer un descongelamiento a temperatura ambiente, ya que los cristales tienden a hacerse más grandes y esto disminuye la viabilidad celular.

1. Limpiar/Esterilizar el área de trabajo.
2. Tener el agua estéril a una temperatura de $37-38^{\circ}\text{C}$.
3. Tener el medio de cultivo a una temperatura de 37°C .
4. Localizar la línea celular (en este caso se tomó la Transferencia 7).

5. Tener el vaso con el agua estéril cerca para así poder colocar el vial.
6. Llevar todo el material a la campana y esperar de uno a tres minutos el descongelamiento celular.
7. Con la pipeta de 2ml recuperar, homogenizar y resuspender de dos a tres veces, y colocar en el Corning.

2.- Activación de la línea celular

1. La suspensión se transfirió a una placa de cultivo estéril de 100 mm, la cual se llevó a incubar a 37° en atmosfera con CO₂ al 6.5%.
2. Se hicieron cambios sucesivos cada 3 días retirando el medio con una pipeta Pasteur y adicionando 10 ml del medio.
3. Cuando el crecimiento del cultivo llego a una confluencia del 80% aprox. Se transfirieron a nuevas placas con medio, con una concentración de 1×10^6 esta acción se realizó hasta obtener la cantidad necesaria.

3.- Cinética de crecimiento celular en HT-29

Se revisó el cultivo celular al microscopio, colocando la caja Petri sobre un acrílico (el cual se inclinó para su mejor manejo). Se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío. Se vertieron 10 ml de PBS 1x estéril a 37°C y se agitó por unos segundos, nuevamente se aspiró con el sistema de vacío. Se agregaron 3 ml de verseno estéril a 37°C y dejó actuar por unos segundos, para después agregar 1 ml de tripsina al 0.15% estéril a 37°C y se dejó actuar por cinco minutos en la incubadora de CO₂. Una vez pasado el tiempo y favorecido el desprendimiento celular, se agregaron 6 ml de medio de cultivo estéril a 37°C desde arriba en forma de círculo, suspendiendo nuevamente un par de veces, se recuperaron las células en un tubo corning de 50 ml estéril, cuidadosamente se vació por la pared del tubo y se tomó una alícuota de 10 microlitros de la solución homogenizada para vaciarla a un tubo eppendorf para hacer la cuenta celular en el hematocitometro. Por último se suspendieron las células y se sembraron en una

placa de 24 pozos agregando 500µl de la solución suspendida a cada pozo. Se dejó incubar a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 6.5%

En los días siguientes se aspiró el medio y se lavaron los pozos con 500 µL de PBS 1X, se aspiró y se agregaron 375 ml de verseno al 2%, 125µL de tripsina al 15%, se incubó la reacción por 5 minutos y posteriormente se paró la reacción con medio de cultivo, se suspendió para homogenizar y se tomaron 10 µL de la suspensión y se añadieron 10 µL de azul tripan, finalmente se hizo un conteo en la cámara de Neubauer. Así se obtuvo el número de células por 6 días para estimar el tiempo de duplicación celular.

MTT Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico)

Material biológico

Línea celular HT-29 (ATCC® HTB-38™) de cáncer de colon humano.

Material de prueba:

Extracto crudo de etanol de *Flourensia retinophylla*

Reactivos:

- ✓ Reactivo de MTT (bromuro de 3-(4-5 dimetiltiazol-z-do)-2,5-difeniltetrazol, M5655-1G Lot #MKBF5121V) (M5655-1G Lot#MKBF5121V, SIGMA ALDRICH)
- ✓ Medio Dulbecco's modified Eagle's high glucose (D4540-1L, SIGMA ALDRICH)
- ✓ DMSO (dimetilsulfóxido (D4540-1L Lot# SHBD2417V SIGMA ALDRICH)
- ✓ Tripsina 0.15%(100mg de tripsina 100G páncreas porcino, 100mg de glucosa, 10mg sulfato de estreptomicina, 10mg penicilina G sódica, 150µL solución rojo fenol al 1%, 10mL PBS 10x).
- ✓ Verseno 0.02%(200mg de EDTA, se afora a un litro y se esteriliza en alícuotas de 100mL, se mantiene en refrigeración).
- ✓ Buffer de fosfatos 1x (de una solución madre de 10x se toman 100mL y se afora a 1L, se esteriliza en alícuotas de 100mL y se mantiene en refrigeración).

- ✓ Bicarbonato de sodio 3506-01 Lot# X43337
- ✓ Sulfato de estreptomicina S-6501 Lot#08IKI275
- ✓ Penicilina G P-3032 Lot#051k1044
- ✓ Tripsina 1:250 T-4799 Lot#22K7268
- ✓ RPMI-1640 Medium R8755-10L Lot#22K7268

Procedimiento

La preparación del MTT debe realizarse justo antes de comenzar el ensayo y en la oscuridad ya que el reactivo es fotosensible.

Transcurridas 72 horas de post-siembra en una placa de 96 pozos, se aplicaron los tratamientos y se dejaron incubando en una estufa de CO₂ al 5% por 24 horas pasado este tiempo se dieron dos lavados con PBS 1X para quitar todos los residuos y el medio de cultivo, esta operación se realizó de 2 carriles a la vez, para no afectar la viabilidad celular, se aspiró el medio de cultivo con pipeta Pasteur inclinando la placa unos 45°, cuidando de no tocar el fondo del pozo para no aspirar células, se agregaron 100µL de PBS 1X a cada pozo con la multipipeta. Se puso la placa en agitación a 300 rpm durante 5min y se agregaron 100µL de RPMI con antibiótico SIN rojo fenol, se apagó la luz de la campana y se procedió a agregar 100µL de MTT (cubrir el MTT y las placas con papel aluminio) posteriormente se incubo por 4h en incubadora de cultivo.

Pasada las 4 horas se colocó el matraz para recolectar residuos de MTT a la bomba de vacío y se aspiró el MTT (No tocar el fondo del pocillo). Luego se agregaron 200µL de DMSO a cada pozo con multipipeta y por separado con una punta por carril, despegar todo el formazán del fondo de cada pozo resuspendiendo el DMSO hasta que ya no queden cristales de formazán en el fondo. Se tomaron 10µl de la suspensión celular de cada pozo y se tiñeron con 10 µl de azul tripán para ser contadas en cámara de Neubauer, este procedimiento se realizó por cuadruplicado para cada tratamiento con sus respectivas concentraciones, se calculó la media aritmética de la cantidad de células viables para cada concentración.

Pruebas antibacteriales

Los ensayos antibacteriales se llevaron a cabo utilizando el extracto de etanol de *F. retinophylla*.

Material Biológico

Las cepas bacterianas utilizadas se obtuvieron de la colección de bacterias del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos del Instituto Tecnológico de Durango: Gram- negative bacteria: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), y Gram-positive bacteria: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Preparación de la solución madre del extracto

Se preparó una solución madre del extracto de etanol de *F. retinophylla* a una concentración de 10,000 ppm. Se pesaron 112.5 mg del extracto y se disolvió en 1.125 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 4%. Posteriormente se filtró con membranas de nylon de 0.45 µM para esterilizar el extracto.

