

Estudio etnobotánico y evaluación citotóxica de extractos etanólicos de plantas de uso medicinal en Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes, Veracruz, México

Ethnobotanical study and cytotoxic evaluation of ethanolic extracts of medicinal plants in Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes, Veracruz, Mexico

Torres-Pelayo Vianey del Rocio¹, Lozada-García José Armando^{✉1}, Enríquez-López Sandra Lizveth¹, Arroyo-Helguera Omar Elind²

¹Facultad de Biología-Xalapa. Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Veracruz, México. Teléfono y Fax: + 52 (228) 842 1748.

²Instituto de Salud Pública. Universidad Veracruzana, Av. Doctor Luis Castelazo Ayala s/n, Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Ver, México.

✉ Autor de correspondencia: alozada@uv.mx

Recibido: 13/07/2018

Aceptado: 12/09/2018

RESUMEN

Las plantas medicinales son especies vegetales que contienen sustancias empleadas con propósitos terapéuticos y pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. En el presente trabajo se realizó un estudio etnobotánico y toxicológico de plantas de uso medicinal de Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes en el estado de Veracruz, México. Se registraron 22 especies distribuidas en 17 familias, destacando Asteraceae con el mayor número de frecuencia. Las especies seleccionadas fueron *Solanum nigrum*, *Bidens pilosa*, *Tithonia diversifolia*, *Commelina diffusa*, *Justicia pectoralis*, y *Aldama dentata*. Se realizó un análisis fitoquímico preliminar de las mismas, donde se obtuvo la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos y saponinas. *Solanum nigrum* tuvo mayor toxicidad de 51.72 µg/mL. Esta última especie tuvo toxicidad en la línea celular HeLa, obteniendo una reducción del 50% de viabilidad celular a partir de las 24 h. *S. nigrum* podría ser un potencial agente anti-proliferativo en este tipo de células.

Palabras clave: Estudio etnobotánico, toxicidad, *Solanum nigrum*, Línea celular HeLa.

ABSTRAC

Medicinal plants are species that contain substances used for therapeutic purposes and can serve as precursors for the synthesis of new drugs. In the present work, an ethnobotanical and toxicological study of medicinal plants of greater importance was carried out in the town of Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes in the state of Veracruz, Mexico. 22 species were registered distributed in 17 families, highlighting Asteraceae with the highest frequency number. The selected species were *Solanum nigrum*, *Bidens pilosa*, *Tithonia diversifolia*, *Commelina diffusa*, *Justicia pectoralis* and *Aldama dentata*, they have the presence of alkaloids, flavonoids, triterpenes and saponins. *Solanum nigrum* had higher toxicity of 51.72 µg/mL. This last species had toxicity in the HeLa cell line, obtaining a 50%

reduction in cell viability after 24 h; *S. nigrum* could be a potential anti-proliferative agent in this type of cells.

Keywords: Ethnobotanical study, toxicity, *Solanum nigrum*, Cell Line HeLa.

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se ha utilizado para tratar distintos tipos de padecimientos (Prieto *et al.*, 2004). Sin embargo, parte de este conocimiento empírico se ha ido perdiendo a través de los años (Lulekal *et al.*, 2008; Samuel *et al.*, 2010) y muchos de los medicamentos utilizados para tratar algunas enfermedades han sido extraídos de las plantas. Previos estudios han reportado los efectos citotóxicos de algunos compuestos presentes en plantas con la ayuda de modelos biológicos que sean eficaces y permitan obtener resultados confiables; el bioensayo de *Artemia sp* es uno de los más utilizados para evaluar la toxicidad de acuerdo a Vanhaecke y Persoone (1984); además, se ha reportado que existe correlación positiva entre la toxicidad en artemia y la citotoxicidad en células cancerígenas (McLaughlin *et al.*, 1998; Sausville y Johnson, 2000). El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de plantas de uso medicinal de la localidad de Tlalchi, Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio etnobotánico y colecta de especies

El estudio etnobotánico se realizó en la comunidad de Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes, Veracruz, México; lo cual se usaron entrevistas semi-estructuradas a informantes clave como hierberos, herbolarios y parteros (Molina, 2012). Posteriormente, se seleccionaron las plantas que fueran de conocimiento popular de la comunidad; nativas o silvestres de la región,

así como de su uso terapéutico relacionada a la etiología del cáncer humano. Las especies colectadas se llevaron al Herbario XALU en la facultada de Biología, campus Xalapa para la identificación taxonómica.

