



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Evaluación preliminar de la actividad
antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las
hojas de *Pereskia aculeata* Mill.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

QUE PRESENTA

RICARDO ANDRÉS RAMOS TORRES

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ LÓPEZ

CUERNAVACA; MORELOS, MARZO DE 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARÍA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 08 de septiembre de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0110/2021

DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **"Evaluación preliminar de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las hojas de *Pereskia aculeata* Mill."** presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Ricardo Andrés Ramos Torres, (20131009772)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Jorge Armando Moreno Escobar

Dr. Alexandre Toshirico Taketa Cardoso

M en C. Lucía Corona Sánchez

Dra. Amanda Ortiz Sánchez

Dra. María Crystal Columba Palomares



ATENTAMENTE
"POR UNA HUMANIDAD CULTA"

M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia

Cp Archivo
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2021-09-08 17:45:45 | Firmante

fpR5jWqQxr1EQckkQvqJBKG059qyN/v3IEhh3r1e3Lzf64cQO5Ok4apeoh86iq0D2uUZ0GNyOw2nCW8LCFAoWSGC8FDUH/vDFyknnJLgUWMChBPXpEdjgKM5G6swX+3AVZq
qwcE+zYYG52odJXBHD+03Xn/PYS3rV8ITOnDzNVldKkMXOytWylSTq5R7EgvlSsebOxSVQD8LVU8pwM8nlPMV8/dYQ1iPrvJjvjqLmpPoiJEdMc1b5ZksO9kSOJC4DcZvi+b+KKc
IgvQcH7qiuJ3iOSYVQVTdcizW+4LIF3/KTab1ielgMX3eEkecxP4I8bTYwwwyeHFIPe81Tq+ZUA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

1eWDtV

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2TgalRsfGqHG0VgW1wVNwl58KSir90d3>



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMANDA ORTIZ SANCHEZ | Fecha:2021-09-14 09:49:57 | Firmante

NECbHvJB11eT554/Ns/0jlm8PA8k6kuM2U64gfBbBkrKIS1AS/iniKItsierUulCTJSHJqgoqNFZyqKOSz9AbwCe8F5XzTmMSeRp+CtG/utxxZkONFD+bDDOSUqAMx9+5Vq4tXgwiSC8L6zFg6wrVvv/+uGKBURrw551+xFQ76pze0Yc0I0eiQKcZo8LimDw44B9zE5ENwKwkPMtHDxjDfDMclyGrvhUAoS88dQS7Nlr6cgCZhe1hfdiD/LwdHzea1QOEgha0l68LZ1UHwWpHS1CZt1nIIP2nFh4PtOSP8nD49JxWNFB3DD5q/2M3VUo8mFILEMhmtmh04o7Anw==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-09-14 10:31:08 | Firmante

EF84IwDovwI5JysQzAp6ezCrl+ra6mD+WmX7TLgE9oM+Fw1VD5U9rkHOTytaUJ0xd3GxojHupxLYoJBK6HGpmE0voawP7OCPpU4ZYpepOfWwKf5S/+zi0fTWpHPKnBmB9iuyh886eahWt15Kw8XAabOTMbslSYhEW7WEmaMTe2a7Mk/IRoesRgm/0kPkG5lKJWwMwL/D0gvgqPmCwcpX2Vd+NGKzz3fX4hSopxXWio/7S9Zh/fflaophpUP7VUpJ9qP3/JHqkK16AQw0Dm0pITDnqVdDQ/kXIUqtsWOUskibh2RY8vEIX6pit77v0BYE3ivj4UIGPMXv3Srof8A==

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2021-09-14 19:07:24 | Firmante

KlcWefWQOaLnaur40lIK3TuiKcltoulMfuqM/nX2gFFxpUXXPxf5f17S5cJTtyQGLZQJ0s2EAjsi77KoBDG9zNMOqfr1mVax+MT+LdfzU9kOq4iHmoJ5zn8mTh6x9eZxNblDIQrYvENUW26d0f9wE6fZ44JK1pjzQdTuh5hpUIBYd9EW0pzLyMe9xcY/llidF7PPdSaXGpKb00gQ56IUtwBMxhLw8CpVnDhmCDqQPH7aEICJcTMjvL6//Xs7i4KtCk/ZRD3AzgijhD2NMi632O2VjdTJrR+ID1kRvHawxtvk/zYVWVhOq/p4NFOMm+RwGfnxhTMVWXJQ45TvDDRYg==

JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha:2021-09-15 13:52:39 | Firmante

RGutxob0XcdkvjQrbe3A795b3gOllC9p1zgeMXbRF7mazmLUL4Eni36M7Mda/rFlu7cIPJRGe7mt4rtKDMsrMw4XWfMA4xtpyBd6zU0VJ2chHBqkOoumArJTx/Lcl3xXtdAkUO9HyBn10hYD6MowTH3Qe2lidaCfr2zx9FWt9HaplRW674Y0udJ6FFD+qMZhN4C9OXFCjdJms6zr3CDNJ0ZQ22KJRAxgsi1dJA/LmTK+JaRvB0fr5+akNndbYltRtjN/ZgcZqK1UtgP4yWUQ0DsEdA/gGI5JRAs+7nNaCDZokmCdUSut7IHGTpW8cWHSXCuLDY3FBFs1cibOHQ==

LUCIA CORONA SANCHEZ | Fecha:2021-09-15 20:29:57 | Firmante

XrBykZuEfl3gN/Su1Fd29Y3vvNp6lAfx48lfUe53iKqNvZt4J+UugxJF2a3slrNOleTN56uZbM1muDRcCnaiVAEawmpzd7qeZhRrjGSuhmT6NRRN/XVwtOlw6E9Na0Ce53yJgwGiRVuvHUTvtaCxsqsUbwRkxUsZXCmHQ6QYjOAcBk83zJwObxSHoAY+eS+Im6cYPRdbBHDyYl2ue8RQ8UCOLZIX0OgEOIIEEvefoqJag9knSUiXAKH7r98+Iik/TMjlrfoKvOd7x/2e8VFDoUNOG1Q0X4Ta17srMrBMHLIXqzt+JY0uh6o8BWCDlqYtAhLjIOCqlyhffgebcnfg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



6Pv2Ct

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iwl7mx1HKCTvoEI0WXSQhmHOLaGhAhg1>

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Verónica Rodríguez López por haberme recibido en el laboratorio 12 de Productos Naturales, por su tutoría y asesoría que, a través de su experiencia, conocimientos y consejos, me permitieron realizar el presente trabajo. También por ser un ejemplo a seguir debido a su dedicación y empeño que pone en cada uno de sus proyectos y en cada uno de sus alumnos.

A la Facultad de Farmacia por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones durante la realización del proyecto.

A mis asesores técnicos M. en C. Lucía Corona Sánchez, Dra. María Crystal Columba Palomares y Dr. Omar Aristeo Peña Moran, por su apoyo, consejos y comentarios que me llevaron de la mano para atender los nuevos retos y metas que se me presentaron durante la realización de este proyecto de tesis.

A mis profesores a lo largo de la licenciatura, quienes no solo nos transmitían conocimientos y aprendizajes, también fungían como guías e inculcaban el amor por la Farmacia en cada una de sus clases a través su experiencia.

A mis compañeros del L-12 por compartir conocimientos y vivencias, especialmente Wendy, Seret y Abraham, quienes fueron mis guías, instructores y apoyo tanto en mi llegada al laboratorio como en los momentos de incertidumbre.

DEDICATORIAS

A mis padres Margarita Torres Alor y Ricardo Ramos Martínez, a quienes les agradezco su apoyo incondicional en cada una de las decisiones que he tomado durante mi vida, también por los regaños y consejos, sobre todo gracias por ser un ejemplo a seguir, y enseñarme tanto a mi como a mi hermana, que todo es posible mediante trabajo, perseverancia y dedicación. Gracias por todo.

A mi hermana Karen que desde que llego a mi vida me ha acompañado y me ha brindado su cariño y amistad.

A mi familia en general que de alguna u otra manera han estado presentes en momentos importantes de mi vida gracias por estar ahí, especialmente a Teodora Martínez Villegas (QEPD) y Celso Torres Padua (QEPD), quienes me enseñaron que no existen barreras que te puedan detener siempre que tengas iniciativa e ingenio para derribarlas.

A mis amigos y compañeros Mirna, Pao, Gus, Pablo, Gaona, Max, Enrique, Ana y a el “Club de las Lobas” (Miguel, Adriel, Nath, Ricardo, Tomas, y los que me faltaron), gracias por su apoyo, amistad, consejos y sobre todo por los grandes momentos que vivimos tanto dentro de clases como fuera de ellas, siempre los recordare.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Radicales libres.....	3
2.1.1 Estrés oxidativo.....	5
2.1.2 Antioxidantes	6
2.2 Cáncer	8
2.3 Inflamación.....	10
2.3.1 Inflamación aguda.....	11
2.3.2 Inflamación crónica	12
2.4 Familia Cactaceae	13
2.5 Generalidades del género <i>Pereskia</i>	14
2.5.1 Información botánica.....	14
2.5.2 Información fitoquímica.....	16
2.5.3 Estudios farmacológicos del género <i>Pereskia</i>	21
2.5.4 Estudios fitoquímicos del género <i>Pereskia</i>	21
2.5.5 Estudios etnomédicos del género <i>Pereskia</i>	23
2.6 Generalidades de la especie <i>Pereskia aculeata</i>	24
2.6.1 Estudios fitoquímicos de <i>Pereskia aculeata</i>	24
2.6.2 Estudios farmacológicos de <i>Pereskia aculeata</i>	27
3 JUSTIFICACIÓN	29
4 HIPÓTESIS.....	30
5 OBJETIVO GENERAL	30
5.1 Objetivos particulares	30

6	METODOLOGÍA.....	31
6.1	Recolección de materia vegetal y obtención de droga.....	31
6.2	Extracción en fresco	31
6.3	Concentración de extracto	31
6.4	Ensayo de determinación de la actividad antioxidante por el método de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).....	32
6.5	Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS ^{•+}).....	32
6.6	Evaluación de capacidad reductora del fierro (CARF)	33
6.7	Cálculo de porcentaje de inhibición	33
6.8	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀)	33
6.9	Ensayo de citotoxicidad	33
6.9.1	Preparación de muestras.....	34
6.9.2	Preparación de las células.....	34
6.9.3	Control día cero	34
6.9.4	Fijación y tinción celular.....	34
6.9.5	Lectura colorimétrica.....	35
6.10	Edema inducido por TPA 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol.....	35
6.10.1	Preparación de muestras.....	35
6.11	Fraccionamiento	36
6.12	Cromatografía en capa fina (CCF).....	36
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1	Recolección de la especie vegetal y obtención del extracto:	38
7.2	Cuantificación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de la capacidad antioxidante por el método de DPPH: 2,2-Difenil-2-picrilhidrazilo).....	39
7.3	Capacidad antirradicalaria por método 2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS ^{•+}) 42	
7.4	Capacidad Reductora de Hierro (CARF).....	44
7.5	Ensayo de Citotoxicidad (Cribado).....	46
7.6	Fraccionamiento Primario	48
7.7	Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol)	48
8	CONCLUSIONES	52
9	PERSPECTIVAS	52
10	BIBLIOGRAFÍA	53

11	ANEXOS:	60
11.1	Preparación de las muestras y soluciones.....	60
11.1.1	Muestra de Extracto.....	60
11.1.2	Solución DPPH.....	60
11.1.3	Solución ABTS.....	60
11.1.4	Solución [Fe (III)(TPTZ) ₂] ³⁺	60
11.1.5	Buffer acetato sodio (BAS).....	61
11.1.6	Inactivación de Suero Fetal Bovino (SFB)	61
11.1.7	Preparación de PBS	61
11.1.8	Preparación de Medio RPMI-1640.....	61
11.1.9	Sulforodamina B (SRB)*	61
11.1.10	Preparación de TRIS-Base*	61
11.2	: Prueba T Student para muestras independientes.....	63
11.2.1	INDO-AcOEt	63
11.2.2	INDO-MeOH	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies Reactivas del Oxígeno y Nitrógeno (Soto-bernardini & Raventós-vorst, 2008), (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013), (Ye <i>et al.</i> , 2015).....	3
Tabla 2: Clasificación de antioxidantes (Venereo Gutiérrez, 2002).....	7
Tabla 3: Metabolitos aislados dentro del género <i>Pereskia</i> , (Sharif <i>et al.</i> , 2013), (Ferreira de Almeida <i>et al.</i> , 2014), (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (tomado de (Carvalho Guilhon <i>et al.</i> , 2015), (N. de C. Campos Pinto, do Nascimento Duque, <i>et al.</i> , 2015).....	17
Tabla 4: Clasificación taxonómica de la especie <i>Pereskia aculeata</i>	24
Tabla 5: Preparación de muestras para ensayo de edema inducido por TPA.....	35
Tabla 6: Sistemas de elución utilizados en Cromatografía en capa fina.	37
Tabla 7: Reveladores usados en la CCF.....	37
Tabla 8: Extracto total metanólico obtenido de hojas de <i>P. aculeata</i>	38
Tabla 9: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i> utilizando el método de evaluación del radical DPPH.	40
Tabla 10: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i> utilizando el método de evaluación ABTS ⁺	43
Tabla 11: Actividad reductora de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i>	45
Tabla 12: Comparación de Porcentaje de supervivencia Extracto Métanolico <i>P. aculeata</i>	47
Tabla 13: Fracciones y pesos obtenidos.	48
Tabla 14: Resultados obtenidos en porcentaje de inhibición de las muestras (extracto y fracciones) probadas en modelo de edema inducido por TPA a 0.1 mg/oreja.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno. (Sanchez-Valle, 2013).	4
Figura 2: Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad (Sánchez-Valle, 2013).....	5
Figura 3: Número estimado de nuevos casos en 2020 a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades, todos los cánceres excluyendo el cáncer de piel no melanoma. (Global Cancer Observatory/Organización Mundial de la Salud, 2020) GCO/OMS.....	8
Figura 4: Defunciones provocadas por cáncer en México. (INEGI, 2018).....	9
Figura 5: Representación de la distribución a nivel mundial de la familia Cactaceae (Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares).	13
Figura 6: Hojas y frutos de <i>P. aculeata</i>	14
Figura 7: Distribución de <i>P. aculeata</i> en México/Estado de Morelos.	15
Figura 8: Alcaloides y metabolitos aislados en <i>P. bleo</i> y <i>P. grandifolia</i>	22
Figura 9: Esteroles y metabolitos antioxidantes aislados de <i>P. bleo</i>	23
Figura 10: metabolitos aislados de <i>P. aculeata</i>	25
Figura 11: Metabolitos aislados de <i>P. aculeata</i>	26
Figura 12: Especímen recolectado (fotografía Izq). Selección de los especímenes a recolectar (fotografía Der.).....	38
Figura 13: Hojas de <i>P. aculeata</i> (foto. arriba Izq.), Molienda en fresco de hojas (foto. arriba al centro), Macerado (foto arriba der.), Extracto total de hojas previo a concentración (foto abajo izq.), Concentración a presión reducida (foto. abajo der.).	39
Figura 14: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i> por método de evaluación de DPPH (Escala logarítmica base 10).....	40
Figura 15: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i> por método de evaluación de ABTS ^{•+}	44
Figura 16: Comparación de los equivalentes de FeSO ₄ de los extractos metanólicos de <i>P. aculeata</i> y <i>C. sinensis</i> utilizando el método de evaluación por reducción de CARF.	46

Figura 17: Botellas de fracción acuosa liofilizado (Der.), cromatograma revelado en cámara de yodo, fase móvil 7:3 (Dicloro metano: Metanol), orden de muestras: Extracto metánolico-Fase acuosa-Fase metanolica-Acetato de etilo-Fracción hexánica..... 48

ABREVIATURAS

% p/p	Porcentaje peso-peso
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
A-549	Carcinoma de pulmón
ABTS⁺	2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ASR	Age-Standardized-Rate/Tasa Relativa Ajustada por Edad
AcoEt	Acetato de etilo
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>C. sinensis</i>	<i>Camelia sinensis</i>
CARF	Capacidad antioxidante reductora de fierro
CAT	Catalasa
CFF	Cromatografía en capa fina
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CIByC	Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
EVP	Etoposido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Enfermedades Crónico Degenerativas
EO	Estrés oxidativo
ERN	Especies Reactivas de Nitrogeno
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FeCl₃.6H₂O	Cloruro férrico hexahidratado
FeSO₄	Sulfato de hierro (II)
FH	Fracción hexanica
GCO	Global Cancer Observatory
GPx	Glutación Peroxidasa
HEK-293	Células embrionarias de riñón
HeLa	Carcinoma cervicouterino

h	Horas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia
MCF-10A	Epitelio de glandular mamario
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MeOH	Metanol/Metanólico
mM	Milimolar
NADPH-ox	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
POD	Podofilotóxina
<i>P. aculeata</i>	<i>Pereskia aculeata</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. bleo,</i>	<i>Pereskia bleo</i>
<i>P. citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>P. grandifolia</i>	<i>Pereskia gradifolia</i>
PC-3	Adenocarcinoma prostático
RAE	Retinol activity equivalents/Equivalentes de actividad del retinol
RL	Radicales Libres
SRB	Sulforodamina B
SOD	Superóxido dismutasa
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> / estafilococo dorado
TPA	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
U.V./UV	Ultravioleta
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Vis	Visible