Diseño experimental del ensayo bactericida

Se llevó a cabo un ensayo previo para conocer el efecto inhibitorio del extracto en las seis bacterias. En base a los resultados obtenidos (información no reportada), se determinó analizar cuatro bacterias iniciando con bajas concentraciones (Ensayo 1) y dos bacterias con concentraciones superiores (Ensayo 2) a las de la prueba anterior. El efecto inhibitorio del extracto de etanol de *F. retinophylla* en el crecimiento de las bacterias, se llevó a cabo por el método de dilución de agar (Ramírez and Castaño, 2009). Se preparó una solución de bacterias en caldo nutritivo a una dilución 1:100 (0.01). Enseguida en tubos de ensayo se colocaron 10 ml de caldo nutritivo, y se le agregó el volumen de la solución madre del extracto, para ajustar la concentración, y la cantidad de bacterias: Ensayo 1, las concentraciones fueron: 0 (control), 50, 75, 125, 250, 500, 1000 ppm, que se evaluaron en las bacterias: *S. epidermidis*, *P. hauseri*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes*; en el ensayo 2, las concentraciones fueron

0 (control), 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 ppm que se evaluaron en las bacterias: *E. coli* y *P. vulgaris*. Enseguida se colocaron 100 µl de muestra en una placa Petri de Agar Nutritivo sólido. Las placas se incubaron a 37° C por 24 h. Posteriormente se contó el número de colonias en un contador de colonias (marca Craft) y los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) y en porcentaje de inhibición (%), determinados con la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{Número de colonias}) (1000)}{0.1}$$

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Testigo Absoluto} - \text{UFC/mL} \times 100}{\text{Testigo Absoluto}}$$

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Los Ensayos 1 y 2 fueron establecidos bajo un diseño completamente al azar con seis concentraciones y tres repeticiones para cada concentración del extracto de etanol de *F. retinophylla*, y un control absoluto con tres repeticiones, para cada Ensayo. Con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de medias por el método de Tukey ($P=0.05$), utilizando el programa Language R (Team Core, 2014). Se aplicó el análisis Probit (Finney, 1971) para calcular la concentración del extracto de la planta, el cual resulta en una inhibición del 50% y 90% del crecimiento visible de las bacterias, cuando se compara con el control absoluto (MIC_{50} y MIC_{90}). El programa de análisis SAS Probit (Versión 9.1) fue usado para la evaluación estadística. Los valores de MIC fueron calculados estadísticamente y asociados con valores de Chi-square significativos al nivel $P<0.05$ estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido fitoquímico y actividad antioxidante

Los resultados de contenido de polifenoles totales mostraron que el extracto de etanol de *F. retinophylla* posee la concentración más alta en relación a las

fracciones de agua y de acetato de etilo (Tabla 1). Esta tendencia es similar para el contenido de flavonoides en el extracto y fracciones. Además el extracto reportó una elevada actividad antioxidante (86.81%), lo cual puede atribuirse al contenido de fenoles totales y flavonoides (Salazar et al., 2008). En base a la revisión bibliográfica efectuada, no existe más información científica reportada de *F. retinophylla*, para comparar los resultados mostrados anteriormente. Sin embargo podríamos considerar algunas especies del género *Flourensia*, como *F. cernua*, que es la especie más estudiada hasta la actualidad. El contenido total de fenoles del presente estudio es superior a los reportados por Wong-Paz et al., (2015) y Salazar et al., (2008) para *F. cernua*, con contenidos de 7.9 mg/g, en etanol-agua al 70%, durante 2h, y 15 mg/g, respectivamente. La actividad antioxidante de *F. cernua* ha sido estudiada por diferentes investigadores: De León et al., (2016) reportaron actividad antioxidante de 89.45% producida por los compuestos bioactivos obtenidos de una infusión de las hojas; a una concentración de 4000 ppm. Wong-Paz et al., (2014 y 2015) reportaron para un extracto de tallos y hojas obtenidos con una mezcla agua-etanol (30:70), una actividad antioxidante de 80% con el método Heat-reflux extraction y para un extracto con el mismo tejido y solvente, la actividad fue superior al 90%, respectivamente. Salazar et al., (2008) reportaron para un extracto de hojas de *F. cernua* extraído con metanol una actividad antioxidante de 27.9%. Los resultados de actividad antioxidante de *F. retinophylla* obtenidos en el presente estudio son superiores a los reportados por Wong-Paz et al. (2014) y Salazar et al. (2008) y son similares a los de De León et al. (2016) y Wong-Paz et al. (2015). Por otra parte es importante mencionar que el contenido de flavonoides reportado en el presente estudio es similar al que fue reportado en el extracto de las hojas de *Larrea tridentata* en etanol y en cuanto a la actividad antioxidante lo reportado en este estudio (86.81%) fue inferior a lo que se encontró en la *L. tridentata* (94.97%) (Matins et al., 2012). Sin embargo es sobresaliente el contenido de flavonoides de *F. retinophylla* y en particular la elevada actividad antioxidante que se reporta por primera vez en este estudio y que puede ser atribuida a la compleja matriz de compuestos químicos

acumulados en los tejidos de la planta, algunos de ellos como un medio de defensa y promovidos por el efecto del estrés, ocasionado por el clima seco, extremoso y escasa humedad que son la diaria constante en las zonas áridas y semiáridas del estado de Coahuila.

Tabla 1. Contenido de polifenoles y flavonoides y actividad antioxidante del extracto de *F. retinophylla* y fracciones

Muestra	Fenoles totales (mg GAE/g)	Flavonoides (mg CE/g)	Actividad Antioxidante DPPH¹ (%)
Extracto de etanol	18.3795±0.7942	11.6169± 7.4436	86.8119±0.4818
Fracción de acetato de etilo	0.0045±0.0059	0.0994±0.0560	13.5766±4.3168
Fracción acuosa	0.0418±0.0591	0.0885±0.0415	23.0790 ±19.4255

Los valores son medias ±SEM, n=3.

¹ Miligramos de ácido gálico equivalentes por gramo de hojas secas

² Milligramos de (+)-catequina equivalentes por gramo de hojas secas

Composición química del extracto y fracciones de *F. retinophylla* por LC-ESI-MS2

Los resultados de la composición química del extracto de etanol de *F. retinophylla* (Fig. 1), mostraron la identificación de once compuestos entre los cuales: flavan-3-ols, flavonoles, flavanonas, en fracciones obtenidas con acetato de etilo (Fig. 2), agua (Fig. 3) y hexano (Fig. 4). Se realizó la cuantificación de los compuestos identificados (Tabla 2), detectando la mayor abundancia de quercetina en el extracto de etanol y la fracción de acetato de etilo; por otra parte, en la fracción acuosa, los componentes mayoritarios fueron los derivados de cafeoilquínico, y en la fracción de hexano solo se detectó la presencia de kaempferol.

La elevada concentración de Quercetina en el extracto de etanol y en la fracción de acetato de etilo es de gran relevancia por las numerosas propiedades biológicas y farmacológicas, entre las cuales, el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, además de poseer actividad como: antioxidante, antiinflamatorio, antiviral, antibacterial y anticáncer (Erlund, 2004; Formica et al., 1995; Nijveldt et al., 2001; Liu y Guo, 2006). Sin embargo el uso de la Quercetina como un agente promotor de la salud ha sido limitado por la escasa biodisponibilidad, la cual se atribuye a la baja solubilidad en agua de este compuesto y a la inestabilidad bajo condiciones de procesamiento, además en el organismo humano esto ocurre también en los órganos del pequeño intestino (colon, riñón e hígado) (Zhou et al., 2015). En el extracto de etanol también fue identificado la presencia de la Mircetina la cual es un flavonol del cual se han reportado múltiples efectos terapéuticos potenciales: anti-cancerígeno, anti-inflamatorio, anti-aterosclerótico, antitrombótico, anti-diabético y anti-viral (Hobbs et al., 2015; Ong and Khoo, 1997). Además se presenta en baja concentración un isómero del Kaempferol, de naturaleza flavonol, del cual se reporta actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacterial y antitumoral, así como antidiabética (Chen and Chen, 2013; Luo et al., 2015) así como varios derivados del ácido cafeoilquínico.

En la fracción acuosa el componente de mayor concentración es un derivado del ácido cafeoilquínico (3,4-o-di-cafeoilquínico) (Fig. 3). Jin et al., (2014), reportaron para estos compuestos actividad: antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, anti VIH, y hepatoprotectora. En la fracción de hexano se identificó el Kaempferol, de naturaleza flavonol, (Fig.4), del cual se han reportado propiedades como: antidiabético, antioxidante, antiinflamatorio y la promoción de las funciones de las células pancreáticas (Luo et al., 2015). Por lo anterior podemos atribuir el efecto antibacterial del extracto de etanol de *F. retinophylla* a la presencia de los flavonoles y en particular de la quercetina, la cual en sinergia con los demás compuestos químicos que integran el extracto inhiben el desarrollo de las bacterias estudiadas, algunas de ellas pudieran ser multidrogo resistentes. Este extracto es una alternativa viable para el desarrollo de medicamentos que podrían curar las enfermedades ocasionadas por las bacterias y para lo cual se requieren mayores estudios sobre el aislamiento de los compuestos activos del extracto. Este es el primer reporte de la presencia de la quercetina, mircitina y ácidos cafeoilquínicos en el extracto de etanol y fracciones de *F. retinophylla*.