Elaboración de extractos etanólicos de plantas medicinales y análisis fitoquímico preliminar

Las especies seleccionadas fueron *Solanum nigrum L.*, *Tithonia diversifolia*, *Commelina diffusa*, *Bidens pilosa*, *Justicia pectoralis* y *Aldama dentata*. Se pulverizaron las hojas secas previamente y se pesaron 10 g de muestra. Estos se colocaron en el equipo soxhlet con 300 mL de etanol al 96% hasta agotar la muestra para obtener el extracto y se concentró. Se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares para determinar la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas y saponinas (Domínguez, 1979).

Determinación citotoxicidad en Artemia franciscana

Se cultivaron 0.1 g de huevos de *Artemia franciscana* en 100 mL de agua de mar artificial, a una temperatura $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h (NMX-AA-110-1995-SCFI). Se evaluaron cinco concentraciones de 0, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ por triplicado del extracto utilizando la técnica descrita por Meyer *et al.* (1982). Para calcular la CL_{50} de cada concentración se utilizó la prueba de Probit (Finney, 1971), con una probabilidad de $p < 0.05$. La especie que tuvo mayor toxicidad (valores de $\text{CL}_{50} < 1000\text{ } \mu\text{g/mL}$), fue seleccionada para la prueba de citotoxicidad en células HeLa (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

Citotoxicidad en células HeLa

Para la prueba de citotoxicidad en células de Hela, se utilizó el extracto etanólico foliar de *Solanum nigrum* L. Para ello, se cultivó la línea celular de cáncer cérvico uterino en un medio DMEM-F12 (Dulbecos modified Eagle Medium Sigma-Aldrich, EE.UU.) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico, en una atmosfera de 5 % de CO₂ a 37°C. En las pruebas se utilizaron placas de 96 pozos, donde se sembraron 1 x 10⁴ células por pozo en 200 µL de medio. El extracto etanólico de *S. nigrum* se utilizó a concentraciones de 500, 1500, 2500, 5000 y 10000 µg/mL; para el testigo de etanol se utilizó la concentración más alta que se tomó del extracto (10000 µg/mL) y se descartó el efecto del solvente sobre la viabilidad celular. Se determinó la citotoxicidad mediante la estimación de viabilidad celular con la técnica de MTT (3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), e incubados a las condiciones mencionadas y a diferentes tiempos 3, 6, 12, 24 y 48 h. Transcurrido este tiempo, se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se agitaron por un minuto, después el medio se aspiró, se adicionó 50 µL de DMSO (Di-metil-sulfoxido) y se agitaron. Para determinar el número de células, se leyó la densidad óptica (absorbancia) en un lector de ELISA a una longitud de onda de 550 nm. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular, densidad óptica (DO) de células tratadas entre la densidad óptica (DO) de células control por 100. Asimismo, para evaluar la apoptosis se utilizó la técnica de acridina de naranja y bromuro de etidio, en donde se sembraron células HeLa en placas de 24 pozos y se trataron con el extracto etanólico foliar de *S.*