RESUMEN

A través de los años, la historia nos narra la incesante lucha del hombre por mejorar y establecer una mejor calidad de vida, parte de los esfuerzos de esta lucha se centran en la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento y prevención de padecimientos de alta incidencia como las Enfermedades Crónico Degenerativas (ECD). Algunas de estas ECD están relacionadas con el estilo de vida y condiciones medioambientales, lo cual conlleva al rompimiento homeostático y aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, desencadenando estrés oxidativo, es por ello que se ha apostado por la implementación de la terapia integral, en donde resalta el consumo de vegetales y frutos ricos en moléculas antioxidantes. Bajo esta premisa en el presente trabajo de investigación se busca como objetivo determinar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica del extracto metanólico total de las hojas de la especie *Pereskia aculeata* Mill. Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante se emplearon los métodos de evaluación por el radical DPPH y el método de capacidad reductora de hierro (CARF), de igual manera el extracto se evaluó para determinar la capacidad citotóxica en las líneas celulares HEK 293, HeLa, MCF-7, MCF-10A, A-549 y PC-3 empleando el bioensayo de Sulforodamina B, además se evaluó la capacidad antiinflamatoria mediante el edema inducido en oreja de ratón por TPA. Los resultados obtenidos del extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* presentó una baja capacidad antioxidante por el método de DPPH con una CI_{50} de $446.79 \pm 9.53 \mu\text{g/mL}$ siendo menor al control *Camellia sinensis* CI_{50} de $47.69 \pm 1.79 \mu\text{g/mL}$. En cuanto a la capacidad antirradicalaria por método ABTS⁺⁺ el extracto total metanólico presenta una capacidad antirradicalaria baja (CI_{50} de $129.54 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$) con respecto al control positivo *Camellia sinensis* (CI_{50} de $5.98 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$). En la prueba de capacidad reductora de hierro (CARF) el extracto total metanólico presenta efecto dependiente de concentración (611.61 ± 0.60 equivalentes μM de FeSO_4), siendo 1.69 veces más activo a la concentración máxima probada que el control *C. sinensis* (1038.42 ± 1.02 equivalentes μM de FeSO_4). En cuanto a la actividad citotóxica después de haber realizado el análisis de datos mediante tamizaje se utilizó el criterio de 50% de muertes a $50 \mu\text{g/mL}$, y se reevaluaron en segunda estancia las líneas PC-3 y MCF-7, bajo el criterio de concentración máxima de $20 \mu\text{g/mL}$, donde no fue posible determinar la IC_{50} debido a que el extracto no presentó actividad sobre las líneas celulares probadas. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante edema inducido

en oreja de ratón por TPA a una concentración de 0.1 mg/oreja, donde se destaca su efecto inhibitorio del $87.36\% \pm 2.29$ y el control indometacina $90.20\% \pm 3.42$.

Mediante el análisis de los resultados obtenidos se puede concluir de forma general que el extracto total metánolico e hojas de *P. aculeata* presenta una baja capacidad antioxidante (DPPH) y antirradicalaria (ABTS^{•+}), a su vez nos indica tener una buena capacidad reductora por medio de transferencia de electrones (CARF). Por otra parte, como citotóxico podemos observar que no presenta actividad sobre las líneas celulares probadas. Sin embargo, encontramos que el extracto total metánolico de hojas de *P aculeata* presenta actividad antiedema.

1. INTRODUCCIÓN

La historia de la humanidad cuenta a lo largo de diversos capítulos cómo el hombre ha invertido su tiempo en establecer una calidad de vida mayor mediante la búsqueda, desarrollo e implementación de nuevas tecnologías, pretendiendo así rapidez, comodidad y eficiencia, lo cual se observa de manera palpable desde actividades cotidianas como la comunicación hasta la implementación de nuevas terapias en la medicina, que han ayudado a la prevención, detección y tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, de la mano de estos avances significativos en la medicina, también surgen de igual manera nuevos retos, entre los cuales se destacan la inclusión de tratamientos más eficaces y seguros además de una búsqueda para controlar y tratar con la aparición de nuevas enfermedades y el aumento en el número de casos de las enfermedades ya existentes que lejos de presentar un panorama favorable se proyectan con una alta tasa de mortalidad. Ejemplo de esto son las enfermedades crónico degenerativas (ECD) como lo son el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, y la diabetes mellitus por citar algunas (Coronado H. *et al.*, 2015).

El desarrollo de algunas de las ECD se ven estrechamente relacionadas con el estilo de vida sedentario, déficit de nutrientes, consumo de sustancias y condiciones medioambientales, los que a su vez favorecen el rompimiento homeostático por aumento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) o debido a la disminución o inhibición de los mecanismos antioxidantes endógenos lo cual conlleva a la aparición de estrés oxidativo (Rosado-Pérez & Mendoza-Núñez, 2007), (Elejalde Guerra, 2001). La importancia de las ERO en niveles óptimos dentro del organismo radica en la defensa de agresiones externas causadas por xenobióticos patógenos (virus, bacterias y parásitos) y células con características anormales, siempre y cuando estas no superen el número de defensas antioxidantes, cuando las ERO superan estas defensas pueden llegar a causar estragos en macromoléculas tales como proteínas, ácidos grasos y nucleicos, los cuales por diversos métodos pueden contribuir al desarrollo de algunas ECD como lo son la aterosclerosis, cardiomiopatías, diabetes tipo 2, enfermedades neurológicas entre las cuales se incluyen enfermedad de Alzheimer y Parkinson y proliferación de cáncer (Avello & Suwalsky, 2006), (Ye *et al.*, 2015), (Mañon Rossi *et al.*, 2016), (Mora Agüero *et al.*, 2019).

En capítulos recientes de la historia con la fiel misión de prevenir y tratar algunas enfermedades se ha apostado por la implementación de una terapia integral donde la dieta basada en consumo de

vegetales y/o productos ricos o fortalecidos en moléculas antioxidantes es parte fundamental, lo cual se corrobora mediante el hallazgo y caracterización de múltiples moléculas con marcada actividad antioxidante, entre las cuales se encuentran las vitaminas E, A, D y C algunas provitaminas que naturalmente se encuentran en vegetales y frutos (Hernández Ángel & Prieto González, 1999), (Coronado H. *et al.*, 2015), (Carvajal Carvajal, 2019).

Partiendo de la premisa que representa la diversidad de especies que podrían presentar una o más moléculas antioxidantes y la potencial aplicación en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, ha despertado un gran interés técnico científico que posiciona a los productos naturales como una fuente principal de obtención de estos agentes que pueden ser utilizados en la terapia conjunta y/o tratamiento. Siempre se ha tenido como punto de partida el conocimiento de la medicina tradicional y su difusión, especialmente en México donde el conocimiento etnobotánico se fundamenta a través de conocimientos transmitidos a lo largo de los años mediante el empleo de estelas, códices, enseñanzas verbales y compilaciones de estos últimos ejemplo de esto la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, donde se destacan el tratamiento de diversos padecimientos y enfermedades (Gómez-Pompa, 1993), además de integrar la evidencia publicada en estudios controlados afines a la inclusión de agentes antioxidantes (preventivos y/o terapéuticos).

En nuestro caso particular esta búsqueda de agentes quimiopreventivos nos ha llevado al estudio de *Pereskia aculeata* una especie perteneciente a la familia de las cactáceas, conocida popularmente como “Bugambilia blanca”, “Uña de gato”, “Grosellero” o “Ramo de novia” (Segura *et al.*, 2018). Esta especie de cactácea, al igual que otras especies han despertado el interés de estudio debido a que han desarrollado diversas estrategias contra el estrés biótico y abiótico a través productos metabólicos secundarios con propiedades terapéuticas de índole analgésica, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), e inclusive propiedades alucinógenas. Los metabolitos responsables de estas propiedades son incorporados a través de la dieta pues forman parte del núcleo activo de las enzimas oxidantes (García Bacallao *et al.*, 2001). Es por ello que en este trabajo de investigación nos centramos en el potencial farmacológico preventivo y antiinflamatorio de *P. aculeata* teniendo como principal objetivo la evaluación de las hojas de la especie como agente antirradicalario y/o antioxidante y su potencial como antiinflamatorio.

2 ANTECEDENTES

2.1 Radicales libres

Se considera un radical libre (RL) a toda aquella molécula que presenta en su estructura atómica un electrón desapareado o impar en su orbital externo, proporcionándole así una configuración con una alta reactividad. Con un comportamiento similar se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) las cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1: Especies Reactivas del Oxígeno y Nitrógeno (Soto-bernardini & Raventós-vorst, 2008), (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013), (Ye *et al.*, 2015).

EROS		ERN	
Radicales	No radicales	Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Ácido nitroso (HNO_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Acido hipocloroso (HOCl)	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Peroxil (RO_2)	Ozono (O_3)		
Alcoxil (RO^{\cdot})	Oxígeno singulete ($^1\Delta g$)		
Hidroperoxil (OH_2^{\cdot})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)		

Los problemas a la salud se producen cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, los cuales producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo (Avello & Suwalsky, 2006)(Ye *et al.*, 2015), (Coronado H. *et al.*, 2015).

Por última instancia se encuentran los intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno, en los cuales se incluyen un grupo de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadores de estas sustancias o son producto de la reducción del metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete ($^1\Delta g$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), y los hidroperóxidos orgánicos (Venereo Gutiérrez, 2002).

La formación de estos radicales libres ocurre tanto a nivel intracelular como extracelular. Entre las células responsables de la producción de radicales libres del oxígeno tenemos a células relacionadas con las líneas de defensa como: neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales, además de estas células encontramos enzimas oxidantes como: la xantina oxidasa, indolamindioxigenasa, triptofano-dioxigenasa, mieloperoxidasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monoamino-oxidasa y NADPH oxidasa (como podemos observar en la figura 1).

Para un mejor estudio las ERO (Especies Reactivas del Oxígeno) se han clasificado de acuerdo con su naturaleza y origen en:

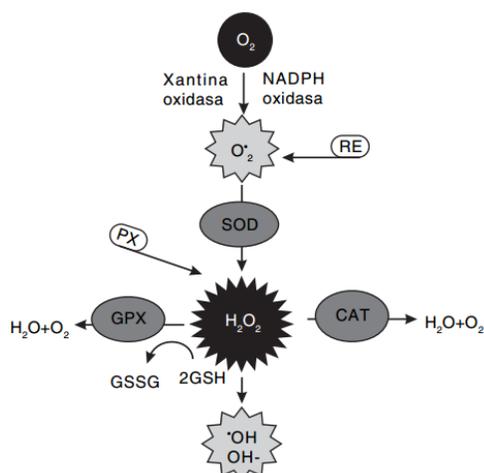


Figura 1: Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno. (Sanchez-Valle, 2013).

Orgánicos o primarios, los cuales se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el óxido nítrico (NO^{\cdot}).

Inorgánicos o secundarios. Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más prolongada que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S) (Venereo Gutiérrez, 2002).

2.1.1 Estrés oxidativo

El denominado "estrés oxidativo" (EO) se presenta cuando existe un rompimiento de la homeostasis a causa de una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida (Oxilia, 2010), (Coronado H. *et al.*, 2015).

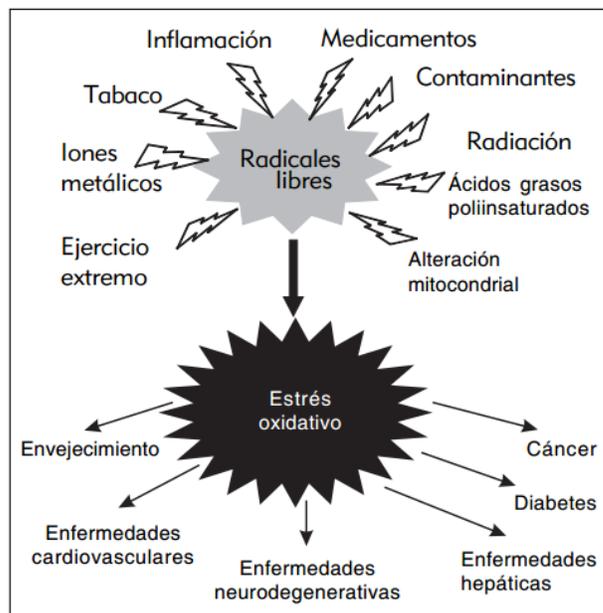


Figura 2: Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad (Sánchez-Valle, 2013).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición a diversas fuentes que producen una ruptura de la homeostasis, de moléculas o factores pro oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de neutralizar dichas especies químicas (Figura 2), ya sea por déficit o por incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Venereo Gutiérrez, 2002), (Mora Agüero *et al.*, 2019), desencadenando afectaciones a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico, que pueden clasificarse en las generadas por pro-oxidantes que modifican el estado redox y alteran la tolerancia a la glucosa, favoreciendo el EO mitocondrial en enfermedades como el cáncer y la diabetes mellitus; el segundo grupo incluye EO de tipo inflamatorio y una mayor actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH-ox) que conducen a la

aterosclerosis e inflamación crónica; y el tercer grupo deriva del sistema xantinaoxidasa, generando ERO implicados en la lesión isquémica por reperfusión (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013).

Los procesos patológicos implicados con el EO son diversos, entre los relevantes se encuentran el envejecimiento, la aterosclerosis, diversos tipos de cáncer, la enfermedad de Alzheimer, Diabetes Mellitus, Insuficiencia renal aguda, enfermedades autoinmunes, inflamación crónica, situaciones de daño por isquemia, entre otras (Elejalde Guerra, 2001),(Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013), (Mora Agüero *et al.*, 2019). El incremento de nuevos casos y muertes relacionadas a las patologías antes mencionadas, muchas veces está relacionado a una detección tardía, así como en parte a factores dietéticos y conductuales entre los que se encuentran: El índice de masa corporal elevado, la ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y el consumo de alcohol, es por esto que muchos de los estudios recientes se han basado en la búsqueda e identificación de moléculas quimio protectoras, esto aunado a la creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y la medicina verde como alternativa (Hernández Ángel & Prieto González, 1999).

2.1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que pueden evitar, prevenir o reducir el daño oxidativo a varias biomoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos (Venereo Gutiérrez, 2002). Los antioxidantes actúan como “secuestradores” de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Sousa *et al.*, 2014), es decir el antioxidante al colisionar con el radical libre, cede un electrón oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico. Cabe mencionar que no todos los antioxidantes actúan de esta manera, debido a que los denominados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los radicales libres (Oxilia, 2010), y de esta manera se evita la iniciación o progresión de algunas enfermedades crónico degenerativas, convirtiéndose en compuestos importantes en la quimio prevención de estas mismas. Para un mejor estudio los antioxidantes se han clasificado en endógenos (Tabla 2), los cuales se encuentran en el organismos y son sintetizados por sus células y exógenos quienes a su vez ingresan a través de la dieta (Oxilia, 2010). Los antioxidantes endógenos tanto como exógenos tienen un mecanismo de acción similar actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, en el caso de los exógenos su reposición debe ser continua mediante la ingestión de nutrientes que los contengan (Venereo Gutiérrez, 2002), (Coronado H. *et al.*, 2015).

Tabla 2: Clasificación de antioxidantes (Venereo Gutiérrez, 2002).

Antioxidantes			
Endógenos		Exógenos	
Enzimáticos	No enzimáticos	Vitamina E	
Superóxido dismutasa (SOD)	Glutación	Vitamina C	
Catalasa (CAT)	Coenzima Q	β -carotenos	
Glutación peroxidasa (GPx)	Ácido tiocico	Flavonoides, licopeno	

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos, formando así un sistema de defensa antioxidante que está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, con respecto al cáncer se señala que si los radicales libres afectan el ADN (ácido desoxirribonucleico) pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas (Coronado H. *et al.*, 2015).

2.2 Cáncer

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades que involucran procesos de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo que se presenta en forma de tumor que suele invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del organismo (Organización Mundial de la Salud, 2020).