Tabla 2. Compuestos bioactivos identificados en el extracto y fracciones de *F. retinophylla*

No	Rt (min)	Nombre de los compuestos	[M-H] m/z	Extracto	Acetato de etilo	Fracciones Agua	Hexano
1	2.03	Derivado de ácido 4-o-cafeoilquínico	353	0.000±0.000 ^a	0.000±0.000 ^a	0.204±0.010 ^a	0.000±0.000 ^a
2	2.41	Derivado de ácido 4-o-cafeoilquínico	353	0.033±0.003 ^b	0.000±0.000 ^a	0.438±0.072 ^b	0.000±0.000 ^a
3	2.56	Derivado de ácido 4-o-cafeoilquínico	353	0.011±0.000 ^c	0.000±0.000 ^a	0.208±0.011 ^a	0.000±0.000 ^a
4	3.92	Derivado de ácido di-cafeoilquínico	515	0.000±0.000 ^a	0.000±0.000 ^a	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^a
5	3.98	Miricetina	317	0.035±0.002 ^b	0.000±0.000 ^a	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^a
6	4.16	Ácido 4,5-o-di-Cafeoilquínico	515	0.000±0.000 ^a	0.347±0.015 ^b	0.444±0.017 ^b	0.000±0.000 ^a
7	4.40	Derivado de ácido di-cafeoilquínico	515	0.051±0.001 ^d	0.295±0.037 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^a
8	4.74	Ácido 3,4-o-di cafeoilquínico	515	0.000±0.000 ^a	0.286±0.0006 ^c	0.554±0.028 ^d	0.000±0.000 ^a
9	5.58	Quercetina	301	1.505±0.117 ^e	6.088±0.082 ^d	0.044±0.011 ^e	0.000±0.000 ^a
10	5.93	Kaempferol Isómero	285	0.014±0.001 ^c	0.122±0.003 ^e	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^a
11	6.18	Kaempferol	285	0.000±0.000 ^a	0.064±0.001 ^d	0.000±0.000 ^c	0.091±0.003 ^b
			Total	1.713±0.111	7.377±0.144	1.879±0.072	0.091±0.003

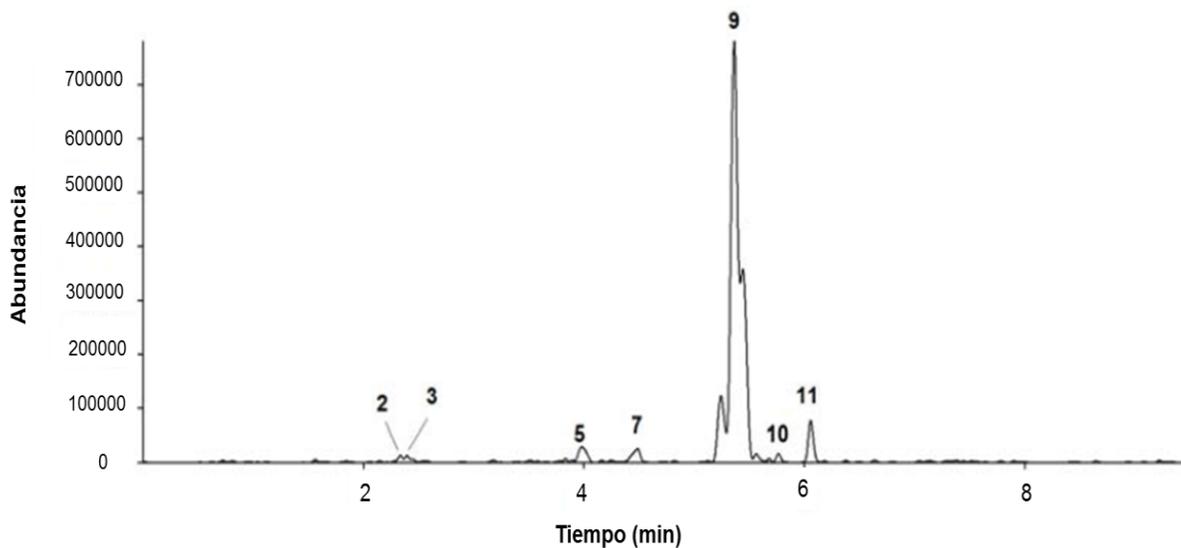


Figura 3. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en el extracto crudo de *F. retinophylla*. El 2 y 3, derivado de ácido 4-o-cafeoilquínico; 5, miricetina; 7, derivado de ácido dicafeoilquínico; 9, quercetina; 10, kaempferol isómero; 11, kaempferol.

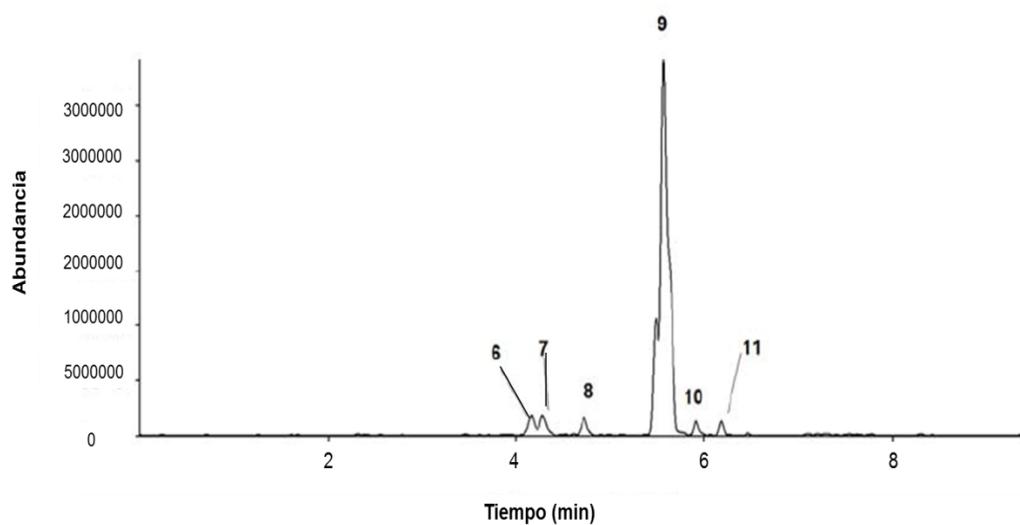


Figura 4. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción de acetato de etilo de *F. retinophylla*. 6, Ácido 4,5- o-dicafeoilquínico; 7, derivado de ácido di-cafeoilquínico; 8, Ácido 3,4- o-dicafeoilquínico; 9, quercetina; 10, kaempferol isómero; 11, kaempferol.

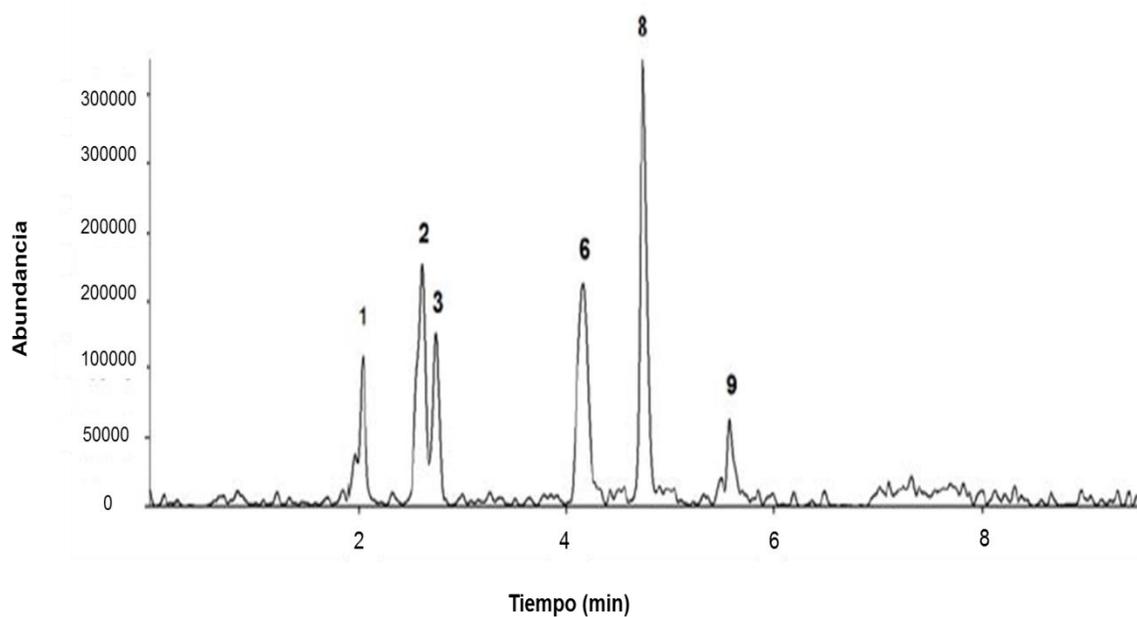


Figura 5. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción acuosa de *F. retinophylla*. 1, 2, 3, Derivados de Ácido 4-ocafeoilquínico; 6, Ácido 4,5- o-di-cafeoilquínico; 8, Ácido 3,4- o-dicafeoilquínico; 9, quercetina.