nigrum en diferentes concentraciones de 500, 1500, 2500, 5000 y 10000 µg/mL. En el testigo de etanol se utilizó la concentración más alta de 10,000 µg/mL para descartar que tuviera efecto en la viabilidad celular. Posteriormente, se obtuvo el porcentaje de apoptosis y células muertas entre células totales por 100. Los resultados se analizaron con GraphPad Prism versión 5.00 para Windows 2015. Los datos se expresaron con promedio ± error estándar de la media (ESM). Las diferencias estadísticas se evaluaron con la prueba ANOVA para muestras repetidas, fijadas a una probabilidad de p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la localidad de Tlalchi, Veracruz, se identificaron 22 plantas medicinales distribuidas en 17 familias, siendo Asteraceae la familia más representativa con 7 especies, la familia Lauraceae con 4 especies y Rutaceae con 3 especies; en minoría se encontraron las familias Solanaceae, Rosaceae, Onagraceae y Laminaceae con dos especies; mientras que Acanthaceae, Caprifoliceae, Commelinaceae, Crasulaceae, Labiatae, Liliaceae, Malvaceae y Oleaceae con solo una especie. La familia Asteraceae es una de las familias más grandes de plantas vasculares en cuanto a número de géneros y especies (Rzedowski, 1972; Villaseñor, 1993); y ha sido una de las familias mayor reportada para algún uso medicinal (Ávalos y Pérez-Urría, 2009; Pérez-García, 2009; Gheno-Heredia, 2010; Chena-Becerra, 2013). De acuerdo a los criterios establecidos en este estudio, de las 22 especies de plantas identificadas, se seleccionaron 6 especies (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas medicinales de la comunidad de Tlalchi, Ixhuacán de los Reyes, Ver., Méx., que se seleccionaron para la prueba de toxicidad en *A. franciscana*.

	Nombre común	Familia	Nombre científico	Uso terapéutico	Parte de la planta utilizada	Forma de preparación	Modo de aplicación
1	Ocoxochitl	Acanthaceae	<i>Justicia pectoralis</i>	Padecimiento de cáncer.	Hojas tallos.	Infusión	Bebido
2	Mozote amarillo	Asteraceae	<i>Aldama dentata</i>	Padecimiento del Hígado.	Hojas, tallos y flor	Infusión	Bebido
3	Mozote blanco	Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Padecimiento del Hígado.	Hojas, tallos y flor	Infusión	Bebido
4	Gigantón	Asteraceae	<i>Tithonia diversifolia</i>	Padecimiento del Hígado. Aljorra (para las pompis del bebé).	Hojas, tallos.	Infusión Cataplasma	Bebido Aplicación Local
5	Matlali	Commelinaceae	<i>Commelina diffusa.</i>	Padecimiento del Hígado.	Hojas, tallos.	Infusión	Bebido
6	Hierba mora	Solanaceae	<i>Solanum nigrum L.</i>	Mal de orín y para el padecimiento del riñón.	Hojas, tallos flor y fruto	Infusión	Bebido

Pruebas preliminares Fitoquímicas de extractos etanólicos de plantas medicinales

Los extractos etanólicos foliares de las especies de plantas *Solanum nigrum L.*, *Tithonia diversifolia*, *Commelina diffusa*, *Bidens pilosa*, *Justicia pectoralis* y *Aldama dentata* tuvieron mayor presencia de alcaloides y flavonoides, y en menor presencia cumarinas. No se identificaron saponinas, terpenos y esteroides. Se observó que la especie *Solanum nigrum L* tuvo mayor presencia de alcaloides y flavonoides, y la especie de menor presencia fue *Justicia pectoralis*. La presencia de alcaloides y flavonoides en *S. nigrum L* concuerda con el estudio de Sanabria-Galindo *et al.*, (1997) y se ha reportado que los alcaloides, flavonoides y terpenos tienen propiedades anticancerígenas (Kihman *et al.*, 1992 Ding *et al.*, 2012).