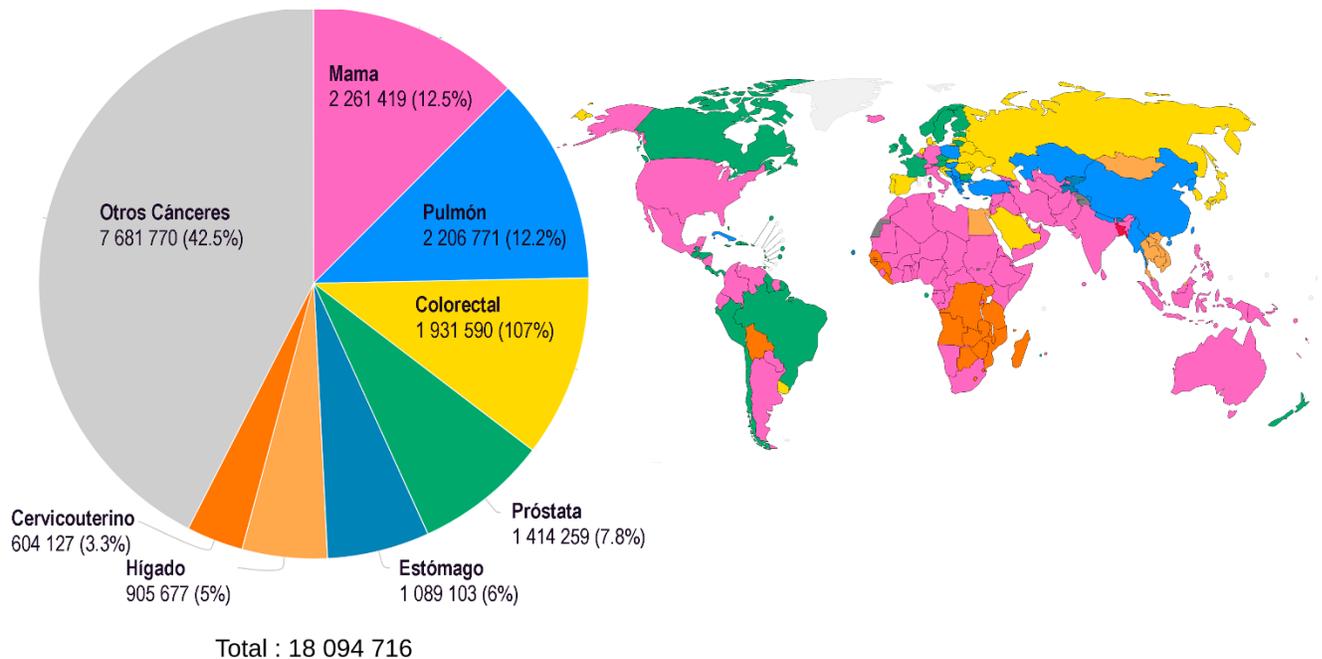


Figura 3: Número estimado de nuevos casos en 2020 a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades, todos los cánceres excluyendo el cáncer de piel no melanoma. (Global Cancer Observatory/Organización Mundial de la Salud, 2020) GCO/OMS.

El cáncer y sus subtipos se consideran de los más letales debido a su especificidad y facilidad de diseminación, el cual con el paso de los años se ha posicionado como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a lo largo del mundo, registrando cifras que superan los 14 millones de casos nuevos y 8.8 millones de muertes relacionadas tan solo en el año 2015. Aunado a esto se prevé que el número de casos aumente en 70% en los próximos 20 años, según datos recopilatorios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Informe Mundial Sobre Cáncer de 2014, en la Figura 3 podemos observar un estimado de nuevos casos de cáncer a nivel mundial en 2020, donde podemos observar el problema latente que representa a la salud pública a nivel mundial.

En nuestro país los números respaldan estas cifras de acuerdo a datos recopilatorios del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia (INEGI) de 2018 según los listados de mortalidad general por enfermedad los tumores malignos de huesos, cartílagos articulares, tejido conjuntivo, de piel y mama representan el 1.61% de defunciones totales anuales, los tumores malignos de órganos respiratorios e intratorácicos representan el 1.12% de defunciones totales anuales y los tumores malignos genitourinarios representan el 2.74%, como podemos observar en la Figura 4.

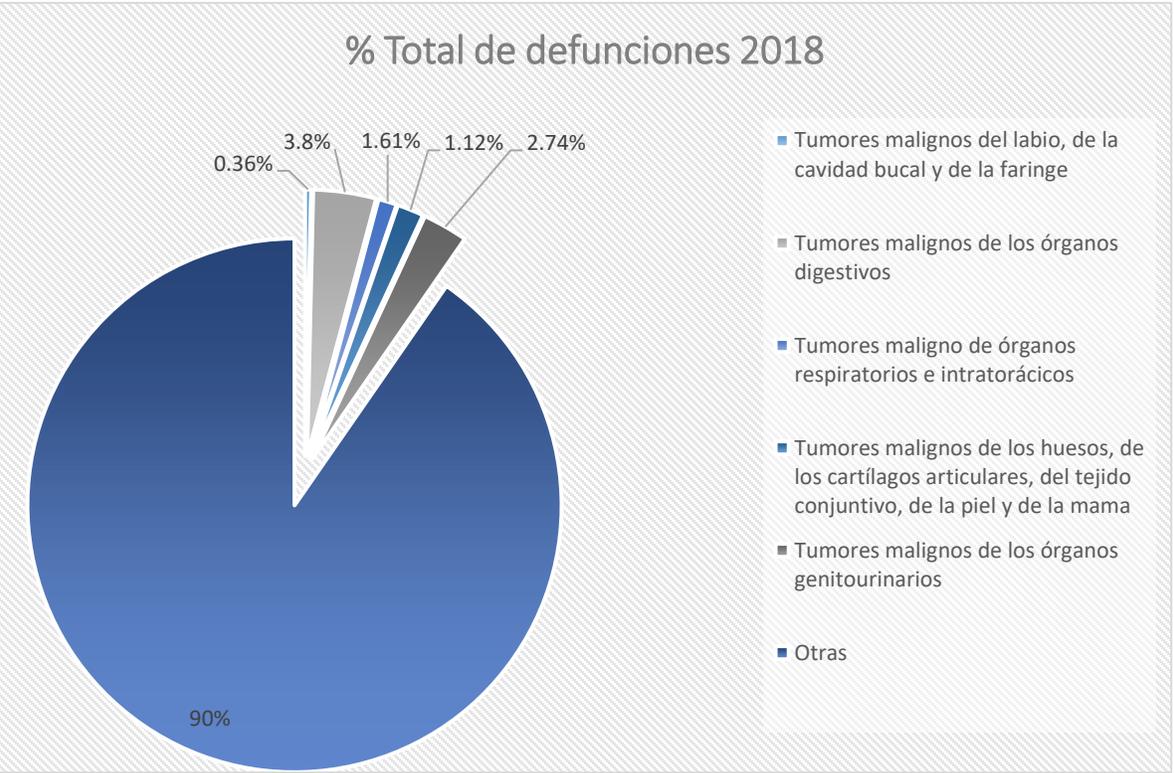


Figura 4: Defunciones provocadas por cáncer en México. (INEGI, 2018).

2.3 Inflamación

La inflamación por definición es una reacción tisular compleja que consiste básicamente en respuestas de los vasos y los leucocitos, los cuales son las principales defensas corporales frente a los invasores extraños (xenobióticos) las proteínas plasmáticas y células blancas, además de los fagocitos tisulares derivados de las células circulantes. La respuesta inflamatoria coordina las reacciones de los vasos, los leucocitos y las proteínas plasmáticas orientadas a conseguir este objetivo (Kumar *et al.*, 2010) el proceso inflamatorio desencadena una serie de procesos entre los cuales se encuentran la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad de los capilares, coagulación de líquido en espacios intersticiales por aumento de fibrinógeno y otras proteínas, migración de granulocitos, monocitos y tumefacción de células tisulares (Hall & Guyton, 2016). Estos procesos se caracterizan por la aparición de los signos cardinales de la inflamación siendo el rubor (eritema), tumor (tumefacción), calor (aumento de la temperatura), dolor y, la *functio laesa* (pérdida de la función) (Porth & Grossman, 2014).

La inflamación puede ser aguda o crónica en función de la naturaleza del estímulo y la eficacia de la reacción inicial para eliminar el estímulo o los tejidos lesionados. La inflamación aguda se inicia de forma rápida (en minutos) y dura poco, unas horas o pocos días; se caracteriza, sobre todo, por la exudación de líquido, proteínas plasmáticas (edema) y la migración de leucocitos. En cambio la inflamación crónica puede aparecer después de la inflamación aguda o ser insidiosa desde el comienzo, presenta como una característica principal una duración prolongada y asociada a la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación vascular, fibrosis y destrucción tisular (Porth & Grossman, 2014) (Kumar *et al.*, 2010). En la inflamación crónica se presenta una mayor duración, que va de días a años, y se asocia con presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis del tejido (Porth & Grossman, 2014).

La inflamación puede estar implicada en diversas enfermedades, que no se consideran debido a que se presenta como una forma primaria de alteración de la respuesta del anfitrión. Por ejemplo, la inflamación crónica puede participar en la aterosclerosis, la diabetes de tipo 2, los trastornos degenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, o el cáncer (Kumar *et al.*, 2010).

2.3.1 Inflamación aguda

La inflamación aguda es la reacción inmediata de los tejidos locales y sus vasos sanguíneos a la lesión. De manera típica, se presenta antes de que se desarrolle la inmunidad adaptativa y se dirige sobre todo a la eliminación del agente lesivo y la limitación de la extensión del daño tisular (Porth & Grossman, 2014). La inflamación aguda incluye 2 componentes principales: las fases vascular y celular.

La fase vascular está constituida por tres componentes esenciales:

- Alteraciones del calibre vascular.
- Cambios estructurales de los microvasos
- Emigración de los leucocitos.

En la fase vascular se presentan tres patrones de respuesta:

- El primer patrón es una respuesta inmediata transitoria, que se presenta con una lesión menor.
- El segundo patrón es una respuesta sostenida inmediata que tiene lugar en lesiones más graves y persiste varios días.
- El tercer patrón es una respuesta hemodinámica tardía en la que se presenta aumento de la permeabilidad de vénulas y capilares (Porth & Grossman, 2014).

La fase celular se caracteriza por marcar cambios en el recubrimiento de células endoteliales de la vasculatura y el desplazamiento de los leucocitos fagocíticos hacia el área de lesión o infección. El proceso de llegada y activación de los leucocitos puede dividirse en los siguientes pasos:

- Marginación y adhesión leucocitarias al endotelio.
- Migración leucocitaria a través del endotelio.
- Quimiotaxis leucocitaria.
- Activación leucocitaria y fagocitosis

Normalmente este tipo de inflamación se puede ver estimulada por diferentes factores en los cuales se incluyen a las infecciones bacterianas, víricas, fúngicas o parasitarias y toxinas microbianas; la

necrosis tisular de cualquier origen, incluida la isquemia, traumatismos y lesiones físicas y/o químicas; cuerpos extraños; reacciones inmunitarias (Kumar *et al.*, 2010).

2.3.2 Inflamación crónica

La inflamación crónica en contraste con la inflamación aguda, que suele ser autolimitada y de corta duración, la inflamación crónica se auto perpetúa y puede durar semanas, meses o incluso años. Puede desarrollarse como consecuencia de un proceso inflamatorio agudo recurrente o progresivo, o por respuestas súbitas y de bajo grado, incapaces de evocar una respuesta aguda (Porth & Grossman, 2014). La inflamación crónica tiene una duración prolongada (semanas o meses), puede aparecer tras una inflamación aguda, o puede desencadenarse de forma insidiosa, como una respuesta de bajo grado indolente sin manifestaciones de una reacción aguda, la cual puede dar parte a una lesión tisular como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la tuberculosis y la fibrosis pulmonar. Además, se ha relacionado con la progresión del cáncer y con cuadros que antes se consideraban puramente degenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.

Entre las principales causas de la inflamación crónica se encuentran los siguientes: Infecciones persistentes, como micobacterias, virus, hongos y parásitos; enfermedades inflamatorias de mecanismo inmunitario; exposición prolongada a agentes con capacidad tóxica, exógenos o endógenos. Entre las características que presenta la inflamación aguda se encuentran la manifestación de cambios vasculares, edema e infiltración principalmente neutrofilia, aparición de células mononucleares, que incluyen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, destrucción tisular inducida por el agente lesivo persistente o por las células inflamatorias, intentos de curación mediante sustitución por el tejido conjuntivo de tejidos lesionados, que se consiguen mediante la angiogénesis y fibrosis (Kumar *et al.*, 2010).

2.4 Familia Cactaceae

La familia Cactaceae está representada por 124 géneros y 1,427 especies, divididas en cuatro subfamilias, Maihuenioideae, Opuntioideae, Cactoideae y Pereskioideae. Se considera una familia de distribución cosmopolita nativa del continente americano, en el cual se distribuyen desde el norte de Canadá hasta el sur de Argentina. Habitan principalmente las regiones áridas y semiáridas del continente, aunque también se encuentran en climas fríos y húmedos, con excepción de la especie de *Rhipsalis*, que se encuentra en regiones tropicales de África y Asia (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), como podemos observar en la Figura 5.

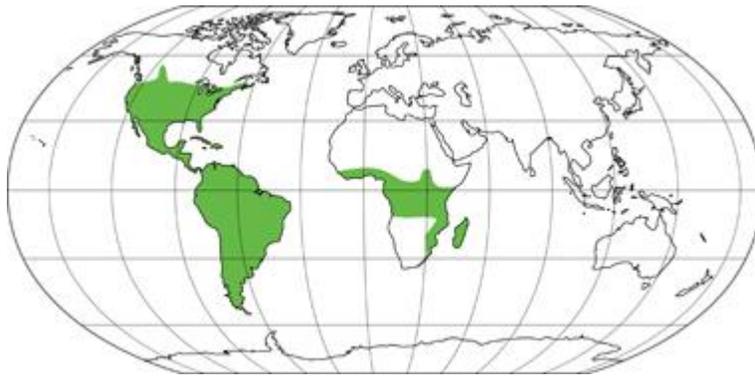


Figura 5: Representación de la distribución a nivel mundial de la familia Cactaceae (Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares).

2.5 Generalidades del género *Pereskia*

2.5.1 Información botánica

En el género *Pereskia* se incluyen 17 especies y dos subespecies las cuales se distribuyen predominantemente en regiones áridas y ligeramente másicas del Caribe, así como en América Central y del Sur. Se considera que, probablemente, la región noroeste de América del Sur fue el centro original de la diversificación y diseminación del género *Pereskia* (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (Estrada-Castillo *et al.*, 2019). En México ha sido encontrada en diversos puntos incluidos los estados de Yucatán, Chiapas, Veracruz y el Estado de Morelos, en este último teniéndose reportados ejemplares de la especie *Pereskia aculeata* Miller, en los municipios de Cuernavaca, Jojutla, Temixco, Xochitepec y Zacatepec (Meza-Nivón, 2007).

La especie *Pereskia aculeata* se presenta como una enredadera semileñosa, que puede alcanzar los 10 m de altura, con ramas largas y espinas en las axilares en hojas, las hojas presentan una forma elíptica y carnosa que se identifica mediante la presencia de tallos finos, subleñosos, con presencia de hoja ancha caída con pocas espinas en la base y solitarias flores terminales, en la Figura 6 podemos observar estas hojas características, así como algunos frutos inmaduros.



Figura 6: Hojas y frutos de *P. aculeata*.

Morfológicamente presenta, hojas simétricas de textura elíptica y correosa, de 7 cm de largo y 3 cm de ancho, ápice agudo-acuminado, de base aguda, margen entero y vetado hipódroma, donde sólo el nervio central es agudo, también presenta un peciolo corto y de dos a seis hojas agrupadas en las ramas laterales alternas además de espinas axilares (Duarte & Hayashi, 2005).

Hábitat: regiones méxicas y en algunas regiones levemente áridas.

Distribución: América Central y del Sur, incluyendo el norte de Argentina, la costa andina oriental del Perú y el oeste de Paraguay, Uruguay y el este de Brasil (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (N. de C. Campos Pinto, Cassini-Vieira, Souza-Fagundes, *et al.*, 2016), (Estrada-Castillo *et al.*, 2019).

Distribución en México: Chiapas, Morelos, Veracruz y Yucatán (Meza-Nivón, 2007), (Rivera-Hernández *et al.*, 2019).