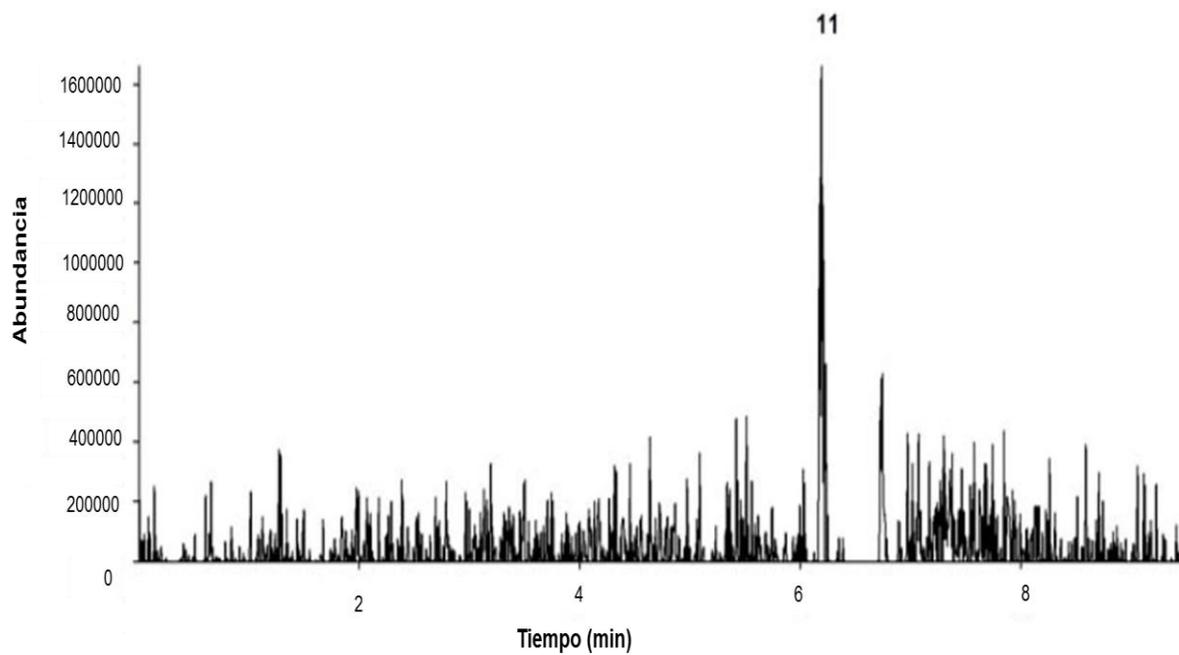


Figura 6. Perfil de elución espectral de principales componentes identificados en la fracción de hexano de *F. retinophylla*. 11, kaempferol.

Composición química del extracto de etanol de *F. retinophylla* por GC-MS

Los resultados por GC-MS del extracto de etanol identificaron siete compuestos (Fig. 5). El tiempo de retención (TR), nombre del compuesto, fórmula molecular (FM), peso molecular (PM) y concentración (Área %) de los compuestos, se presentan en la Tabla 3. Los resultados muestran siete compuestos identificados siendo tres los de mayor abundancia el 9-Octadecenamida, (Z)- con un 46.7%, del extracto, además de Hexadecanamida (22.5%) y Octadecanamida (21.9%), los tres de naturaleza amida, que en conjunto integran el 91.1% del extracto. En la Tabla 6 se presenta la actividad biológica de los compuestos identificados en el extracto de las hojas de *F. retinophylla* y en la que podemos observar que el compuesto mayoritario tiene propiedades antimicrobiales y que en general, el resto de los compuestos tiene propiedades antibacteriales y antimicrobial. En la literatura no hemos encontrado ningún reporte sobre los compuestos aquí identificados en *F. retinophylla*. El presente es el primer reporte sobre la composición química del extracto de etanol de las hojas de *F. retinophylla* por GC-MS.

Tabla 3 Compuestos identificados en la fracción volátil del extracto de etanol de *F. retinophylla* por GC-MS

No	Rt (min)	Nombre del compuesto	Formula Molecular	MW	Área (%)
1	12.16	2H-1-Benzopyran-2-one, 3,4-dihydro-	C ₉ H ₈ O ₂	148	0.3
2	13.76	1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha.,4.beta.,4a.beta.,8a.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.1
3	13.85	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)]-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.1
4	17.53	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	2.0
5	21.07	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	255	22.5
6	22.82	9-Octadecenamide, (Z)-	C ₁₈ H ₃₅ NO	281	46.7
7	23.06	Octadecanamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	283	21.9

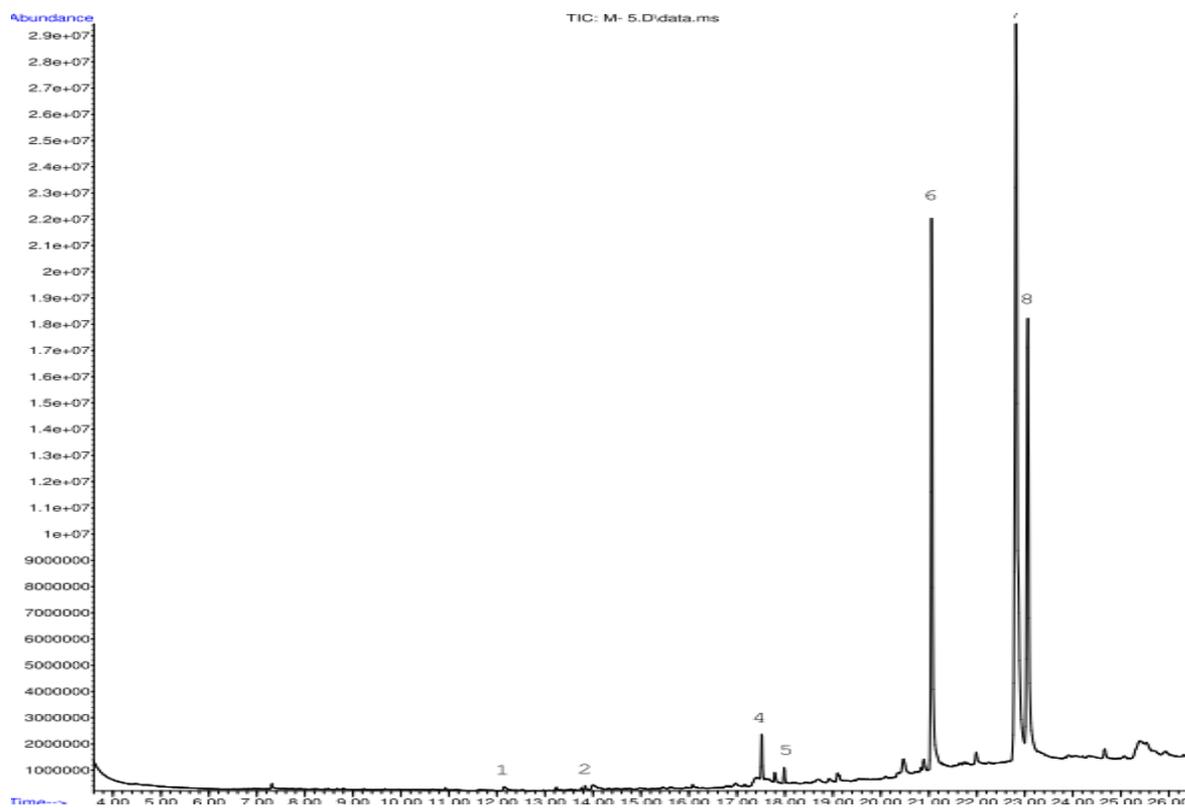


Figura 7. Cromatograma del extracto de etanol de hojas de *F. retinophylla*.