Efecto toxicológico de extractos etanólicos de seis plantas de uso medicinal en Artemia franciscana

La especie que tuvo mayor toxicidad es *S. nigrum L.* con una CL_{50} de 51.72 $\mu\text{g/mL}$; estas fueron similares a las pruebas de Shimada *et al.*, (1997) con toxicidad de CL_{50} de 22 $\mu\text{g/mL}$, aunque diferidas con respecto a lo reportado por Salama *et al.*, (1996) con una CL_{50} de 437 $\mu\text{g/mL}$, sugiriendo que se debe a factores como el clima, suelo, edad del organismo y temporada de colecta pueden ser factores críticos o determinantes para obtener variación de metabolitos secundarios en esta especie (Abreu *et al.*, 2004; Andrade-Neto *et al.*, 2004). Las especies que tuvieron menor toxicidad fueron *T. diversifolia* (1,545.36 $\mu\text{g/mL}$), *C. diffusa* (4,239.47 $\mu\text{g/mL}$), *B. pilosa* (4,589.105 $\mu\text{g/mL}$), *J. pectoralis* (6,483.30 $\mu\text{g/mL}$) y *A. dentata* (8,729.62 $\mu\text{g/mL}$). De acuerdo con otros autores, existe una relación positiva entre toxicidad de *A. franciscana* y citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de humanos (Sausville y Johnson, 2000; Vanhaecke y Persoone, 1994), esta prueba preliminar es importante para dar seguimiento en el

descubrimiento de principios activos con propiedades anticancerígenas.

Efecto citotóxico del extracto etanólico de *S. nigrum* L. en línea celular HeLa

El efecto citotóxico del extracto etanólico foliar de *S. nigrum* sobre células HeLa, se presentó a partir de las 6 horas del tratamiento a una concentración de 2500 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al testigo. Posteriormente, la pérdida de viabilidad celular decreció a partir de las 12 hasta las 72 horas, siendo la concentración de 5000 y 10000 $\mu\text{g/mL}$ donde se observó un 25% de la pérdida de viabilidad celular ($P < 0.001$). Este mismo patrón se observó a las 24, 48 y 72 horas, con el tratamiento de 500 hasta los 10000 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al testigo ($P < 0.001$; Figura 1). Asimismo, se observó un mayor

porcentaje de células apoptóticas dependiente de la concentración ($P < 0.001$, Figura 2). Este efecto en la reducción de la viabilidad de las células HeLa a partir de las 6 h ($P < 0.005$), podría estar asociado al arresto celular, o en su caso, muerte celular (apoptosis), sin embargo, para asegurar este proceso, es necesario realizar más estudios. Las células HeLa tratadas con *S. nigrum* adquirieron una morfología redonda (Figura 1A) que es típica de células arrestadas en la fase G2/M del ciclo celular (Albert *et al.*, 2003 Ding *et al.*, 2012). A concentración de 10,000 $\mu\text{g/mL}$ en un periodo de 24 h, algunas células mostraron núcleos fragmentados y protuberancias celulares (Figura 1 A), características de células apoptóticas (Albert *et al.*, 2003; Chang-Huerta, 2013).