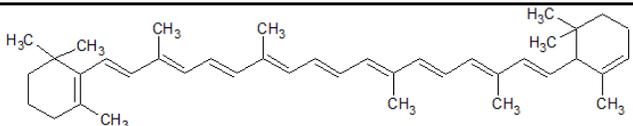
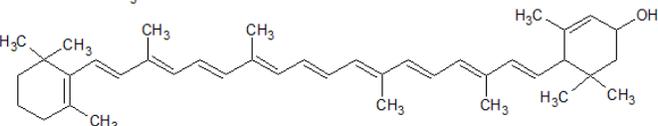
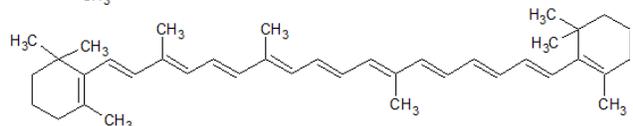
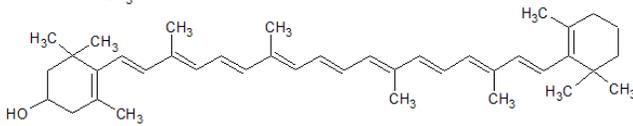
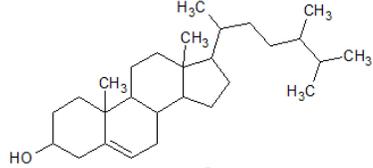
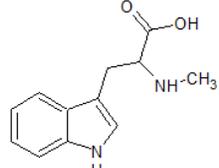
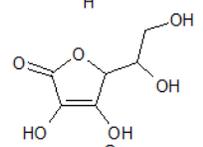
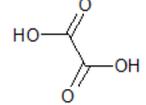
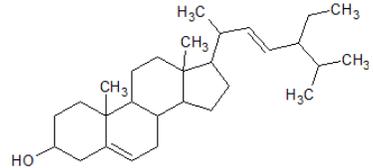
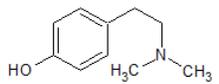


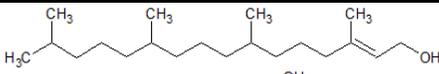
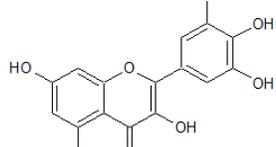
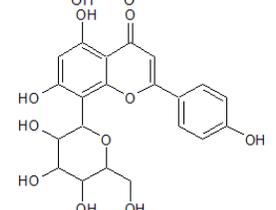
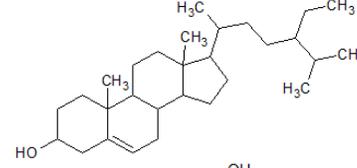
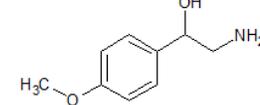
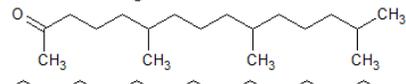
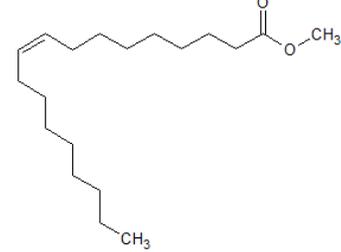
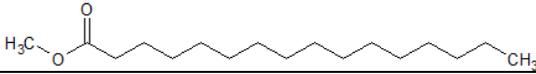
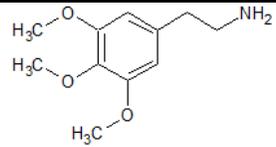
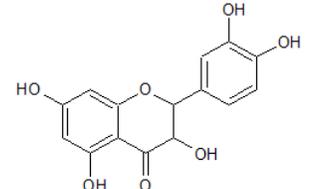
Figura 7: Distribución de *P. aculeta* en México/Estado de Morelos.

2.5.2 Información fitoquímica

Debido a su ubicación en la subfamilia Pereskioideae, el género *Pereskia* presenta metabolitos de tipo terpenoide, flavonoide, esteroide y fenilpropano. Sin embargo, hasta el momento en este género no se han encontrado reportes de estudios específicos de moléculas que han sido aisladas y probadas en la terapéutica de esta especie, pero si se han logrado encontrar metabolitos en estudios de composición química, en los cuales se destacan la presencia de carotenos (Agostini-Costa *et al.*, 2014), licopeno, vitamina C (Ferreira de Almeida *et al.*, 2014), estigmasterol, sitosterol, tiramina y mescalina (Carvalho Guilhon *et al.*, 2015), de los cuales se conocen sus actividades como antiinflamatoria, antineoplásica y antioxidante (Tabla 3). Además de estos estudios fitoquímicos se han realizado diversos estudios de la composición nutrimental de la especie entre los cuales se destacan datos del contenido de oligoelementos, contenido de aminoácidos y contenido proteico (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (da Silva Júnior *et al.*, 2019), entre los cuales se encuentran algunos aminoácidos esenciales, como el triptófano y la leucina, los cuales pueden influir en la reducción de peso (Vieira *et al.*, 2020), como se menciona en el trabajo de Vieira y colaboradores de 2020 titulado “a Beverage Containing Ora-Pro-Nobis Flour Improves Intestinal Health, Weight, and Body Composition: a Double-Blind Randomized Prospective Study”, donde se hace referencia a la utilización de las hojas de *P. aculeata* en forma de harina como alimento funcional, se reporta el uso de hojas de *P. aculeata* como tratamiento de la constipación intestinal (de Almeida & Corrêa, 2012) mediante el consumo de 400g de harina a base de hojas por un lapso de 6 meses (Das *et al.*, 2021), además del empleo de las mismas en la cocina a manera de vegetales (Rosa & Souza, 2003), (de Oliveira *et al.*, 2019), (da Silva Júnior *et al.*, 2019). No obstante en algunos estudios *in vitro* han informado que “ora-pro-nobis” cuenta con actividad antimicrobiana contra algunas bacterias Gram (+) y Gram (-), lo que sugiere la presencia de fitoquímicos con amplio espectro de actividad antibiótica (Vieira *et al.*, 2020).

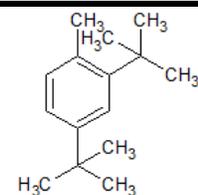
Tabla 3: Metabolitos aislados dentro del género *Pereskia*, (Sharif *et al.*, 2013), (Ferreira de Almeida *et al.*, 2014), (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (tomado de (Carvalho Guilhon *et al.*, 2015), (N. de C. Campos Pinto, do Nascimento Duque, *et al.*, 2015).

<i>Pereskia</i> especies	Metabolito	Molécula
<i>P. aculeata</i>	α -caroteno	
	α -criptoxantina	
	β -caroteno	
	β -criptoxantina	
	2, 4- ζ -metilcolesterol	
	Abrina	
	Ácido dehidroascórbico (Vitamina C)	
	Ácido oxálico	
	Estigmasterol	
Hordenina		

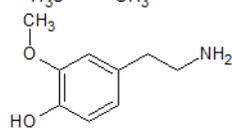
<i>P. bleo</i>	Fitol	
	Miricetina	
	Vitexina	
<i>P. grandifolia</i>	β -sitosterol	
	p-metoxi- β -hidroxi- β -feniletilamina	
	Fitona	
	Metil estearato	
	Metil oleato	
	Metil palmitato	
<i>Pereskia</i> especies	Metabolitos en común	Molécula
	Mescalina	
<i>P. bleo/P.aculeata</i>	Quercetina	

*P. bleo/
P. grandifolia*

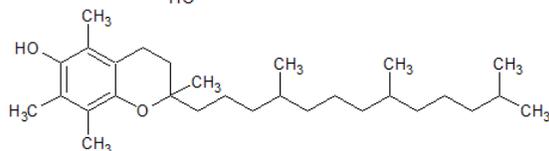
2,4-di-tert-butilfenol



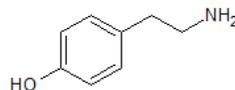
3-metoxitiramina



α -tocoferol
(Vitamina E)



Tiramina



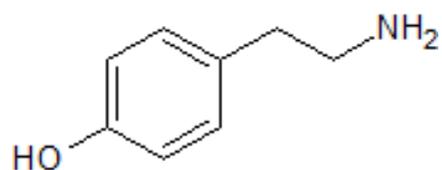
2.5.3 Estudios farmacológicos del género *Pereskia*

Los miembros del género *Pereskia* llaman la atención no solo por su denominación como “vegetal no convencional” o por ser considerado “Cactus primitivos con hojas”, sino también por los estudios químicos y biológicos preliminares en los cuales se hace referencia a algunos de sus usos etnomédicos que le son atribuidos a esta especie, que van desde propiedades antiinflamatorias, analgésicas, anti cáncer, antioxidantes y alucinógenas (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014), (N. de C. Campos Pinto *et al.*, 2020), como se ha mencionado este género cuenta con un amplio número de miembros entre los cuales destacan *P. bleo*, *P. grandifolia* y *P. aculeata*, las cuales presentan ciertas actividades en común como antimicrobianos, citotóxicos y antioxidantes, siendo estos dos últimos de suma importancia debido a la posibilidad de ser empleados como quimiopreventivos .

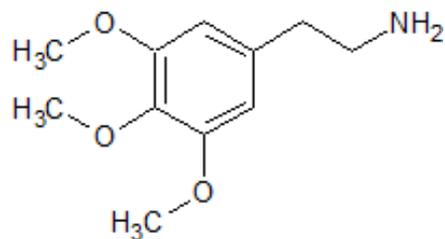
Algunos de los estudios específicos acerca del género *Pereskia* son los realizados a la especie *P. bleo* (Kunth) del cual se realizaron cuatro extractos (a base de hexano, diclorometano, acetato de etilo y, metanol) los cuales fueron probados en tres diferentes líneas celulares cancerígenas y se encontró con un potencial anti proliferativo (Sharif *et al.*, 2013).

2.5.4 Estudios fitoquímicos del género *Pereskia*

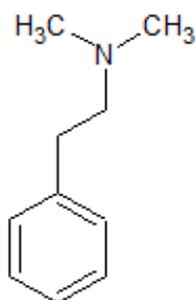
En los estudios realizados a especies pertenecientes al género *Pereskia* se han encontrado diversos tipos de moléculas, destacándose el primer estudio realizado a las especies *P. bleo* (Kunth) y *P. grandifolia* (Haw) (Sharif *et al.*, 2013), en las cuales se encontraron dos alcaloides siendo los siguientes: mescalina, 3,4-dimetil- β -feniletilamina además de 3-metoxitiramina y Tiramina (Figura 8).



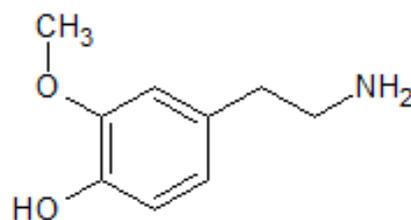
Tiramina



Mescalina



3,4-dimetil-β-feniletilamina



3 - metoxitiramina

Figura 8: Alcaloides y metabolitos aislados en *P. bleo* y *P. grandifolia*.

A parte de estos primeros alcaloides se han aislado una mezcla de esteroides, fenoles y precursores antioxidantes a partir del extracto de acetato de etilo de *P. bleo* (kunth), en los que se encontraban 2,4-di-ter-butilfenol, α -tocoferol, β -sitosterol, fitol (Figura 9) (Sharif *et al.*, 2013).

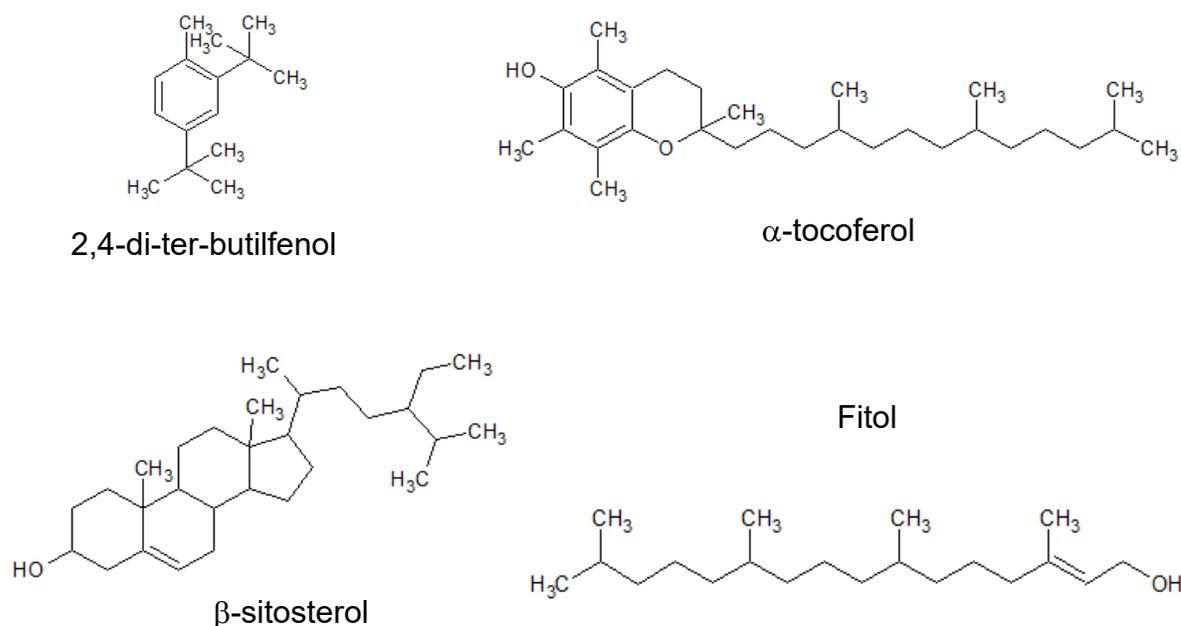


Figura 9: Esteroles y metabolitos ntioxidantes aislados de *P. bleo*.

Además de estos alcaloides se encontró vixetina de igual manera obtenidos a partir del extracto de acetato de etilo de *P. grandifolia* (Haw).

En cuanto a *P. aculeata* se ha estudiado la composición química del mucilago de frutos verdes de la especie en la cual se ha encontrado un 10.47% de proteínas y 46.88% de carbohidratos, además de presentar microelementos como Hierro (189.7 mg / 100g), manganeso (175.20 mg / 100 g), zinc (93.30 mg / 100 g) y calcio (3.35 mg / 100 g) (Silva *et al.*, 2019).

2.5.5 Estudios etnomédicos del género *Pereskia*

El género *Pereskia*, debido a su estatus como especie cosmopolita, es fácil de encontrar especímenes alrededor del mundo, y su uso en la medicina tradicional varía según la región, aunque existen coincidencias acerca de su uso el cual no se ha limitado y se ha extendido al tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades y/o padecimientos entre los cuales podemos enlistar: el tratamiento de cáncer; presión sanguínea alta; diabetes mellitus; dolores estomacales; úlceras; revitalizante del cuerpo, malestares causados por reumatismo e inflamación; tónico para mordeduras de serpiente (Sharif *et al.*, 2013).

2.6 Generalidades de la especie *Pereskia aculeata*

Pereskia aculeata es un cactus, que por lo general recuerda a las rosas salvajes más que a los actuales cactus, perteneciente a la familia Cactaceae y al género *Pereskia* (Tabla 4) las cuales presentan hojas grandes, brillantes, en seto, y largas espinas en el tallo, se considera una suculenta dentro del género *Pereskia*.

Tabla 4: Clasificación taxonómica de la especie *Pereskia aculeata*

Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Pereskioideae
Género	<i>Pereskia</i>
Especie	<i>Pereskia aculeata</i> Miller

2.6.1 Estudios fitoquímicos de *Pereskia aculeata*

La especie *Pereskia aculeata* cuenta con reportes de estudios en los cuales se determinó la caracterización química de algunos de los componentes de esta hortaliza no convencional (Ferreira de Almeida *et al.*, 2014), así como de la composición nutrimental de la misma (Rodrigues *et al.*, 2015). Cabe recalcar que esta especie se considera una especie introducida y no cultivada en México (Segura *et al.*, 2018) por lo que su uso etnomédico es poco conocido y en muchos casos sus usos son ornamentales, sin embargo, en regiones asiáticas (Malasia, China) y sudamericanas (en específico Brasil). Su uso es amplio debido a su alto contenido nutrimental por lo que es utilizada en diversas preparaciones de la cocina brasileña (Ferreira de Almeida *et al.*, 2014), (Hissatomi *et al.*, 2020), comúnmente conocida como “Ora-pro-nobis, azedinha, carne-de-pobre, cipó-santo, espinho-de-Santo-Antônioen” (da Silveira Agostini-Costa, 2020) se emplea en el tratamiento de deficiencias de hierro, osteoporosis, constipación, quemaduras (Agostini-Costa *et al.*, 2014), (Barbosa *et al.*, 2015), (Das *et al.*, 2021), Li y Xing enlistan algunas especies encontradas en la isla Hainan en China donde

se hace referencia a la ingesta de hojas de “qī xīng zhēn” (*P. aculeata*) como remedio contra el dolor estomacal (Li & Xing, 2016).

El valor nutrimental de las hojas es relativamente alto en contenido de proteínas se ha encontrado un valor aproximado del 25.5% p/p el cual destaca sobre otros vegetales que se usan comúnmente en la cocina como por ejemplo los frijoles los cuales presentan un contenido proteico entre el 18-20% p/p, los elotes 7.6–10.0% p/p, lechuga 1.3% p/p.

Las hojas de *P. aculeata* son conocidas por su alto contenido proteico (aproximadamente 28% del peso seco), como se ha mencionado con anterioridad es comúnmente consumida como vegetal de hoja en Brasil, alrededor del 60% de la proteína total está compuesta por aminoácidos esenciales (triptófano, leucina, lisina, fenilalanina y tirosina aromática), la proteína de las hojas de *P. aculeata* cumple con los requisitos de consumo mínimo propuesto por la FAO para niños de 2 a 5 años (da Silveira Agostini-Costa, 2020).