Espectro de Infrarrojo (FTIR)

En el 2007 Jasso de Rodríguez y colaboradores, reportaron el análisis de espectroscopia de FT-IR del extracto de las hojas de *Flourensia retinophylla*, donde se destacaba la presencia de las bandas OH, correspondientes al grupo hidroxilo, o bien al estiramiento N-H, en 1447cm^{-1} se presentan los enlaces C-O-H y C-N, lo que nos lleva a concluir que el extracto de las hojas de *Flourensia retinophylla*, presentan en su estructura anillos aromáticos, grupos alcohólicos, compuestos carbonílicos, y compuestos nitrogenados. Tomando en cuenta lo anterior se supone que el o los compuestos extraídos de las hojas de *Flourensia retinophylla* presentan un carácter polar, tomando en cuenta que el extracto de las hojas fue obtenido en presencia de etanol. (Tabla 4).

Es destacable que *Flourensia retinophylla*, es una planta endémica del estado de Coahuila, y que pese a la adversidad de los cambios climáticos, sequía, bajas y altas temperaturas, etc., la planta no sufre ningún cambio. Es importante destacar que los principios activos que contiene *Flourensia retinophylla*, son estables químicamente, al estar sometida a la interperie, lo que lleva a suponer la estabilidad química que presenta los extractos etanólicos de las hojas de *Flourensia retinophylla*. Esto se demuestra, debido a que en el 2007 Jasso de Rodríguez y colaboradores, reportaron los primeros estudios sobre los extractos de las hojas de *Flourensia retinophylla*, empleando etanol como solvente extractor encontraron mediante espectroscopia FT-IR la presencia de grupos aromáticos, alquenos y alcoholes. En esta investigación se siguió la misma metodología reportada en el 2007 y se lograron obtener resultados similares a la espectroscopia de FT-IR, lo que demuestra que el método es confiable y reproducible.

Tabla 4. Señales de banda y las asignaciones de los grupos funcionales en el extracto de etanol de *F. retinophylla* (2016) por análisis de FTIR, en comparación con *F. retinophylla* espectros FTIR (Jasso de Rodríguez et al., 2007)

Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación ^{1,2}
2016	Jasso de Rodríguez, 2007	
3300	3349	O-H, N-H
2925	3078	C-H
2854	2852	C-H
1713	1732	C=O
1623	1627	C=C, C=O de una amida
1447	1462	C-O-H, C-N
1375	1377	C-O
1240	1245	C-H
1157	1105	C-H
1023	1078	O-H
886	718	C-H

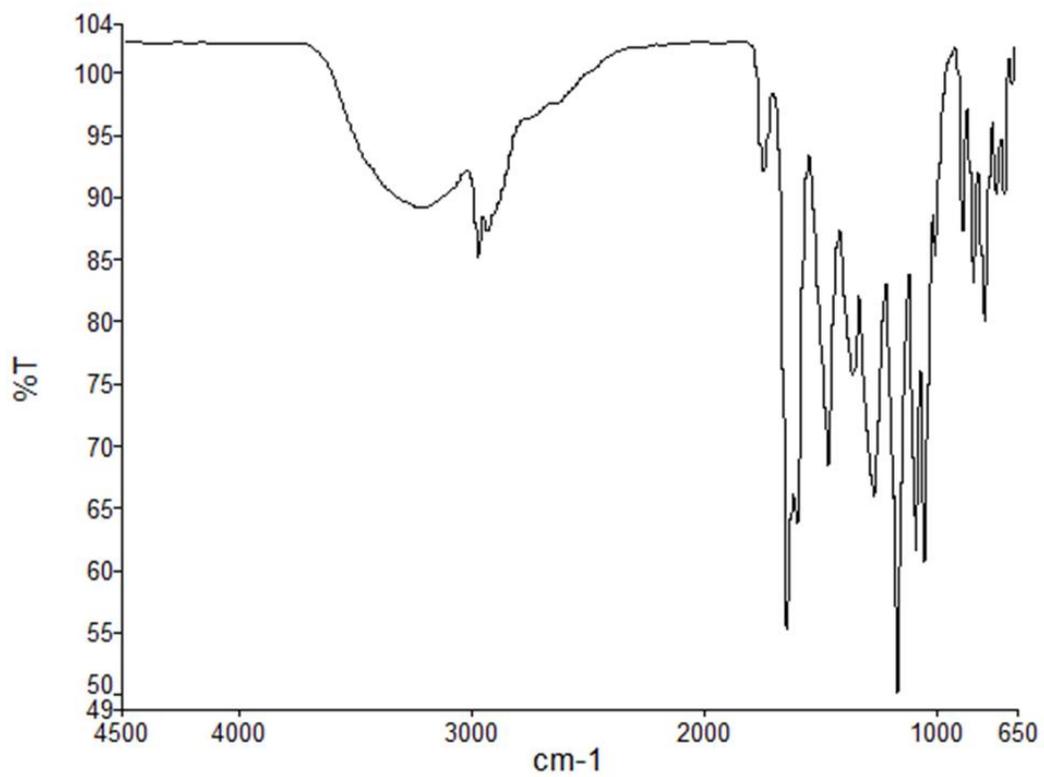


Figura 8. Espectro Infrarrojo de extracto de etanol de *F. Retinophylla*.

Actividad Anticancerígena y Actividad Antiinflamatoria

Cinética celular

Las células crecieron durante, al menos una semana, sin que se observara muerte celular natural. Estas densidades fueron, 5.06×10^4 ; 8.1875×10^4 ; 1.2688×10^5 ; 1.8125×10^5 ; 2.6×10^5 ; 3.05×10^5 células diarias durante una semana. Los resultados indicaron que a las 192 horas se obtuvo mayor viabilidad celular con una concentración de 3.05×10^5 . Al estudiar la cinética de crecimiento en los días siguientes, comprobamos que la población todavía pudo duplicarse una vez más. Estos resultados son parecidos a un cultivo en condiciones estándar (CEN) de células HT-29 M6 que conduce a un 100% de confluencia a los 3-4 días después de una siembra realizada a 2×10^5 células/cm² (50% de confluencia, aproximadamente), según descrito anteriormente.

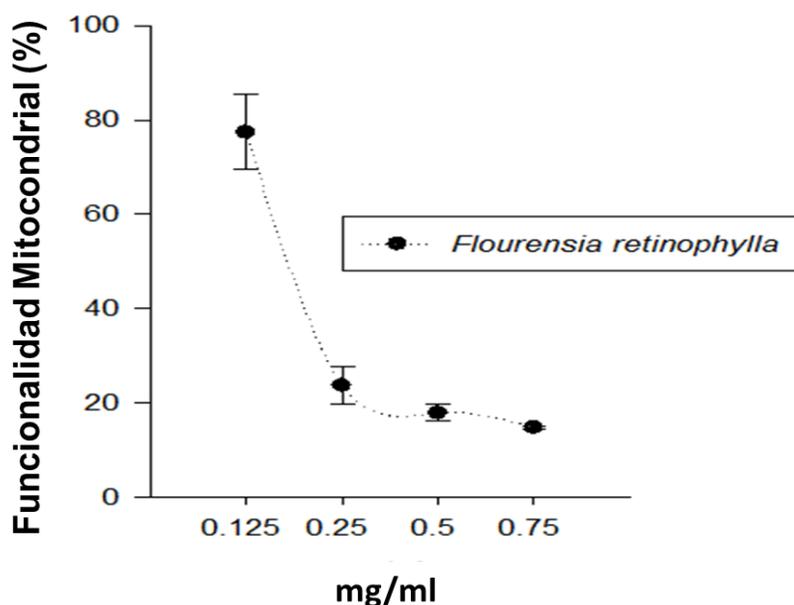


Figura 9. Efecto del extracto de etanol sobre la funcionalidad enzimática mitocondrial de células HT-29 a concentraciones que no afectan pH, y estabilidad de compuestos en el Sistema.