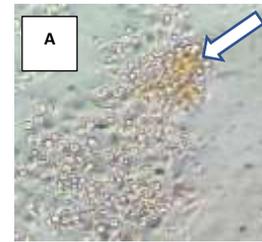
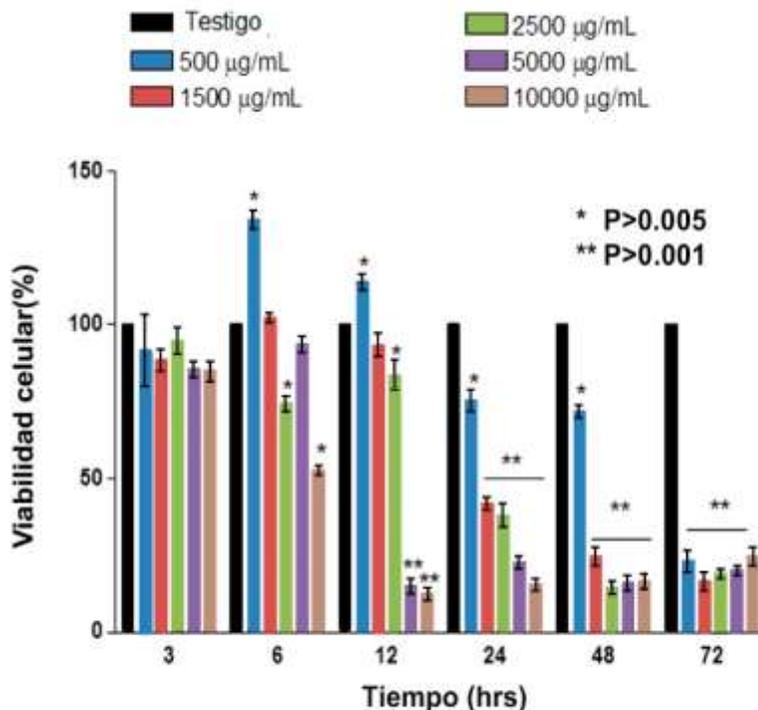
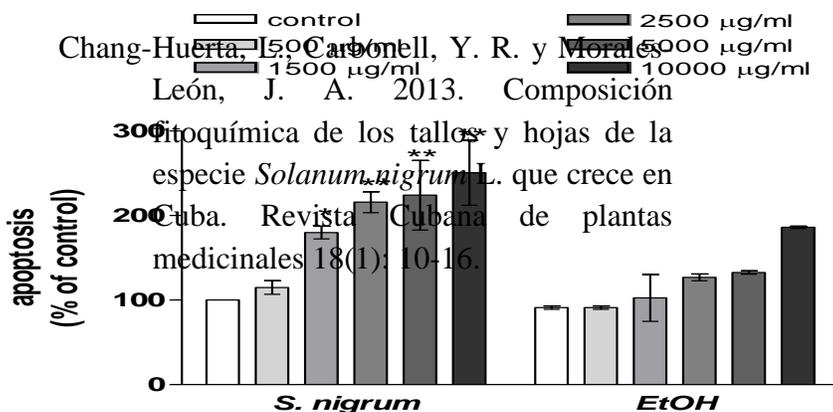


Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular del tratamiento con extracto etanólico foliar de *S. nigrum* L. en células HeLa. A) Se observan algunas células con morfología apoptótica (flecha color blanco) a un aumento de 40x (concentración de 10,000 $\mu\text{g/mL}$ en 24 h).



ANOVA EtOH vs *S. nigrum* * $p < 0.0$; ** $P < 0.001$

Figura 2. Diferencias significativas de la apoptosis celular con respecto al tratamiento del extracto etanólico foliar de *S. nigrum* en un tiempo de 24 horas.

CONCLUSIÓN

Se identificaron 22 plantas medicinales, representadas en 17 familias, siendo *Asteraceae* la más representativa. El extracto etanólico foliar de *Solanum nigrum* L. presentaron efectos toxicológicos significativos en *Artemia franciscana* y actividad citotóxica en células HeLa a partir de las 6 horas de exposición. Posteriormente, decremantando significativamente la pérdida de viabilidad celular a partir de las 12 horas de tratamiento, en concentraciones de 5000 µg/mL, y a las 24 h a partir de 1500 µg/mL con respecto al control.

LITERATURA CITADA

- Abreu, J., Scull, R., Miranda, M., Cuellar, A., Fuentes, V. y Acosta, L. 2004. La flora medicinal de Cuba. En Plantas Medicinales. La Habana Ed., pp 23-35.
- Andrade-Neto, V. F., Brandão, M. G., Oliveira, F. Q., Casali, V. W., Njaine, B. y Zalis, M. G. 2004. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. Phytotechnical Research 18: 634-639. <https://doi.org/10.1002/ptr.1510>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2003. Biología molecular de la célula. 4th edn. Annals of Botany 91 (3): 401. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>
- Ávalos, A. y Pérez-Urría, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie de Fisiología Vegetal 2(3):119-145.