Además de que presentar un alto contenido proteico en hojas, las bayas de la *P. aculeata* presentan un alto contenido de β -caroteno y la luteína (β , ϵ -dihidroxicaroteno) los principales carotenoides descritos en los cactus, las bayas produjeron altos niveles de carotenoides, especialmente para β -caroteno (7.3–41.1 $\mu\text{g} / \text{g}$) y α -caroteno (4.3– 5.1 $\mu\text{g} / \text{g}$), proporcionando altos valores de pro vitamina A (79.7–458 RAE / 100 g) junto con un menor contenido de luteína (0.8–3.7 $\mu\text{g} / \text{g}$), α -criptoxantina y violaxantina (da Silveira Agostini-Costa, 2020).

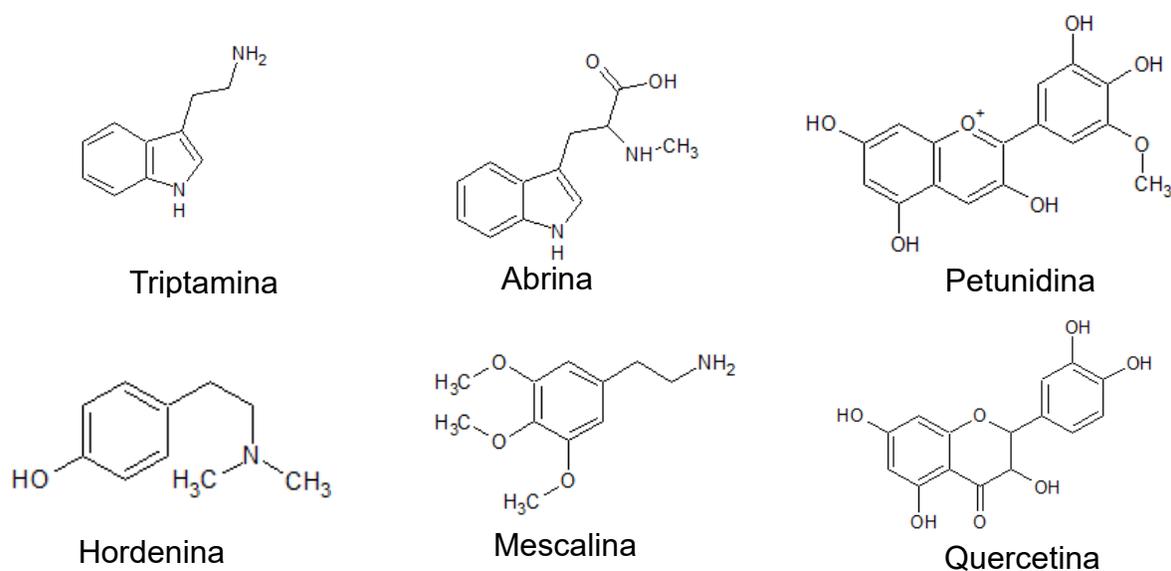


Figura 10: metabolitos aislados de *P. aculeata*.

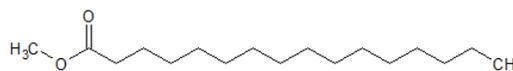
Algunos de los compuestos identificados en la fracción hidrometanólica obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *P. aculeata* mediante análisis de UPLC–MS/MS (N. de C. Campos Pinto, do Nascimento Duque, *et al.*, 2015) de ion positivo son los siguientes: triptamina, abrina, hordenina, isómeros del di-*tert*-butilfenol, mescalina, petunidina, quercetina (Figura 10).

Trazas de tiramina, mescalina y hordenina han sido detectadas en hojas de *P. aculeata* y se ha observado potencial antinociceptivo sin efecto opioide (da Silveira Agostini-Costa, 2020).

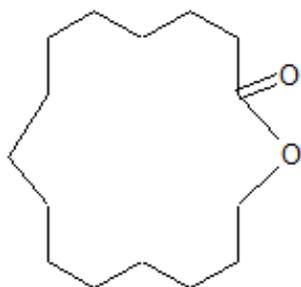
En otro estudio Souza y colaboradores en el año 2016, revelaron el contenido del aceite esencial de *P. aculeata*, encontrando 24 compuestos, entre los cuales los mayoritarios fueron los siguientes: (Z,Z)-metil-4,6-hexadecadieno, 1-dodecanol, (5E,9E)-Farnesil, ciclopentadecanolido, metil palmitato, ácido linoleico y fitol (Figura 11) (Souza *et al.*, 2016).



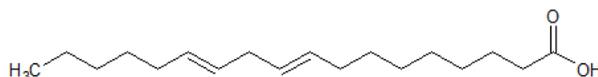
1-dodecanol



Metil palmitato



Ciclopentanodecanolido



Ácido linoleico

Figura 11: Metabolitos aislados de *P. aculeata*.

2.6.2 Estudios farmacológicos de *Pereskia aculeata*

Actualmente la especie *P. aculeata* se ha estudiado en materia de la búsqueda de agentes con propiedades cicatrizante, antinociceptivo, antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antitumoral e inmunomodulador (Freitas *et al.*, 2021).

El equipo de Souza reporta actividad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en los extractos a base de éter de petróleo, cloroformo y metanol (Souza *et al.*, 2016). Corroboran la actividad antimicrobiana de los mismos tres extractos antes mencionados sobre las siguientes cepas: *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. expansum*, *P. citrinum*, *A. niger*, *A. versicolor*. El extracto de éter de petróleo inhibió el crecimiento de todas las cepas probadas y exhibe una potente actividad antibacteriana contra *E. coli*. El extracto a base de cloroformo mostró actividad inhibitoria contra los patógenos Gram-positivos, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana tanto del extracto de cloroformo y éter de petróleo parecen ser dependientes de dosis. En otro estudio los extractos de hojas de *P. aculeata* fueron más activos contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas, aunque el extracto hidroetanólico también exhibió una concentración inhibitoria menor contra la *Klebsiella pneumoniae* en comparación con la ampicilina (da Silveira Agostini-Costa, 2020).

La actividad citotóxica de los extractos de *P. aculeata* se evaluó en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), sin resultar citotóxico, en cambio, las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo de un extracto de *P. aculeata* mostraron citotoxicidad contra las células MCF-7 y las células HL60 (Souza *et al.*, 2016).

En paralelo el equipo de Campos pinto reporta que tanto la fracción hexánica como el extracto crudo metánolico de hojas de *P. aculeata* aceleraron la cicatrización de heridas por escisión en ratones; sin embargo, solo la fracción hexánica indujo el aumento del flujo sanguíneo y la deposición de colágeno maduro en el sitio de la lesión, lo que reveló que esta fracción está dotada de un potencial más relevante para ser utilizada en el tratamiento de heridas cutáneas (N. de C. Campos Pinto, Cassini-Vieira, Souza-Fagundes, *et al.*, 2016), un año antes el mismo equipo reporta que las hojas de *P. aculeata* están dotadas de constituyentes químicos con potencial analgésico, cuyos efectos es probable que ocurran a nivel periférico y central, aunque probablemente no estén relacionados con la

activación de receptores opioides, siendo posible que la presencia de alcaloides y quercetina en la fracción hidrometanólica esté involucrada en la actividad antinociceptiva (N. de C. Campos Pinto, Do Nascimento Duque, *et al.*, 2015), en el mismo año el equipo de Campos Pinto realiza un segundo estudio de la fracción hexánica de hojas *P. aculeata* donde mostró actividad como antiinflamatorio tópico crónico y agudo frente a diferentes agentes irritantes sin signos clínicos de toxicidad, donde el posible mecanismo de acción corresponde a la inhibición de las citocinas IL-6 y TNF- α . Además, sugieren un efecto de tipo glucocorticoide, que es reforzado por la presencia de fitoesteroles como el taraxerol, taraxasterol y fitol, los cuales también pueden contribuir a la actividad antiinflamatoria (N. D. C. Campos Pinto, Cunha Machado, *et al.*, 2015).

En 2021 el equipo de Das realizó una compilación bajo el nombre de “Cactus: Chemical, nutraceutical composition and potential bio-pharmacological properties” donde se corroboran ciertas actividades biológicas de interés como la actividad antioxidante de hojas a base de extracto acuoso-etanólico al inhibir los radicales DPPH, ABTS e OH, además de hacer referencia a la utilización de harina a base de hojas de *P. aculeata* en el tratamiento auxiliar del tráfico intestinal (Das *et al.*, 2021).

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas se han convertido en uno de los principales problemas de salud pública en los últimos años, esto debido al constante incremento en el número de nuevos casos, y de defunciones provocadas por las mismas a nivel mundial, por lo que se ha vuelto prioritaria la búsqueda de moléculas para el tratamiento de estas ya sea de forma preventiva o paliativa. Es aquí donde los productos naturales juegan un papel importante, debido que muchas especies vegetales han desarrollado mecanismos de producción de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, anti proliferativa y/o antiinflamatoria, ejemplo de estos metabolitos son: minerales como el Selenio, Cobre, Zinc, Manganeso y Hierro, vitaminas A, C, y E, así como los betacarotenos y flavonoides, los cuales se ven relacionados al control de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, evitando o disminuyendo la aparición del estrés oxidativo y el rompimiento homeostático, favoreciendo de esta manera a la prevención de enfermedades relacionadas con un proceso inflamatorio crónico y el daño a macromoléculas (ADN, ARN, proteínas y lípidos), las que a su vez se ven estrechamente relacionadas a las ECD.

Por tal motivo, este estudio se ha dirigido a la búsqueda de moléculas quimiopreventivas de la especie vegetal *Pereskia aculeata*, la cual en estudios previos ha sido reportada con actividad antioxidante, citotóxica, antiinflamatoria, antimicrobiano y antifúngico, en países sudamericanos donde no solo destacan su uso quimiopreventivo, sino también su latente implementación en la industria farmacéutica como antiinflamatorio, además de su implementación en la industria alimenticia como estabilizador, gelificante y fuente de proteínas y nutrientes. En México hay pocos estudios de esta especie dado que es una especie exótica introducida que a se adapta fácilmente a los climas templados y es fácil ser encontrada en diversos puntos del país. Este trabajo de investigación pretende contribuir a la difusión y conocimiento de la especie, generar un posible interés socioeconómico, dado que se ha encontrado un efecto antioxidante y antiinflamatorio, además de ser una fuente alta en nutrientes.

4 HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios presentes en hojas de *Pereskia aculeata* presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica del extracto metanólico total de las hojas de la especie *Pereskia aculeata*.

5.1 Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico total de las hojas de *Pereskia aculeata*.
- Determinar la capacidad antioxidante y antirradicalaria por los métodos DPPH, ABTS y CARF del extracto metanólico total de las hojas de *P. aculeata*.
- Determinar la actividad citotóxica del extracto total metanólico de *P. aculeata* en líneas celulares tumorales humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC-3 (adenocarcinoma prostático), HeLa (carcinoma cervicouterino), A-549 (carcinoma de pulmón), mediante el ensayo de Sulforodamina B (SRB).
- Determinar la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA del extracto metanólico total de las hojas *P. aculeata*.

6 METODOLOGÍA

6.1 Recolección de materia vegetal y obtención de droga.

El material vegetal empleado (hojas y tallos) para este trabajo fue recolectado en la comunidad de Tilzapotla municipio de Puente de Ixtla en el estado de Morelos (18° 87'02" y 18° 38'23" N-99° 17'27" y 99° 19'26" O).

Se recolectaron muestras de la especie a estudiar seleccionando ejemplares representativos (algunos presentaban frutos inmaduros los cuales posteriormente se descartó su empleo en la obtención del extracto).

Una muestra fue depositada en el Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), identificada con el número de *Voucher* 32972.

6.2 Extracción en fresco

La extracción se realizó con la selección de las hojas a las cuales se les realizó la siguiente metodología:

Se separaron las hojas de los tallos, y seguidamente se pesaron y se obtuvo una cantidad de 1,2 Kg de material vegetal, el cual se procedió a la molienda empleando una licuadora de marca Oster™ de tres velocidades.

Posteriormente a la molienda se procedió a la maceración empleando metanol grado reactivo empleado 1 L/250 g de material vegetal por 72 h. Realizando este proceso por triplicado.

Después de obtener el macerado se filtró utilizando papel filtro mediante el empleo de un embudo Bühner, en matraz Kitazato y vacío.

6.3 Concentración de extracto

La concentración del macerado se realizó mediante el empleo de un rotaevaporador (Büchi™ Heating Bath B-490). Se hizo un pretratamiento del matraz bola de recuperación de solvente, haciendo lavados con porciones de 10mL de metanol.

Se ajustó el baño María del rotaevaporador a 40°C, y se colocaron porciones de 500mL en el matraz bola, hasta retirar el exceso de solvente, la cantidad recuperada se colocó en un frasco previamente lavado y pesado, el cual se puso a secar en campana de extracción, hasta obtención de peso constante.

6.4 Ensayo de determinación de la actividad antioxidante por el método de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

El ensayo de determinación de actividad antioxidante se realizó basándose en el método en microplaca modificada de Lesley, G. Wood, & L. Garg, 2006. El ensayo se realizó mediante el empleo de microplacas de 96 pozos de 200 µL de capacidad por pozo, en los cuales se añadieron 175 µL del radical DPPH (0.025 mg/mL) y 25 µL del extracto total metanólico, este método se realizó por triplicado empleando como controles un extracto estandarizado de *C. sinensis* y metanol, una vez obtenidas las muestras en las microplacas se prosiguió a una lectura previa de absorbancia en un lector de placas (Perkin – Elmer™ Lamda 40 UV/Vis) a una longitud de onda de 517 nm, repitiendo la lectura después de 30 minutos una vez culminada la reacción en ausencia de luz para evitar la descomposición del radical DPPH (Huang *et al.*, 2005).

El control *C. sinensis* y el extracto metanólico fueron evaluados a las siguientes concentraciones: 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312.5 µg/mL, 156.25 µg/mL, 78.12 µg/mL y 39.06 µg/mL.

6.5 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

El ensayo de actividad inhibidora del catión radical del ABTS^{•+} se realizó basándose en el método modificado de Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996, en microplacas de 96 pozos, utilizando 20 µL de muestra y 230 µL de ABTS^{•+}, los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando 20 µL de un extracto estandarizado de *C. sinensis* como control, de igual manera se realizó la reacción en un lapso de 30 minutos en ausencia de luz y seguidamente se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas (Perkin – Elmer™ Lamda 40 UV/Vis).

De igual manera se evaluó el extracto a las concentraciones de 5000 µg/mL-39.06 µg/mL.

6.6 Evaluación de capacidad reductora del hierro (CARF)

El ensayo de capacidad antioxidante reductora del hierro se realizó en microplacas de 96 pozos, preparando inicialmente una solución de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) con cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (20 mM), en una solución de 10 mL de buffer de acetato (300 mM) el cual previamente fue ajustado a pH 3.6 en proporción 1:1:10 respectivamente.

El ensayo se realizó utilizando 50 μL de muestra y 175 μL de la solución de CARF, de igual manera utilizando una muestra de extracto estandarizado de *C. sinensis* como control. Se dejó reaccionar por 6 minutos en ausencia de luz y se leyeron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 450nm en un lector de placas Perkin – Elmer Lamda 40 UV/Vis., realizando por triplicado la determinación.

6.7 Cálculo de porcentaje de inhibición

El cálculo de porcentaje de inhibición de actividad antioxidante se determinó con respecto al blanco que producen las muestras de prueba, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. Control} - \text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}} (100)$$

Donde:

Abs. Control = Absorbancia control

Abs. Muestra = Absorbancia de la muestra.

6.8 Concentración inhibitoria media (CI_{50})

La determinación de la concentración inhibitoria media (CI_{50}), se realizó mediante regresión lineal con los valores obtenidos del cálculo del porcentaje de inhibición (variable dependiente) con respecto del logaritmo de la concentración del extracto (variable independiente).

6.9 Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de citotoxicidad del extracto metanólico se realizó mediante el ensayo de Sulforodamina B (Skehan *et al.*, 1990).

6.9.1 Preparación de muestras

La solución stock se realizó pesando 4 mg del extracto metanólico y se diluyó en 1000 μL de DMSO, de donde se tomó una alícuota de 20 μL de stock y 180 μL de agua MQ esteril.

6.9.2 Preparación de las células

Se desarrolló un crecimiento celular del 60-70% de confluencia, 24 horas previas a realizarse el ensayo se procedió a un último cambio del medio.

La preparación de las células se hizo desechando el medio de cultivo y se lavó con PBS dos veces, una vez realizados los lavados se adicionaron 0.5mL de tripsina y se incubaron a una temperatura de 37°C por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 10mL de medio fresco y se homogenizó la suspensión celular, posteriormente se realizó el conteo en cámara de Neubauer. Se adicionaron 190 μL de la suspensión celular a cada pozo de la microplaca (microplaca de 96 pozos), enseguida se agregaron 10 μL de la muestra, controles y blanco, se colocó la placa de 96 pozos en incubadora a 37°C durante 72 horas.

6.9.3 Control día cero

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 190 μL de suspensión celular, las cuales se incubaron a 37°C por un lapso de 30 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se fijaron las células con Sulforodamina B (SRB).