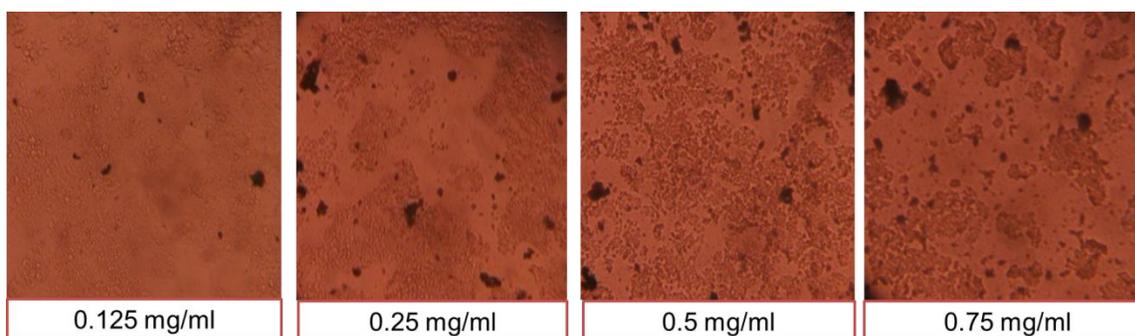


Figura 10. Efecto citotóxico de *F. retinophylla* en la línea celular HT-29

En el presente estudio se realizó la determinación del efecto citotóxico del extracto de *F. retinophylla*. Las concentraciones probadas fueron 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL. Con una inhibición de un 80%. Joray et al., (2015) reportó actividad anticancerígena de los compuestos aislados de *F. oolepis* en dos líneas celulares de leucemia, siendo el compuesto 2',4'-Dihydroxychalcone el que mostró un fuerte efecto citotóxico contra las células. Este es el primer reporte de investigación científica de la actividad anticancerígena y antiinflamatoria de *F. retinophylla*. Esta actividad antiinflamatoria puede ser atribuida a la composición química del extracto en específico al flavonol como la quercetina que es el compuesto mayoritario del extracto de etanol, mediante la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y óxido nítrico sintasa inducible (Raso et al., 2001; Mutoh et al., 2000). La inflamación crónica se cree que desempeñan un papel importante en la etiología de varios tipos de cáncer y los inhibidores de COX-2 se están estudiando como agentes quimiopreventivos contra el cáncer colorrectal (Le, 2002). Los flavonoides pueden tener un efecto benéfico a través de su impacto en la bioactivación de los carcinógenos, flavonoles como la quercetina han demostrado inhibir enzimas del citocromo que juegan un papel fundamental en la activación de una serie de carcinógenos humanos sospechosos, tales como los hidrocarburos policíclicos y aminas heterocíclicas. (Lautraite et al., 2002; Ciolino et al., 1999; Kang et al., 1999; Mutoh et al., 2000). La quercetina inhibe la tirosina quinasa que también participa en la proliferación celular, demostrando así la

detención del ciclo celular y la apoptosis, además de los efectos antineoplásicos como la actividad antiinflamatoria y antiproliferativos (Le, 2002).

Efecto antibacterial del extracto de *F. retinophylla*

El efecto de la actividad biológica de las concentraciones del extracto de *F. retinophylla* en las bacterias estudiadas se presenta a continuación. El análisis de varianza para UFC/ml y % de inhibición, presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para todas las bacterias evaluadas. En la Tabla 6 se presentan las UFC/ml y el % de inhibición de las bacterias: *S. epidermidis*, *P. hauseri*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes*, en donde a una concentración de 50 ppm del extracto las bacterias *E. aerogenes* y *P. hauseri* presentaron el 100% de inhibición, mientras que *P. mirabilis* a la misma concentración presentó una inhibición superior al 80% y a las 250 ppm presentó. Por otra parte *S. epidermidis* a 500 ppm del extracto tuvo una inhibición al 100%.

En general podemos observar que el crecimiento de bacterias no fue inhibido por el DMSO, por lo cual la inhibición de las bacterias es atribuida únicamente al efecto del extracto. Los resultados mostraron que el extracto de etanol de *F. retinophylla* presentó una alta inhibición sobre el crecimiento de las bacterias estudiadas.

El análisis de varianza para UFC y % de inhibición en la prueba 2 para altas concentraciones en *E. coli* y *P. vulgaris*, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para las bacterias evaluadas. Con las concentraciones de 1500 y 2000 ppm, se observó que el crecimiento de *E. coli* se inhibió al 100%, y en *P. vulgaris* el extracto inhibió el crecimiento al 100% con la concentración de 2000 ppm y a 1500 ppm hubo inhibición del 86.3%. De acuerdo a estos resultados la concentración recomendadas son de 1500 y 2000 ppm para *E. coli* y *P. vulgaris*, respectivamente. Los altos porcentajes de inhibición se pueden atribuir a su composición química, compuestos identificados como la Quercetina tiene actividad antibacterial.

No existen reportes en la literatura de la actividad antibacterial de *F. retinophylla*. Los resultados del presente estudio concuerdan con los reportados por Molina et al., (2007) quienes encontraron actividad bactericida de los extractos de hexano de las hojas de *F. cernua* contra *Mycobacterium tuberculosis* a una MIC de 50 y 25 µg/mL contra cepas sensitiva y resistente.

Peralta (2006) reportó que extractos de hexano, éter, etanol y metanol-cloroformo de *Flourensia cernua* inhiben a diferentes dosis bacterias como *Pseudomonas cichorii* (Pc), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), y *Pectobacterium caratovora*, en el cual el extracto de hexano de *F. cernua* fue el que tuvo mayor porcentaje de inhibición sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), con un 82.51% y para *Pseudomonas cichorii* 83.96%. Por otro lado Méndez et al., (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas del semidesierto como (*Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Lippia graveolens*, *Agave lechuguilla*, *Yucca filifera*, *Opuntia ficus-indica* y *Carya illinoensis*) contra 4 bacterias siendo dos de ellas *E. coli* y *E. areogenes* siendo esta última la que demostró inhibición más baja alrededor del 70 % de inhibición, mientras que en los resultados que *F. retinophylla* inhibió con un 100% a 50 ppm. Otras especies de *Flourensia* han reportado actividad antibacterial. Joray et al., (2011) del extracto de etanol de las hojas de *Flourensia oolepis* reportó un MIC de 1mg/ml para *E. coli* y 0.500 mg/ml para *P. mirabilis*. También de los compuestos aislados del extracto etanólico de las hojas de *F. oolepis* se aislaron 5 compuestos siendo el compuesto identificado como 2',4'-dihydroxychalcone el que mostró un efecto inhibitorio con un MIC de 62 µg/ml para *P. mirabilis* y 250 µg/ml para *E. coli* (Joray et al., 2015). La actividad antibacterial se puede atribuir a los flavonoides presentes en el extracto de etanol, al kaempferol, quercetina principalmente, estos dos flavonoides exhiben actividad antibacterial muy fuerte, por ejemplo la quercetina tiene un grupo hidroxilo en la posición 3 en el anillo C el cual es importante para la actividad antibacteriana de los flavonoides, que de acuerdo con estudios previos que indican que la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3 en flavonoides disminuye su actividad antioxidante y antimicrobiana. (Wu et al., 2013; Tripoli et al., 2007; Sichel et al., 1991).

Tabla 5. Medias de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) y del porcentaje de inhibición (%) de 4 bacterias evaluadas de etanol de *F. retinophylla*.