- Chang-Huerta, L., Carbonell, Y. R. y Morales-León, J. A. 2013. Composición fitoquímica de los tallos y hojas de la especie *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Revista Cubana de plantas medicinales* 18(1): 10-16.
- Chena-Becerra, F. 2013. Actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal en la localidad de Tlalch, Ixhuacán de los Reyes, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana, pp: 1-67.
- Ding, X., Fang-Shi, Z., Min, L. y Si-Guo, G. 2012. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *S. nigrum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 599-604. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.058>
- Domínguez, A.X. 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México D.F., pp: 81-209.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge: Cambridge University Press, pp: 318.
- Gheno-Heredia, J. 2010. La etnobotánica y la agrobiología como herramientas para la conservación y el manejo de recursos naturales: un caso de estudio en la Organización de Parteras y Médicos Indígenas Tradicionales 'Nahuatlxiuhitl' de Ixhuatlancillo, Veracruz, México, Tesis de doctorado en ciencias agropecuarias y recursos naturales. Universidad Autónoma del Estado en México.
- Kihman, B., Wonjon, S., Taeho, K., Soohyun, B., Shiwoono, L. y Kapduck, J. 1992. Anticarcinogenic B-carboline alkaloids from *Commelina diffusa* Arc. *Farmacologia* 15: 220-223.
- Lulekal E., Kelbessa E., Bekele T. y Yineger H. 2008. An ethnobotanical study of medicinal plants in Mana Angetu District, southeastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 4(10): 1746-4269. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-4-10>
- McLaughlin, J. L., Lingling, L.R. y Anderson, J.E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* 32: 513-524. <https://doi.org/10.1177/009286159803200223>
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medicine* 45: 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Molina, A. 2012. Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata, Madre de Dios, Perú. *Ciencia y Desarrollo* 14: 7-26. <https://doi.org/10.21503/cyd.v14i0.1140>
- NMX-AA-110-1995-SCFI. 1995. Análisis de Agua – Evaluación de Toxicidad Aguda con *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea – Anostraca). *Método de Prueba*. Secretaría De Comercio y Fomento Industrial. Universidad Nacional Autónoma de México, pp: 45.

- Pérez-García, V. 2009. Plantas medicinales de uso en traspatio en la zona centro del estado de Veracruz, México. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias Biológicas y Agropecuarias. Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana.
- Pino-Pérez, O. y Jorge-Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicológicos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal* 22: 34-43.
- Rzedowski, J. 1972. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. *Ciencia Mexicana* 27: 123-132.
- Sanabria-Galindo, A., López, S. I. y Gualdrón, R. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia* salina de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacológicas* 26:15-19.
- Samuel A, Kalusalingam A, Kumar D, Gopinath R, Radhamani S, Azman H, Muruganandham V y Promwichit P. 2010. Estudio etnomédico de las plantas utilizadas por los Orang Asli en Kampung Bawong, Perak, Malasia Occidental. *Revista de Etnobiología y Etnomedicina* 6 (5): <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-5>
- Sausville, E. A. y Johnson, J. I. 2000. Molecules for the millennium: How will they look. *New Drug Discovery year 2000. British Journal of Cancer* 83: 1401-1404. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1473>
- Salama, A., Hinestrosa, A. P. y Chaves, R. 1996. Fito y Bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacológicas* 25: 44-51.
- Shimada, H., Tyler, V. E. y McLaughlin, J. L. 1997. Biologically active acylglycerides from the berries of saw-palmetto (*Serenoa repens*). *Journal of Natural Products* 60: 417-418. <https://doi.org/10.1021/np960552o>
- Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. y Molina-Torres, J. 2004. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 35 (1): 19-36.
- Villaseñor, J. L. 1993. La familia Asteraceae en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 44: 117-124.
- Vanhaecke, P. y Persoone, G. 1984. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environmental* (2): 143-157.

Copyright (c) 2018 Vianey del Rocio Torres Pelayo, José Armando Lozada García, Sandra Lizveth Enriquez López y Omar Elind Arroyo Helguera



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)