6.9.4 Fijación y tinción celular

En la micro placa de 96 pozos se añadieron 100 μL por pozo de ácido tricloroacético al 30% frío, se procedió a incubar a 4°C por 30 minutos, se realizó lavado por goteo con agua corriente fría por triplicado, se dejó secar a temperatura ambiente. Con las placas secas se adicionaron 50 μL de SRB al 1% por pozo y se dejó reaccionar por 30 minutos, terminados los 30 minutos se desechó el colorante y se lavó con ácido acético al 1% frío (por triplicado) para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente.

6.9.5 Lectura colorimétrica

La lectura se realizó solubilizando el colorante enlazado con una solución de TRIS-Base, adicionando 200µL por pozo y se mezcló hasta homogenización del color en un agitador de placas. Al finalizar la homogenización se midió la densidad óptica (absorbancia, DO) a una longitud de onda de 490nm en un lector de micro placas, obtenidos los resultados de las densidades ópticas de realizo tratamiento de los datos para la determinación de los valores de CI₅₀ (Concentración Inhibitoria media).

6.10 Edema inducido por TPA 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol

6.10.1 Preparación de muestras

Para la realización del ensayo de edema inducido por TPA se pesaron 15 mg de las muestras a probar siendo estos el extracto total metánolico y las fracciones acuosas, la fracción acetato de etilo y la fracción hexánica, se utilizó indometacina (Sigma Aldrich) como control positivo las cuales fueron evaluadas a 0.1mg/oreja como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 5: Preparación de muestras para ensayo de edema inducido por TPA

Concentración 0.1 mg/oreja	Disolvente
Extracto metanólico	Metanol
Fracción acuosa	Metanol
Fracción acetato de etilo	Metanol
Fracción hexánica	Metanol
Indometacina	Acetona

Para la ejecución del ensayo se utilizaron ratones macho (n=4), a los cuales se administró el 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) 10 µL por oreja dejando por 10 minutos para inducir el edema. Transcurridos los 10 minutos se administraron 20µL de vehículo y 20µL del tratamiento, el cual se dejó en observación por un lapso de 4 horas.

Una vez transcurridas las 4 horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron fragmentos de orejas de 8 mm por horadación de las orejas y por diferencia de peso se obtuvo el

porcentaje de inhibición. Para determinar el porcentaje de inhibición de inflamación se utilizó la siguiente fórmula (Winvard y Willoughby, 2003).

$$\text{Proporción de inhibición (\%)} = \frac{(\text{Edema A} - \text{Edema B})}{\text{Edema A}} (100)$$

Donde:

Edema A es inducido por TPA

Edema B es inducido por TPA + muestra

6.11 Fraccionamiento

Se pesaron 5 g del extracto metánolico total y se mantuvo a peso constante, una vez a peso constante se disolvió con agua destilada, y se recuperó utilizando el doble de cantidad de hexano.

Para la separación se utilizó un embudo de separación utilizando los siguientes sistemas:

- Agua/ Acetato de etilo
- Agua/ Hexano

Una vez separadas las fases, la fase orgánica fue tratada con hexano para completar la disolución, obtenida la cual se lavó con 25 mL de agua repitiendo en 3 ocasiones.

Las fases hexánicas se decantaron y se concentraron en un rotavapor para su posterior secado y pesado, los 75 mL de agua utilizados en los lavados se reunieron y transfirieron a la fase acuosa extraída posteriormente con acetato de etilo.

6.12 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizó la cromatografía en capa fina como primer paso para la identificación de los metabolitos.

Se liofilizó la fase acuosa una vez pesada, se solubilizó en metanol frío (porciones de 25 mL en seis ocasiones) y se realizó una CCF comparando con el extracto total, en los siguientes sistemas de elución:

Tabla 6: Sistemas de elución utilizados en Cromatografía en capa fina.

Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Metanol [CH ₃ OH (CH ₄ O)]
100	0
95	5
70	30
20	80
30	70
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Hexano (C ₆ H ₁₄)
10	90

Para revelar las placas cromatográficas se utilizaron los siguientes reactivos:

Tabla 7: Reveladores usados en la CCF.

Revelador	Uso
Sulfato cérico	Indicador Redox, revelador de uso común.
Difenil borinato	Indicador de presencia de flavonoides.
Reactivo de Tollens	Indicador de presencia de azúcares.
Reactivo de Dragendorff	Indicador de presencia de alcaloides.
Cámara de Yodo	Indicador de presencia de componentes orgánicos.
Anisaldehído	Indicador de presencia de glucósidos, esteroides, fenoles y terpenos.
Cloruro férrico	Presencia de fenoles.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Recolección de la especie vegetal y obtención del extracto:

La recolección de las muestras de la especie vegetal se realizó en la comunidad de Tilzapotla en el estado de Morelos durante el mes de septiembre de 2016 (Figura 12), la cual se identificó en el Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), identificada con el número de *voucher* 32972.



Figura 12: Especímen recolectado (fotografía Izq). Selección de los especímenes a recolectar (fotografía Der.)

Mediante el método de maceración por 72 horas por triplicado se lograron obtener 26.57 g de extracto total metanólico a partir de 1,2 Kg de material vegetal, presentando así un rendimiento del 2.21% (Tabla 8).

Tabla 8: Extracto total metanólico obtenido de hojas de *P. aculeata*.

Parte recolectada / Fecha de recolecta	Peso (g)	Extracto orgánico	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hojas (septiembre 2016)	1200	MeOH (100%)	26.57	2.21



Figura 13: Hojas de *P. aculeata* (foto. arriba Izq.), Molienda en fresco de hojas (foto. arriba al centro), Macerado (foto arriba der.), Extracto total de hojas previo a concentración (foto abajo izq.), Concentración a presión reducida (foto. abajo der.).

7.2 Cuantificación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la capacidad antioxidante por el método de DPPH: 2,2-Difenil-2-picrilhidrazilo)

Se evaluó la actividad antioxidante del extracto total metanólico de hojas de *Pereskia aculeata* mediante el ensayo de DPPH y se comparó contra un extracto metanólico de *Camellia sinensis* (té verde), del cual cabe aclarar que es un extracto estandarizado a 96% de epigallocatequina comercializado bajo el nombre de TEAVIGO™ por DSM Nutritional Products, el cual es utilizado como control positivo debido a su reconocida actividad antioxidante.

En la tabla 9 y Figura 14 se reportan los resultados del ensayo de capacidad antioxidante obtenidos por el método de DPPH (2,2-Difenil-2-picrilhidrazilo), se registró la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del extracto total metanólico de hojas de *Pereskia aculeata* y de los controles usados (TROLOX y *C. sinensis*) respectivamente. Podemos observar que el extracto total metanólico presenta una CI_{50} de $446.79 \pm 9.53 \mu\text{g/mL}$, mientras que el control positivo el extracto metanólico de *Camellia sinensis* presenta una CI_{50} de $47.69 \mu\text{g/mL} \pm 1.79 \mu\text{g/mL}$, lo que nos indica que el extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* presenta una actividad antioxidante aproximadamente diez veces menor en comparación con el control positivo *C. sinensis* siendo 9.36 veces más potente este último. Esta diferencia la podemos observar representada gráficamente en la figura 15.

Tabla 9: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis* utilizando el método de evaluación del radical DPPH.

DPPH		
Extracto	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SEM \pm
<i>C. sinensis</i>	47.69	1.79
<i>P. aculeata</i>	446.79	9.53
TROLOX	56.20	6.73

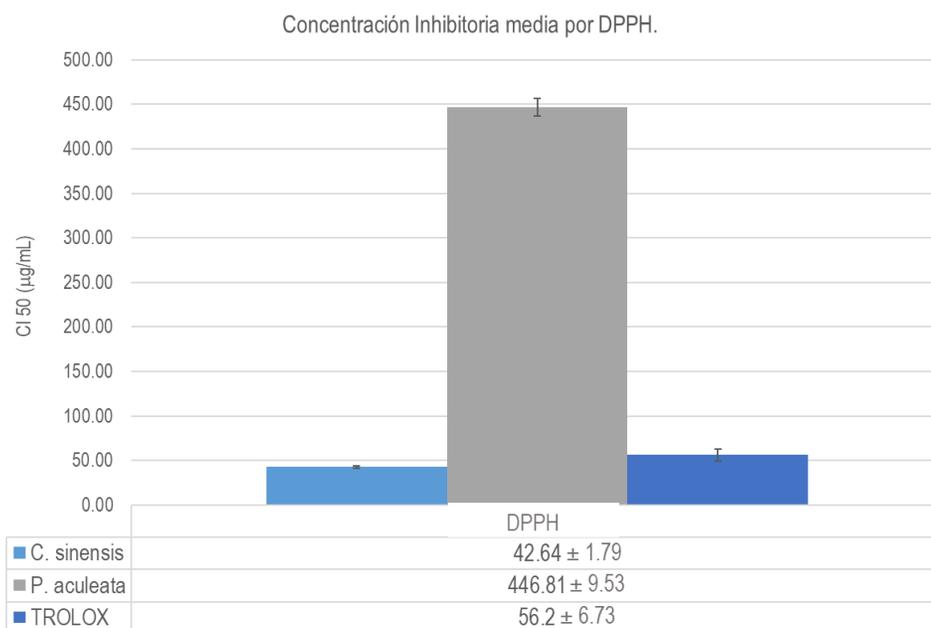


Figura 14: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis* por método de evaluación de DPPH (Escala logarítmica base 10).

Como antecedente cercano del potencial antioxidante del extracto metanólico de *P. aculeata*, en la literatura podemos encontrar el trabajo realizado por el grupo de trabajo de Lucèia Fàtima Souza en 2016 [“*Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities”] quienes reportan una CI_{50} de su extracto metanólico de 7.09 mg/mL (equivalente a 7090 $\mu\text{g/mL}$) (Souza, Caputo, Bergman, *et al.*, 2016). Si comparamos este resultado obtenido por Souza y colaboradores podemos observar que el extracto metanólico de *P. aculeata* obtenido en el laboratorio 12 de la Facultad de Farmacia de la UAEM. (CI_{50} 446.79 \pm 9.53 $\mu\text{g/mL}$) resulta ser 15.86 veces más potente. Esta diferencia en el potencial antioxidante se puede deber a diversos factores, siendo puntos críticos, el método de obtención del extracto y las condiciones ambientales (temperatura y suelo). En el primer caso, correspondiente al método de obtención del extracto enuncian lo siguiente:

“Un kilogramo de hojas se secaron al aire y se extrajeron, a temperatura ambiente, con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, cloroformo y metanol). Finalmente, cada extracto se evaporó a sequedad a presión reducida.”

En comparación con el método empleado muestra ligeros cambios, debido a que en nuestro caso al observar que tanto hojas y tallos sufrían de oxidación (debido al alto contenido acuoso del material) se decidió realizar una molienda en fresco con metanol grado reactivo, y su posterior extracción a presión reducida, lo cual puede derivar en una mejor conservación y menor merma de los metabolitos además de un potencial efecto antioxidante mayor.

El segundo factor en el cual se puede indagar resulta ser la temperatura ambiente promedio y la composición del suelo y en las regiones donde se recolectaron originalmente cada espécimen, por ejemplo, en la región de Minas Gerais (Brasil), el clima se califica como tropical de altitud con una temperatura media anual de 20°C, en cambio el clima general del Estado de Morelos (México) se califica como cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 21.5°C (INEGI, 2018). A pesar de que la diferencia de temperatura es de 1.5°C aproximadamente este cambio en la temperatura puede afectar tanto a la germinación de la especie y así como en una mayor o menor producción de metabolitos secundarios, aunado a esto las diferencias en el tipo de suelo y nutrientes presentes en los mismos son un factor importante en la producción de metabolitos secundarios por ejemplo Minas Gerais (Brasil) presenta un suelo de tipo de oxálico rico en Fe, óxidos e hidróxidos de Al, en cambio

el Estado de Morelos presenta predominantemente una combinación de suelos de tipo yermosol/xerosol, los cuales tiene como característica principales ser ricos en materia orgánica y en algunos carbonatos y sulfatos, lo cual si en el caso de hacer una comparativa del contenido en Fe posiblemente la especie originaria de Minas Gerais contendría un mayor contenido en este elemento debido a la riqueza del suelo en este sustrato, lo que permitiría a la especie nativa de esta región presentar un mayor contenido del mismo.

7.3 Capacidad antirradicalaria por método 2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Como prueba complementaria al ensayo de “Capacidad antioxidante por DPPH” se realizó la cuantificación de la “Capacidad antirradicalaria por método 2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS^{•+})”, la cual se considera complementaria a pesar que ambos ensayos presentan un fundamento similar, donde podemos observar “la naturaleza” de las muestras donde el ensayo por ABTS^{•+} cuenta con una afinidad para muestras con características hidrofílicas-lipofílicas, en este caso será más afín a las moléculas de tipo hidrófilas. El ensayo DPPH de igual manera está asociado a estos extractos acuoso-orgánicos, pero tiende a tener mayor afinidad por moléculas de tipo polifenólico, como antecedente cercano tenemos el trabajo antes citado de Souza y colaboradores donde enuncian que:

“...existe una correlación entre una mayor actividad de captación de DPPH y el contenido de compuestos fenólicos totales. Esto concuerda con los informes anteriores que muestran que los compuestos fenólicos generalmente se correlacionan con las actividades antioxidantes medidas por el ensayo DPPH. Nuestros resultados sugieren que *P. aculeata* puede considerarse una fuente de polifenoles....”(Souza *et al.*, 2016).

Ejemplo de estos polifenoles son el kaempferol, quercetina, catequina, epicatequina y miricetina, los cuales se pueden encontrar de forma común en otras cactáceas del género *Pereskia* quedando abiertamente la posibilidad de encontrar estas moléculas, así como otras con características similares en la composición química de la especie *P. aculeata*.

Teniendo en cuenta el anterior reporte se procedió a obtener mediante los porcentajes de inhibición de este ensayo, las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) tanto del extracto metanólico de hojas

de *Pereskia aculeata*, como del extracto metanólico de *C. sinensis* (extracto estandarizado), enlistados en la tabla 10, donde el extracto total metanólico presenta una CI_{50} de 129.54 ± 0.81 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el control positivo (extracto metanólico de *Camellia sinensis*) presenta una CI_{50} de 5.98 ± 0.81 $\mu\text{g/mL}$, lo que nos indica que el extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* (CI_{50} 129.54 ± 10.34 $\mu\text{g/mL}$) presenta una capacidad antirradicalaria baja, en comparación con *C. sinensis* (CI_{50} de 5.98 $\mu\text{g/mL}$), el cual demuestra ser 21.66 veces más potente que el extracto metanólico de *P. aculeata* (esta diferencia se puede observar en la figura 16, lo que nos puede dar un guiño al tipo de moléculas presentes en el extracto total metanólico, estos resultados nos proporcionan indicios de una mayor cantidad de moléculas de tipo lipofílicas, lo que podría explicar su remarcado efecto antiinflamatorio, siendo un mimetismo con las moléculas de tipo esteroidal de las cuales se conocen el taraxerol, taraxasterol, sitosterol y estigmasterol estas estructuras químicas son similares a los glucocorticoides (Dewick, 2009), de hecho, las actividades antiinflamatorias de estos fitoesteroles están bien descritas en la literatura reportados por el grupo de trabajo de Nicolas de Castro y colaboradores en 2015 (N. De. C. Campos Pinto, Cunha Machado, *et al.*, 2015), donde este mismo equipo reporta las propiedades que poseen tanto el taraxerol como el taraxasterol que incluyen la disminución en la producción de NO, PGE_2 , NF- κ B, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en forma *in vitro* además se cita el trabajo de Akihisa y colaboradores de 1996 donde se reporta la actividad antiinflamatoria de los fitoesteroles antes mencionados en el modelo de edema inducido por TPA en ratones.

Tabla 10: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis* utilizando el método de evaluación ABTS⁺.

ABTS⁺		
Extracto	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SEM \pm
<i>C. sinensis</i>	5.98	0.81
<i>P. aculeata</i>	129.54	10.34
TROLOX	0.058	0.005

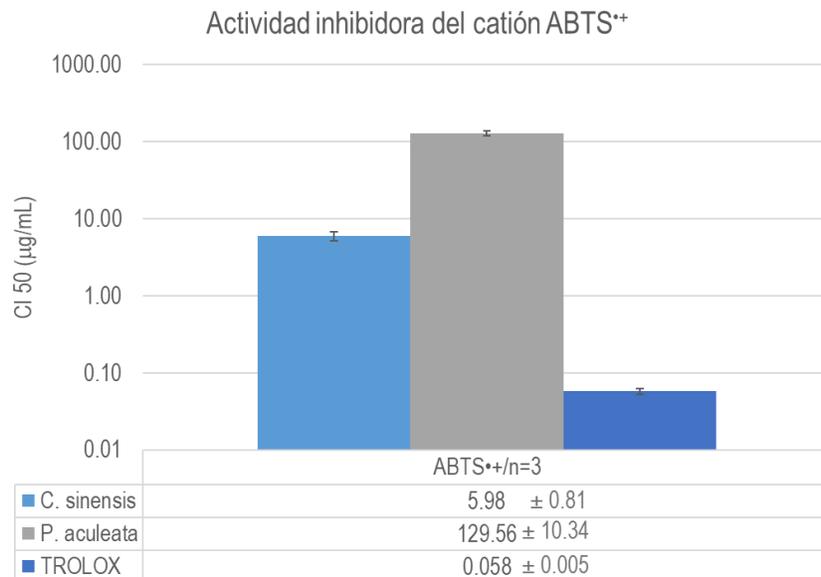


Figura 15: Comparación de las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis* por método de evaluación de ABTS^{•+} (Escala logarítmica base 10).