Concentración (ppm)	<i>S. epidermidis</i>		<i>P. hauseri</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>E. aerogenes</i>	
	UFC/ml	Inhibición (%)	UFC/ml	Inhibición (%)	UFC/ml	Inhibición (%)	UFC/ml	Inhibición (%)
TA	367,500 b	0 d	0 b	0 d	832,500 a	0 d	232,500 b	0 b
50	445,000 a	0 d	0 b	100 a	150,000 b	81.98 c	0 a	100 a
75	52,500 a	85.71 c	20,000 b	100 a	75,000 c	90.99 b	0 a	100 a
125	125,000 cd	94.56 ab	20,000 b	98.83 c	105,000 bc	87.39 bc	0 a	100 a
250	30,000 cd	91.84 bc	15,000 b	99.12 bc	0 d	100 a	0 a	100 a
500	0 d	100 a	7,500 b	99.56 ab	0 d	100 a	0 a	100 a
1000	35,000 cd	90.48 bc	0 b	100 a	0 d	100 a	0 a	100 a
CV	10.08	3.91	8.14	0.29	12.98	2.43	8.53	1.58

TA: Testigo absoluto; CV: Coeficiente de variación.

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (MIC50 y MIC90) del extracto de etanol de *F. retinophylla*

Bacteria	95% Margenes de fiabilidad			MIC90 (ppm)	95% Margenes de fiabilidad		CHI*
	MIC50 (ppm)	Inferior	Superior		Inferior	Superior	
<i>S. epidermidis</i>	61.69	4.94	118.13	259.41	134.27	5253	2.12
<i>P. hauseri</i>	-	-	-	-	-	-	1.96
<i>P. mirabilis</i>	16.43	5.63	27.01	86.37	67.60	111.15	2.12
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	2.12

*: CHI- valor eficaz, nivel significativo en $p < 0.05$.

Tabla 7. Efecto inhibitorio del extracto etánolico de *F. retinophylla* en dos bacterias estudiadas

Concentración (ppm)	<i>E. coli</i>		<i>P. vulgaris</i>	
	UFC/ml	Inhibición (%)	UFC/ml	Inhibición (%)
TA	585,000 a	0 d	240,000 b	0 d
125	650,000 c	88.89 a	520,000 a	0 d
250	650,000 c	88.89 a	165,000 bc	31.25 c
500	435,000 a	25.64 c	30,000 c	87.5 b
1000	250,000 b	57.26 b	515,000 a	0 d
1500	0 c	100 a	0 c	100 a
2000	0 c	100 a	0 c	100 a
CV	28.41	10.56	28.72	7.12

TA: Testigo absoluto; CV: Coeficiente de variación

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (MIC50 y MIC90) del extracto etánolico de *F. retinophylla*.

Bacteria	95% Fiducial Limits			95% Fiducial Limits			CHI*
	MIC50 (ppm)	Inferior	Superior	MIC90 (ppm)	Inferior	Superior	
<i>E. coli</i>	1.11	-	-	62485	-	-	2.12
<i>P. vulgaris</i>	554.08	171.68	1296	2244	1054	161419	2.12

*: CHI- valor eficaz, nivel significativo en $p < 0.05$

CONCLUSIONES

El extracto de *F. retinophylla* presentó actividad anticancerígena y antiinflamatoria a bajas concentraciones, en células de cáncer de colón HT-29. El extracto de etanol de las hojas de *F. retinophylla* presentó actividad antibacterial, inhibiendo el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus hauseri*. Presentando la mayor inhibición en *P. mirabilis* y *E. aerogenes* a la menor concentración. Además también expresó la mayor concentración de fenoles totales, de flavonoides y de actividad antioxidante, en relación a las fracciones evaluadas. La quercetina fue el compuesto mayoritario identificado en el extracto de etanol de *F. retinophylla* por LC-ESI-MS. La actividad anticancerígena y antiinflamatoria presentada por el extracto de *F. retinophylla* puede ser atribuida a los compuestos de naturaleza flavonoide, los cuales han reportado esta actividad para otras especies de plantas. La actividad antibacterial puede ser atribuida a 9-Octadecenamide, (Z)- de naturaleza amida el cual ha reportado actividad antibacterial. El extracto de *F. retinophylla* representa una alternativa para el desarrollo de un fármaco anticancerígeno y antiinflamatorio y es una alternativa para ser utilizado como un bactericida botánico contra la recurrencia de enfermedades causadas por *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. hauseri*, que han mostrado resistencia a la utilización de antibióticos sintéticos. En la presente investigación se reporta por primera vez las actividades anticancerígena, antiinflamatoria y antibacterial.

REFERENCIAS

- Adame, J., Adame, H., 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano. México, Ediciones Castillo.11–15.
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133, 945–972. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>. American Cancer Society. Available from: (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>) (accessed 15.0915.).
- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875–877.
- Amiri, M., Lavasani, Z., Norouzirad, R., Najibpour, R., Mohamadpour, M., Nikpoor, A. R., Marzouni, H. Z. 2015. Prevalence of Urinary Tract Infection Among Pregnant Women and its Complications in Their Newborns During the Birth in the Hospitals of Dezful City, Iran, 2012-2013. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17
- American Cancer Society. Available from: (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>) (accessed 15.0915.).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT, Food Sci Technol*, 28, 25–30.
- Beckman CH. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiol Mol Plant Path.* 57, 101–10.
- Bye, R., Ramamoorthy, T. P., Bye, R. A., Lot, A., Fa, J. E.1993. The role of humans in the diversification of plants in Mexico. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution.*, 707-731.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C.1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* 348.715–22.
- Chen, A. Y. and Chen, Y. C. 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* 138, 2099–2107.

- CONABIO, 2006. Capital Natural y Bienestar Social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- De León-Zapata, M. A., Sáenz, A., Jasso-Cantú, D., Rodríguez, R., Pandey, A., Aguilar, C. N. 2013. Fermented *Flourensia cernua* extracts and their in vitro assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 233–239.
- De León, M.A., Sáenz A., Rojas R., Rodríguez R., Jasso D., Aguilar C. 2016. Edible candelilla wax coating with fermented extract of tarbush improves the shelf life and quality of apples. 3, 70-75.
- Dillon, M. 1984. A Systematic Study of *Flourensia* (Asteraceae, Heliantheae). Department of Botany. 13-14.
- Dillon, M. O. and Mabry, T. J. 1977. Flavonoid aglycones from *Flourensia*. *Phytochem.* 16, 1318-1319.
- Dinarello, C.A., 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. 112, 321–329.
- Dreser, A, Wirtz, V.J., Corbett, K.K. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México.* 50, 480-487.
- Encarnacion Dimayuga, R., Virgen, M., Ochoa, N. 1998. Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical biology.* 36, 33-43.
- Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research.* 851-874.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013.
- Finney, D.J., 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, London.
- Formica, J.V., Regelson, W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 1061–1080.
- Francescone, R., Hou, V., Grivennikov, S. I. 2015. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflammatory bowel diseases.* 21, 409-418.
- Gabriel, E. M., Fitzgibbon, S., Clair, J., Coffey, A., O'Mahony, J. M. 2015. Characterisation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

- demonstrating high levels of linezolid resistance ($> 256 \mu\text{g/ml}$) resulting from transmissible and mutational mechanisms. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21, 547-549.
- García-Osogobio, S., Téllez-Ávila, F. I., Méndez, N., Uribe-Esquivel, M. 2015. Results of the first program of colorectal cancer screening in Mexico. *Endoscopia*. 27, 59-63.
- Gelosia, A., Baldassarri, L., Deighton, M., Van Nguyen, T. 2001. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect*. 193–199.
- Gil, Æ. 2002. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56, 388–396.
- GLOBOCAN. 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (<http://globocan.iarc.fr>) (accessed 15.09.15.).
- González, C.A., Riboli, E. 2010. Diet and cancer prevention: contributions from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Eur. J. Cancer*. 46, 2555–2562. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.025>. Gordaliza, M., Castro, M.A., del Corral, J.M., Feliciano, A.S. 2000. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr. Pharm. Des*. 6, 1811–1839.
- Gerson-Cwilich, R., Serrano-Olvera, A., Villalobos-Prieto, A. 2006. Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clin. Trans. Oncol*. 8, 200–207.
- Gómez-Martínez, R., Tlacuilo-Parra, A., Garibaldi-Covarrubias, R. 2007. Use of complementary and alternative medicine in children with cancer in Occidental Mexico. *Pediatr. Blood Cancer* 49, 820–823. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.21101>.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Romani, A. 2005. Rapid test to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. *Dry beans*. *J. Agric. Food Chem*. 53, 3053-3056.
- Herszenyi, L., Barabas, L., Miheller, P., Tulassay, Z. 2014. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: the true impact of the risk. *Digestive Diseases*. 33, 52-57
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A. 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported

- to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:996–1011.
- Hobbs, C. A., Swartz, C., Maronpot, R., Davis, J., Recio, L., Koyanagi, M., Hayashi, S. M. 2015. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. *Food and Chemical Toxicology*. 83, 283-292.
- Hu, L., Li, Z. R., Li, J. N., Qu, J., Jiang, J. D., Boykin, D. W. 2007. 3-(2'-Bromopropionylamino)-benzamides as novel S-phase arrest agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 17, 6847-6852.
- Ishiwada, N., Takaya, A., Kimura, A., Watanabe, M., Hino, M., Ochiai, H., Yamamoto, T. 2015. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. *J. Inf. Chem.*
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández, C.D., Angulo, S.J.L., Rodríguez, G.R., Villarreal, Q.J.A., Lira, S.R.H. 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizotocnia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*. 25, 111-116.
- Jasso de Rodríguez, D., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., Zuccolotto, L. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Ind. Crops Prod*. 34, 960-966.
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández, C.F.D., Solís, G.S., Rodríguez, G.R., Rodríguez, R.M. 2012. *Flourensia cernua* DC: A Plant from Mexican Semiarid Regions with a Broad, Integrated Pest Management and Pest Control. 639-651.
- Jeong, J. B., Shin, Y. K., Lee, S. H. 2013. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol in RAW264. 7 and HT-29 cells. *Food and chem. Toxicology*. 55, 229-233.
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research* 17, 903–908.
- Jin, H. A. N., Qing-Yuan, L. V., Shi-Ying, J. I. N., ZHANG, T. T., Shi-Xiao, J. I. N., Xian-Yi, L. I., Hai-Long, Y. U. A. N. 2014. Comparison of anti-bacterial activity of three types of di-O-caffeoylquinic acids in *Lonicera japonica* flowers based on microcalorimetry. *Chinese journal of natural medicines*. 12, 108-113.

- Joray, M.B, Del Rollán M. R., Ruiz, Palacios, G. M., Carpinella, M. C. 2011. "Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina— isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*," *Planta Medica*. 77, 95–100.
- Joray, M. B., Trucco, L. D., González, M. L., Napal, G. N. D., Palacios, S. M., Bocco, J. L., Carpinella, M. C. 2015. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Compounds Isolated from *Flourensia oolepis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Kang, Z.C., Tsai, S.J., Lee, H. 1999. Quercetin inhibits benzopyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutr. Cancer*. 35, 175-9.
- Kuete, V., Alibert-Franco, S., Eyong, K. O., Ngameni, B., Folefoc, G. N., Nguemeving, J. R., Bolla, J. M. 2011. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of antimicrobial agents*. 37, 156-161.
- Lautraite, S., Musonda, A.C., Doehmer, J., Edwards, G.O., Chipman, J.K. 2002. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*. 17,45–53.
- Le, Marchand, L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids a review. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 56, 296-301.
- Liu, W., and Guo, R. 2006. Interaction between flavonoid, quercetin and surfactant aggregates with different charges. *Journal of colloid and interface science*. 302, 625-632.
- Li, S. K., Martin, A. 2016. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends in molecular medicine*. 22, 274-289.
- Luo, J., Chuang, T., Cheung, J., Quan, J., Tsai, J., Sullivan, C. 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): A new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *European Journal of Pharmacology*. 346, 77–79.
- Luo, C., Yang, H., Tang, C., Yao, G., Kong L., He, H., Zhou Y., 2015. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF-κB signal in type 2 diabetic rats. *Int Immunopharmacol*. 28, 744-750.

- López-Rubalcava, C., Estrada-Camarena, E. 2016. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Ethnopharmacology*.
- Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and purification technology*. 88, 163-167.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Mací, M., Rivero-Cruz, I., Perez, O., Timmermann, B. N. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochem*. 64, 285-291.
- Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C., 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lwt-Food Sci Technol*. 31, 694-698.
- Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D., Aguilar, C. N. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Ind. Crops Pro*. 37, 445-450.
- Molina-Salinas, G. M., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., De Torres, N. W. 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *J Ethnopharmacol*. 109, 435-441.
- Monali, P. M., Sibanarayan, R., Shasank, S. S., Goutam, G., Debajyoti D., y Rabindra, N.P. 2015. *In vitro* antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria.
- Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*. 122, 987-996
- Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Komatsu, H., Enya, T., Matsushima-Hibiya, Y., Wakabayashi, K. 2000. Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. *Japanese journal of cancer research*, 91, 686-691.
- Nagarjuna, D., Mittal, G., Dhanda, R. S., Verma, P. K., Gaiind, R., Yadav, M. 2015. Faecal *Escherichia coli* isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital. *New microbes and new infections*. 7, 57-66.
- Negri, R. 2015. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia*. 106, 92-109.

- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 66, 1022–1037.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of clinical nutrition*. 74, 418-425.
- Ong, K.C., Khoo, H.E., 1997. Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmacol.* 29,121-126.
- Palladino, M.A., Bahjat, F.R., Theodorakis, E.A., Moldawe, L.L., 2003. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Natl. Rev. Drug Discov.* 2, 736–746.
- Peralta, B.J.E. 2006. Evaluación de la actividad de extractos de hojases (*Flourensia cernua* D.C), *in vitro* en el control de las bacterias fitopatogenas *Xanthomona campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* (Van Hall) Dye y *Pseudomonas cichorri* (Swingle) Stapp. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila México.
- Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life sciences*. 68, 921-931. Iñ
- Ríos, M. Y. 2015. Chemistry and Biology of the Genus *Flourensia* (*Asteraceae*). *Chem. Biodivers.*, 12, 1595-1634.
- Ramirez, L.S., Castaño, D.M., 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 15, 263 - 268.
- Reyes-López, A., Blandón-Vijil, V. 2015. Economic evaluation of ceftibuten in the treatment of uncomplicated urinary tract infections in adult Mexican patients. *Revista Mexicana de Urología*.
- Rojas, G., Levaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharma.* 74, 97–101.
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Pérez, J., Salinas, M.C. , Waksman, N. 2008. Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico, *Pharm. Biol.* 46, 166–170.

- Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A. J., Bonomo, R. P. 1991. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 1-8.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2012. Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales.
- Stuppner, H., and Müller, E. P. 1994. Rare flavonoid aglycones from *Flourensia retinophylla*. *Phytochem.* 37, 1185-1187.
- Talero, E., Alcaide, A., Ávila-Román, J., García-Mauriño, S., Vendramini-Costa, D., Motilva, V. 2016. Expression patterns of sirtuin 1-AMPK-autophagy pathway in chronic colitis and inflammation-associated colon neoplasia in IL-10-deficient mice. *International immunopharmacology.* 35, 248-256.
- Team Core R. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E. D., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., Kobaisy, M. 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *Journal of chemical ecology.* 27, 2263-2273.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chem.* 104. 466-479.
- Verni, C., Alva, M., Muruaga, N., Borkosky, S., Cartagena, E., Bardón, A. 2011. *Flourensia fiebrigii* (Asterales: Asteraceae), fuente de metabolitos antipatogénicos. 48: 91-99.
- Ventura, J., Belmares, R., Aguilera-Carbo, A., Gutiérrez-Sanchez, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N. 2008. Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata*) and tar bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 213.
- Wang, Y., Pan, X. 2014. *Proteus*. Encyclopedia of Food Safety. 1, 486-489.
- Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez, D. B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar, C.N. 2014. Microplate Quantification of Total Phenolic Conten.
- Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., Aguilar, C. N.

2015. Total phenolic content, *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac J Trop Med.* 8, 104-111.

Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., Xu, X. 2013. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 1828:2751-2756.

Zheng, H. H., Jiang, X. L. 2016. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 16 observational studies. *European journal of gastroenterology and hepatology.* 28, 383-390.

Zhou, H., Wang, X. 2015. Spectrometric study on the interaction of sodium cholate aggregates with quercetin. *Physicochem. Eng. Aspects* 31- 37.