7.4 Capacidad Reductora de Hierro (CARF)

Para la evaluación de la capacidad reductora del extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* se utilizó el método de CARF mediante la reducción del ion Fe³⁺ a Fe²⁺, los resultados se pueden observar en la tabla 11 en donde se muestran las concentraciones probadas, la actividad reductora se puede observar en la figura 16 comparativamente contra *C. sinensis*.

Como en los experimentos anteriores se reporta utilizando como control positivo el extracto estandarizado de *C. sinensis* (1038.42 ± 1.02 equivalentes µM de FeSO₄) el cual es 1.69 veces más activo a la concentración máxima probada contra el extracto total metanólico de *P. aculeata* (611.61 ± 0.60 equivalentes µM de FeSO₄), es decir que presenta el doble de capacidad reductora a la máxima concentración probada (5000 µg/mL), también este ensayo nos permite saber que el extracto presenta efecto dependiente de concentración, lo cual nos indicaría que el extracto presenta una mejor actividad como reductor, esto posiblemente derivado del alto contenido en Fe en hojas del cual se hace hincapié en diversas publicaciones donde se enuncia que las hojas de estas cactáceas son importantes fuentes de proteínas, fibras, minerales (principalmente el calcio y el hierro) y compuestos bioactivos (Ferreira

de Almeida *et al.*, 2014), además de que el contenido de este mineral presente en la *P. aculeata* es cercano a 14.1 mg/100 g de hojas (N. de C. Campos Pinto & Scio, 2014).

Con los resultados obtenidos después del ensayo por medio del método CARF el cual no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino la capacidad reductora por transferencia de electrones reduciéndose de ion férrico al estado ferroso, por medio de los agentes oxidantes, nos indicaría que el extracto más que tener un efecto antirradicalario, presenta un efecto reductor.

Tabla 11: Actividad reductora de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis*.

Capacidad reductora por CARF					
Equivalentes μM de FeSO_4					
Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	<i>C. sinensis</i>	SEM \pm	<i>P. aculeata</i>	SEM \pm	
5000.00	1038.42	1.02	611.61		0.60
2500.00	993.12	1.00	685.85		0.65
1225.00	946.30	0.93	684.79		0.67
612.50	907.97	0.88	597.67		0.56
306.25	870.70	0.85	398.58		0.37
153.13	854.94	0.82	247.06		0.22
76.56	665.09	0.67	163.73		0.14
38.28	478.88	0.45	212.82		0.20

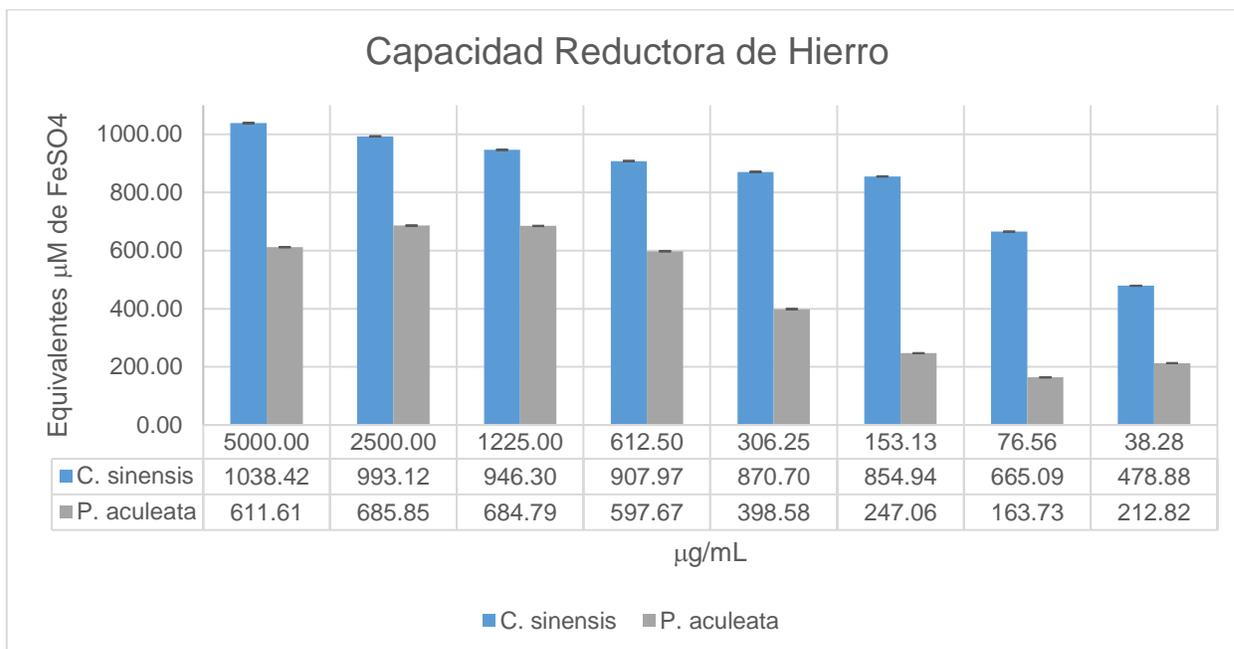


Figura 16: Comparación de los equivalentes de FeSO₄ de los extractos metanólicos de *P. aculeata* y *C. sinensis* utilizando el método de evaluación por reducción de CARF.

7.5 Ensayo de Citotoxicidad (Cribado)

Dentro de las moléculas encontradas y reportadas para la especie *P. aculeata* con actividad antineoplásicas se encuentran la β-criptoxantina, catequina, fitol, miricetina, petunidina, y quercetina. Teniendo este antecedente directo y el conocimiento del uso étnico-medicinal en el tratamiento de cáncer se realizó un tamizaje a una sola concentración (50 μg/mL) para corroborar el potencial citotóxico del extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata*. Para este fin se utilizaron líneas celulares representativas de los tipos de carcinomas más comunes en la población mexicana entre los que se encuentran los carcinomas cervicouterino, adenocarcinomas de mama, pulmón y prostático en la Tabla 12, se presentan los porcentajes de sobrevivencia obtenidos a partir de un cribado donde el extracto total metanólico fue probado en cuatro líneas tumorales humanas y dos líneas celulares no tumorales como se ha mencionado anteriormente siendo estas: HeLa (carcinoma cervicouterino), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A-549 (carcinoma de pulmón), PC-3 (adenocarcinoma prostático), MCF-10A (epitelio glandular mamario), HEK-293 (células embrionarias de riñón). Como se puede observar en la Tabla 12 el extracto se destaca la citotoxicidad en las líneas celulares tumorales

A-549 y PC-3 teniendo un porcentaje de supervivencia del 12,24% y 16,78% respectivamente, de igual manera podemos observar que el extracto no presenta selectividad sobre líneas celulares no tumorales como es el caso de MCF-10A donde el extracto de *P. aculeata* presenta un porcentaje de supervivencia del 30,43%, en cuanto a MCF-7 se obtuvo un porcentaje de 76.67%, lo cual se asemeja a lo reportado dentro de la literatura en el trabajo titulado “Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller” donde se reporta un porcentaje de inhibición entre el 25 y 30% sobre la línea MCF-7 del extracto metanólico bajo las condiciones de 6.25 – 100 µg/mL de concentración del extracto, realizado por duplicado, durante 72 horas a 37 °C en 5% de CO₂ (Nicolas de Castro *et al.*, 2013). Con los resultados obtenidos y después de haber realizado el análisis de datos mediante tamizaje se utilizó el criterio de 50% de muertes a 50 µg/mL y se estudiaron en segunda estancia las líneas PC-3 y MCF-7, las cuales fueron probadas bajo concentración máxima de 20 µg/mL, en el cual no fue posible determinar la IC₅₀ debido a que el extracto no presentó actividad sobre las líneas celulares probadas.

Tabla 12: Comparación de Porcentaje de supervivencia Extracto Metanólico *P. aculeata*.

Compuesto/extracto	Concentración [µg/mL]	Línea Celular						
		HEK 293	HeLa	MCF-7	MCF-10A	A-549	PC-3	% Supervivencia
<i>P. aculeata</i>	50	89.9	100	76.67	30.43	12.24	16.78	
EVP (Etoposido)	10	0	0	48.22	100	35.17	98.34	
POD (Podofilotóxina)	10	3.69	0	26.6	100	0	96.67	

7.6 Fraccionamiento Primario

Después de emplear el método de partición y liofilización se obtuvieron las siguientes fracciones y los subsecuentes pesos descritos en la Tabla 13.

Tabla 13: Fracciones y pesos obtenidos.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
Acuosa (Liofilizado)	0.6143	12.29
Acetato de Etilo	0.2097	4.19
Fracción Hexánica	1.2246	24.49

El peso registrado de la fracción acuosa (liofilizado) se obtuvo de un volumen total de 140mL.



Figura 17: Botellas de fracción acuosa liofilizado (Der.), cromatograma revelado en cámara de yodo, fase móvil 7:3 (Dicloro metano: Metanol), orden de muestras: Extracto metanólico-Fase acuosa-Fase metanólica-Acetato de etilo-Fracción hexánica.

7.7 Edema inducido por TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol)

La evaluación del efecto anti edema se realizó mediante el ensayo con 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA), debido a que el TPA es un potente agente flogógeno, la administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria, teniendo como referencia el trabajo realizado por de Castro Campos Pinto, donde utilizó las fracciones hexánicas en un ensayo *in vivo* de inflamación aguda y dermatitis crónica con resultados positivos, se decidió a poner a prueba

los extractos obtenidos por fraccionamiento primario, además de someter a el extracto total metánolico de igual manera al ensayo.

De esta manera se obtuvieron los porcentajes de inhibición los cuales se encuentran a manera de resumen en la tabla 14 y en forma de comparación en la figura 18, empleando como control positivo la indometacina un reconocido medicamento antiinflamatorio no esteroideo.

Tabla 14: Resultados obtenidos en porcentaje de inhibición de las muestras (extracto y fracciones) probadas en modelo de edema inducido por TPA a 0.1 mg/oreja.

Extracto/Fracción	Inhibición del edema auricular (%)	
	0.1 mg/oreja	
Extracto total MeOH	87.36 ± 2.29	
Fracción AcOEt	88.52 ± 5.24	
Fracción Hexano	NA	
Fracción acuosa	NA	
INDO	90.20 ± 3.42	

NA, no activo a las concentraciones probadas, INDO (Indometacina/Control positivo).

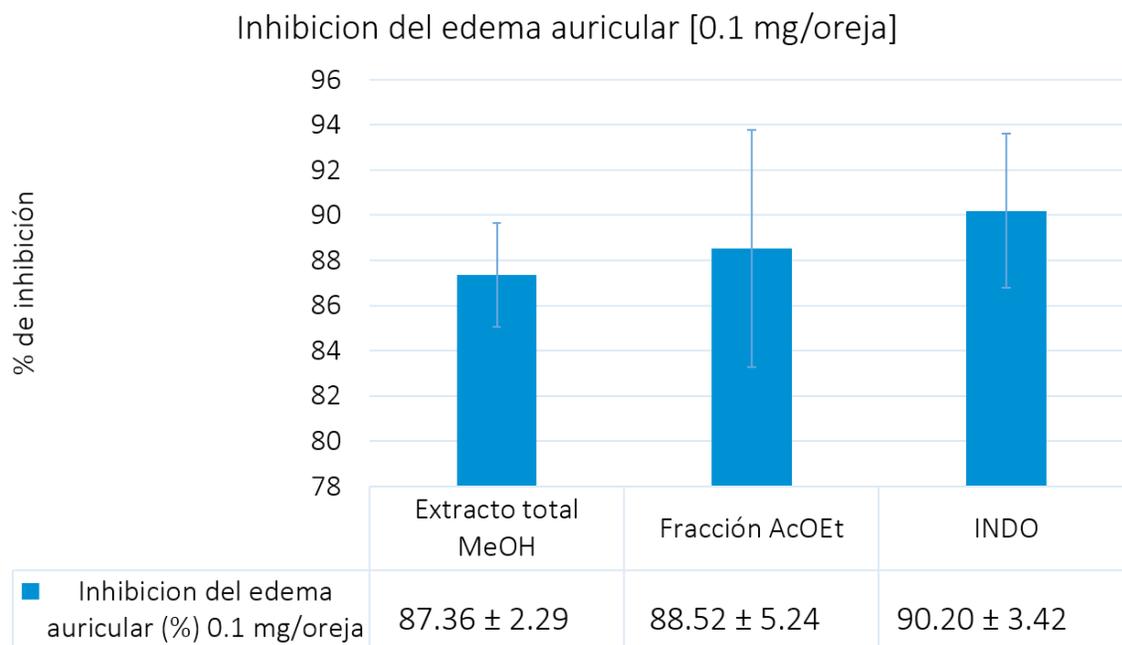


Figura 18: Comparación de los porcentajes de inhibición obtenidos por medio de la prueba de Edema inducido en oreja de ratón por TPA.

Como podemos observar en la tabla 14 y figura 18 tanto el extracto total metánolico como las fracciones primarias fueron evaluadas a una concentración de 0.1 mg/oreja, donde destacan por su efecto inhibitorio el extracto total MeOH ($87.36\% \pm 2.29$) y la Fracción AcOEt ($88.52\% \pm 5.24$) presentan un efecto inhibitorio similar a Indometacina ($90.20\% \pm 3.42$). En cambio, las fracciones hexano y la acuosa no presentan efecto inhibitorio. Para observar esta semejanza entre los extractos y el control se realizó la prueba de normalidad mediante el criterio de Shapiro-Wilk donde se observa una distribución normal ($P \geq 0.05$). Una vez determinada la normalidad de los datos se realizó el análisis mediante Prueba T-student para muestras independientes y prueba de Levene de igualdad de varianzas dando como resultado un $P_{\text{valor}} = 0.802$ para FAcOEt con una significancia del 40.2% y un $P_{\text{valor}} = 0.528$ para EMeOH con significancia del 34.2%, con respecto del control Indometacina.

Con los resultados obtenidos podemos indagar que en cuanto a efecto inhibitorio tanto la FAcOEt como el EMeOH presentan similitud con el control Indometacina siendo la diferencia no mayor del 5%, más en cambio una vez realizada la prueba T-student para muestras independientes se observa que existe una marcada diferencia que supera el 40% significancia con respecto al control negativo, donde podemos observar que la FAcOEt podría contener moléculas con un potencial antiinflamatorio mayor con respecto a su contraparte el EMeOH o que se encuentran en mayor concentración.

Con estos resultados obtenidos se puede insinuar que el posible metabolito o metabolitos responsables del efecto anti edema se encuentra mayoritariamente en la fracción AcOEt debido a que esta fracción presenta un mayor porcentaje inhibitorio y a su vez es obtenida mediante una extracción primaria del extracto total.

Como se mencionó anteriormente los efectos antiinflamatorios y analgésicos reportados en la medicina tradicional de *P. aculeata* son debido a la presencia de los fitoesteroles y triterpenos pentacíclicos presentes entre los cuales destacan taraxerol, taraxasterol, estigmasterol y sitosterol, los cuales han sido reportados dentro de la literatura como responsables de la actividad antiinflamatoria y como auxiliares en la cicatrización (Pinto *et al.*, 2016). Además de estas moléculas es posible encontrar dentro de la especie y miembros del género *Pereskia* moléculas con actividad antiinflamatoria como lo son catequina, epicatequina, fitol, miricetina, vitexina y quercetina, por mencionar algunas.

Dentro de las encontradas y reportadas como antiinflamatorios sobresalen el taraxerol y taraxasterol, las cuales pueden ser encontradas en múltiples variedades de especies vegetales. Aunado a esto se

sabe que en 2012 y 2013 el equipo de trabajo de Zhang y Yao demostraron la propiedad de disminuir la producción de NO, PGE₂, NF-κB, TNF-α, IL-6 e IL-1β *in vitro* de estos triterpenos pentacíclicos (taraxerol y taraxasterol). Además, años atrás Akihisa y colaboradores (1996) informaron de la actividad antiinflamatoria de estas moléculas en el modelo de edema de oreja inducido por TPA en ratones. En el trabajo de Pinto y colaboradores (2015) titulado "*Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis" menciona que "el mecanismo de acción está relacionado, al menos en parte, con la inhibición de las citoquinas IL-6 y TNF-α... donde los resultados farmacológicos sugirieron fuertemente un efecto similar al glucocorticoide, que se vio reforzado por la presencia de cantidades significativas de fitoesteroles. Taraxerol, taraxasterol y fitol que también pueden contribuir a la actividad" (Pinto *et al.*, 2015).

8 CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos podemos concluir que el extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata*

- En cuanto a actividad antioxidante probada mediante los métodos de DPPH se obtuvo una $CI_{50} = 446.79 \pm 9.53 \mu\text{g/mL}$, en el ensayo con ABTS⁺ presentó una CI_{50} de $129.54 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$, lo cual sugirió una escasa o nula actividad antioxidante, en contraste presenta una capacidad antirradicalaria notoria debido posiblemente al alto contenido en polifenoles. En cuanto a CARF se determinó una capacidad reductora de 611.61 ± 0.60 equivalentes μM de FeSO_4 , a la máxima concentración probada presentándose como un buen reductor dependiente de concentración.
- Como antiinflamatorio una vez sometido a prueba de edema inducido por TPA en ojera de ratón la fracción AcOEt presenta un mayor efecto inhibitorio ($88.52\% \pm 5.24$), seguido del extracto total MeOH ($87.36\% \pm 2.29$), con un efecto similar a Indometacina ($90.20\% \pm 3.42$), el cual no presenta diferencias significativas una vez analizado mediante estadística, indicando una posible localización de metabolitos activos de mediana polaridad dentro de la fracción AcOEt y MeOH.
- Como antiproliferativo el extracto no cumple con el criterio de una $CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$, con lo cual no presenta esta actividad biológica sobre las líneas celulares probadas.

9 PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* Mill.
- Aislar y caracterizar los metabolitos activos con capacidad antiinflamatoria presentes en el extracto total metanólico de hojas de *P. aculeata* Mill.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio en un modelo de inflamación crónica.
- Formular una forma farmacéutica como antiinflamatorio tópico.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Agostini-Costa, T. S., Pêsoa, G. K. A., Silva, D. B., Gomes, I. S., & Silva, J. P. (2014). Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactaceae - *Pereskia* sp. *Journal of Functional Foods*, 11(C), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.015>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*, 494, 161–172. <https://doi.org/10.4067>
- Barbosa, C. K. R., Finger, F. L., & Casali, V. W. D. (2015). Manejo e conservação pós-colheita de ora-pro-nobis. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 37(3), 307–311. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i3.19510>
- Campos Pinto, N. D. C., Cunha Machado, D., Mello Da Silva, J., Mota Conegundes, J. L., Moura Gualberto, A. C., Gameiro, J., Moreira Chedier, L., Marques Nogueira Castañon, M. C., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.032>
- Campos Pinto, N. D. C., Cunha Machado, D., Mello Da Silva, J., Mota Conegundes, J. L., Moura Gualberto, A. C., Gameiro, J., Moreira Chedier, L., Castañon, M. C. M. N., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.032>
- Campos Pinto, N. D. C., Do Nascimento Duque, A. P., Ramos Pacheco, N., De Freitas Mendes, R., Da Silva Motta, E. V., Quaglio Bellozi, P. M., Ribeiro, A., Salvador, M. J., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1780–1785. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1008144>
- Campos Pinto, N. D. C., do Nascimento Duque, A. P., Ramos Pacheco, N., De Fretas Mendes, R., Da Silva Motta, E. V., Quaglio Bellozi, P. M., Ribeiro, A., Salvador, M. J., & Scio, E. (2015). *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1780–1785. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1008144>

-
- Campos Pinto, N. de C., Cassini-Vieira, P., de Souza-Fagundes, E. M., Silva Barcelos, L., Marques Noqueira Castañón, M. C., & Scio, E. (2016). *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. *Journal of Ethnopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.005>
- Campos Pinto, N. de C., Cassini-Vieira, P., Souza-Fagundes, E. M. de, Barcelos, L. S., Castañón, M. C. M. N., & Scio, E. (2016). *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.005>
- Campos Pinto, N. de C., dos Santos, R. C., Cuhna Machado, D., Rodrigues Florêncio, J., de Souza Fagudes, E. M., Antinarelli, L., Soares Coimbra, E., Ribeiro, A., & Scio, E. (2012). *Cytotoxic and antioxidant activity of Pereskia Aculeata Miller*. 3, 63–69. <http://pharmacologyonline.silae.it>
- Campos Pinto, N. de C., Ferreira Maciel, M. de S., dos Santos Rezende, N., do Nascimento Duque, A. P., de Freitas Mendes, R., Barbosa da Silva, J., de Rezende Evangelista, M., Cahon Monteiro, L., Mello da Silva, J., de Carvalho da Costa, J., & Scio, E. (2020). Preclinical studies indicate that INFLATIV, an herbal medicine cream containing *Pereskia aculeata*, presents potential to be marketed as a topical anti-inflammatory agent and as adjuvant in psoriasis therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(12), 1933–1945.
<https://doi.org/10.1111/jphp.13357>
- Campos Pinto, N. de C., & Scio, E. (2014). The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)-A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), 189–195.
<https://doi.org/10.1007/s11130-014-0423-z>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Carvalho Guilhon, C., Abdul Wahab, I. R., Boylan, F., & Dias Fernandes, P. (2015). Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo* Kunth leaves crude extract, fractions, and isolated compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/915927>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015).

Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>

da Silva Júnior, P. R., Araújo Lima, T., Quintino Silva, M. O., de Lima Franca, I., Almeida Pereira, S. C., & Beserra de Oliveira, T. K. (2019). *Plantas alimentícias não convencionais como alimento funcional: Uma revisão bibliográfica*. 2(2), 51–55.

da Silveira Agostini-Costa, T. (2020). Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. *Food Chemistry*, 327(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126961>

Das, G., Lim, K. J., Tantengco, O. A. G., Carag, H. M., Gonçalves, S., Romano, A., Das, S. K., Coy-Barrera, E., Shin, H. S., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Heredia, J. B., & Patra, J. K. (2021). Cactus: Chemical, nutraceutical composition and potential bio-pharmacological properties. *Phytotherapy Research*, 35(3), 1248–1283. <https://doi.org/10.1002/ptr.6889>

de Almeida, M. E. F., & Corrêa, A. D. (2012). Utilização de cactáceas do gênero pereskia na alimentação humana em um município de minas gerais. *Ciencia Rural*, 42(4), 751–756. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000400029>

de Oliveira, H. A. B., Anunciação, P. C., da Silva, B. P., de Souza, Â. M. N., Pinheiro, S. S., Lucia, C. M. Della, Cardoso, L. de M., Castro, L. C. V., & Pinheiro-Sant'ana, H. M. (2019). Nutritional value of non-conventional vegetables prepared by family farmers in rural communities. *Ciencia Rural*, 49(8). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180918>

Duarte, M. R., & Hayashi, S. S. (2005). Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(2), 103–109. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200006>

Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna*, 18(6), 326–335. <https://doi.org/10.4321/S0212-71992001000600010>

Estrada-Castillo, S., Negritto, M. A., Fernández-Alonso, J. L., & Carbonó-Delahoz, E. (2019). The species of pereskia (Pereskioideae, cactaceae) from Colombia. *Caldasia*, 41(2), 289–300.

- Ferreira de Almeida, M. E., Bernardes Junqueira, A. M., Bernardes Simão, A. A., & Duarte Corrêa, A. (2014). Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. *Bioscience Journal*, 30(3 SUPPL. 1), 431–439.
- Freitas, P. H. S. de, Almeida, N. de P., Monteiro, L. C., Evangelista, M. de R., Conegundes, J. L. M., Maciel, M. de S. F., Pinto, N. de C. C., & Scio, E. (2021). Extratos glicólicos de “ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Miller): Avaliação do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante / Glycolic extracts of “ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Miller): Evaluation of its phenolic content and antioxidant p. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 1748–1760.
<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-144>
- García Bacallao, L., García Gómez, L. V., Rojo Domínguez, D. M., & Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 20(3), 231–235.
- Gómez-Pompa, A. (1993). Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biologica Panamensis*, 1, 87–100.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2016). *Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica* (13a Edició). Elsevier Ltd. <http://books.google.com/books?id=UMYoE90LPmcC&pgis=1>
- Hernández Ángel, M., & Prieto González, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 18(1), 12–14.
- Hissatomi, C. M., Gorgen, D. K., Roginski, G. de S., Hoffmann, L. F., Silva, T. M. da, Carnitatto, I., & Garcia, J. R. N. (2020). Utilização da planta alimentícia não convencional ora pro nobis em educação Nutricional / Use of non conventional food plant ora pro nobis in nutritional education. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 3(4), 3846–3855.
<https://doi.org/10.34188/bjaerv3n4-084>
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. c. (2010). Robbins y Contran Patología estructural y funcional. In G. C. Editorial (Ed.), *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical* (8va ed.). Elsevier Saunders. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
- Lesley, M.-W., G. Wood, L., & L. Garg, M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Li, D. lin, & Xing, F. wu. (2016). Ethnobotanical study on medicinal plants used by local Hoklos people on Hainan Island, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.050>
- Mañon Rossi, W., Garrido, G., & Núñez Sellés, A. J. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 4(2), 62–83.
- Meza-Nivón, M. V. (2007). Conocimiento tradicional de las cactáceas mexicanas. *INE/ADA*.
- Mora Agüero, S. D. los Á., Zeledón Aguilera, A. S., & Vargas Rubio, T. (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Medica Sinergia*, 4(5), 89–100. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i5.211>
- Oxilia, R. M. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23–29. <http://www.ins.gov.py/revistas/index.php/revistaimt/article/view/181>
- Porth, C. M., & Grossman, S. C. (2014). *Porth Fisiopatología Alteraciones de la salud. Conceptos básicos*. (9a Edición). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996, November). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rivera-Hernández, J. E., Flores-Hernández, N., Vargas-Rueda, A. F., Alcántara-Salinas, G., de

-
- Jesús Cházaro-Basáñez, M., & García-Albarado, J. C. (2019). Flora and vegetation from the semiarid region of Acultzingo-Maltrata, Veracruz, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 126. <https://doi.org/10.21829/ABM126.2019.1433>
- Rodríguez, S., Marinelli, P. S., Otoboni, A., Tanaka, A. Y., & Oliveira, A. S. (n.d.). *Caracterização química e nutricional da farinha de moringa (Moringa oleifera LAM.)*. 1–14.
- Rosa, S. M. da, & Souza, L. A. (2003). Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 25(2), 415–428. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v25i2.2046>
- Rosado-Pérez, J., & Mendoza-Núñez, V. M. (2007). Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32(2), 58–69. <https://doi.org/223505-2>
- Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20(3), 161–168. <http://www.medicenlinea.com.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>
- Segura, S., Fresnedo, J., Mathuriau, C., López, J., Andrés, J., & Muratalla, A. (2018). The edible fruit species in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(6), 1767–1793. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0652-3>
- Sharif, K. M., Rahman, M. M., Zaidul, I. S. M., Jannatul, A., Akanda, J. H., Mohamed, A., & Shamsudin, S. H. (2013). Pharmacological relevance of primitive leafy Cactuses *Pereskia*. *Research Journal of Biotechnology*, 8(October 2016). <http://irep.iium.edu.my/33158/1/22.pdf>
- Silva, S. H., Neves, I. C. O., Oliveira, N. L., de Oliveira, A. C. F., Lago, A. M. T., de Oliveira Giarola, T. M., & de Resende, J. V. (2019). Extraction processes and characterization of the mucilage obtained from green fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Industrial Crops and Products*, 140(April), 111716. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111716>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112.

-
- Soto-bernardini, M. C., & Raventós-vorst, H. (2008). Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia (The role of oxidative stress in schizophrenia). *Acta Médica Costarricense*, 50(4), 197–202.
- Sousa, R. M. F., Lira, C. S., Rodrigues, A. O., Morais, S. A. L., Queiroz, C. R. A. A., Chang, R., Aquino, F. J. T., Muñoz, R. A. A., & de Oliveira, A. (2014). Antioxidant activity of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) leaves extracts using spectrophotometric and voltammetric assays in vitro. *Bioscience Journal*, 30(3 SUPPL. 1), 448–457.
- Souza, L. F., Caputo, L., De Barros, I. B. I., Fratianni, F., Nazzaro, F., & De Feo, V. (2016). *Pereskia aculeata* muller (Cactaceae) leaves: Chemical composition and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091478>
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Vieira, C. R., Grancieri, M., Martino, H. S. D., César, D. E., & Barra, R. R. S. (2020). a Beverage Containing Ora-Pro-Nobis Flour Improves Intestinal Health, Weight, and Body Composition: a Double-Blind Randomized Prospective Study. *Nutrition*, 110869. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110869>
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(8), 1607–1621. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.010>

11 ANEXOS:

11.1 Preparación de las muestras y soluciones

11.1.1 Muestra de Extracto

Muestra de extracto: Se pesaron 25mg de extracto crudo (previamente secado), se diluyó en metanol y se aforó a 5mL en un matraz volumétrico para obtener una concentración inicial de 25mg/5mL (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de esta solución se realizaron las diluciones 1:2 para obtener las concentraciones de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 156.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 78.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

11.1.2 Solución DPPH

Se pesaron 0.246 g de DPPH para obtener una concentración final de 25mg/L.

11.1.3 Solución ABTS

Se hizo reaccionar ABTS 7mM y persulfato de potasio 140 μM , durante 16 horas en ausencia de luz, una vez transcurridas las 16 horas de la reacción se diluyó la solución hasta obtener una absorbancia inicial de $0.7 \pm (0.02)$ a 732nm.

11.1.4 Solución $[\text{Fe (III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$

Se pesaron 0.054g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se aforaron en matraz volumétrico de 10mL utilizando agua destilada, una vez obtenida esta solución se reservó hasta su utilización, posteriormente se pesaron 0.0156g de TPTZ los cuales se diluyeron y aforaron con 5mL de HCl 40mM.

La solución final de $[\text{Fe (III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ se preparó utilizando las siguientes proporciones 1:2:3 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}:(\text{TPTZ})_2:\text{HCl}$), respectivamente.

11.1.5 Buffer acetato sodio (BAS)

Se pesaron 0.2735 g CH_3COONa , el cual se diluyó y aforó con 20mL de agua, posteriormente se tomaron 1.6mL de ácido Acético glacial y se aforo en matraz volumétrico de 20mL con agua destilada, como último se combinaron las soluciones de CH_3COONa y ácido acético glacial y se aforo en matraz de 100mL con agua destilada, ajustándose el pH a 3.6.

11.1.6 Inactivación de Suero Fetal Bovino (SFB)

Inicialmente se inactivo el Suero Fetal Bovino (SFB), esta acción se realizó descongelando el suero por medio de baño María a una temperatura de 37°C , posteriormente se calentó a 60°C (Baño María) durante 30 minutos y finalmente se dejó enfriar.

11.1.7 Preparación de PBS

Se pesaron 8g de Cloruro de sodio (NaCl), 0.2g de Cloruro de potasio (KCl), 1.15g de Fosfato de sodio dibasico (Na_2HPO_4) y 0.2g de Fosfato diácido de potasio, se aforó con agua MQ a 1L, y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C , se dejó enfriar y se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

11.1.8 Preparación de Medio RPMI-1640

La preparación del Medio RPMI-1640, se realizó disolviendo 5.2g de medio RPMI-1640 en 41.95ml de agua grado HPLC* (estéril) o en Agua MQ* (estéril). Una vez disuelto se le adicionó: 50mL de SFB, $500\mu\text{L}$ de antibiótico Penicilina/Estreptomina, 25mL de solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 12.5mL de solución amortiguadora de pH (HEPES), finalmente se agregaron 377.5mL de agua estéril.

11.1.9 Sulforodamina B (SRB)*

Se disolvieron 2 g de SRB en 500mL de CH_3COOH (ácido acético) al 1%.

11.1.10 Preparación de TRIS-Base*

Se disolvieron 1.2114g de TRIS en 1L de agua destilada.

11.2 Prueba T Student para muestras independientes

11.2.1 INDO-AcOEt

Estadísticas de grupo					
Muestras	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio	
% de inhibición	INDO	3	90.2	5.91817	3.41686
	AcOEt	3	88.5233	9.07143	5.23739

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior		Superior
% de inhibición	Se asumen varianzas iguales	0.878	0.402	0.268	4	0.802	1.67667	6.25341	-15.68559	19.03893
	No se asumen varianzas iguales			0.268	3.441	0.804	1.67667	6.25341	-16.85563	20.20896

11.2.2 INDO-MeOH

Estadísticas de grupo					
Muestras	N	Media	Desv.		Desv. Error promedio
			Desviación		
% de inhibición	3	90.2000	5.91817		3.41686
	3	87.3633	3.97082		2.29256

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% de inhibición	Se asumen varianzas iguales	1.159	0.342	0.689	4	0.528	2.83667	4.11469	-8.58756	14.26089
	No se asumen varianzas iguales			0.689	3.497	0.534	2.83667	4.11469	-9.26528	14.93862