



IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE TEMPISQUE (*Sideroxylum capiri* PITTIER)

QUALITATIVE IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES AND CYTOTOXICITY DETERMINATION OF TEMPISQUE EXTRACTS (*Sideroxylum capiri* PITTIER)

Robles-García Miguel Angel¹, Aguilar Antonio J.³, Gutiérrez-Lomelí Melesio¹, Rodríguez-Félix Francisco², Morales-Del-Río Juan Alfredo¹, Guerrero-Medina Pedro Javier¹, Madrigal-Pulido Jaime Alberto¹ y Del-Toro-Sánchez Carmen Lizette^{1*}

¹ Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Ocotlán, Jalisco, México.

² Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N. Hermosillo, Sonora, México.

³ Coordinación de genómica alimentaria, Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCM), Avenida Universidad 3000, Col. Lomas de la Universidad, 59103 Sahuayo, Michoacán, México.

RESUMEN

Sideroxylon capiri (Tempisque) es un árbol cuyas hojas y frutos son comestibles usándose también como condimento en alimentos y para algunas enfermedades del riñón. Sin embargo, es una planta que no tiene un perfil de metabolitos secundarios reportado y se desconoce su citotoxicidad, siendo esto el objetivo de la presente investigación. A partir del extracto metanólico de *S. capiri* obtenido por percolación, se determinaron los metabolitos secundarios por pruebas cualitativas, así como su citotoxicidad utilizando *Artemia salina*. Dentro de los resultados obtenidos, se lograron identificar en los extractos de hoja de *S. capiri*, fenoles, flavonoides, esteroides y taninos. Sin embargo, no se encontraron saponinas, cumarinas y alcaloides. Además, según el ensayo realizado con *A. salina*, este extracto es prácticamente no tóxico.

Palabras clave: *Sideroxylon capiri*, metabolitos secundarios, citotoxicidad, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Sideroxylon capiri (Tempisque) is a tree which leaves and fruits are edible being used as a food condiment and to treat some kidney diseases. However, this plant does not have a secondary metabolites profile nor cytotoxicity reports, hence, this is the objective of the present research. From the *S. capiri* methanol extract obtained by percolation, secondary metabolites were determined by qualitative tests as well as cytotoxicity using *Artemia salina*. According to the results obtained from *S. capiri* leaves extract, phenols, flavonoids, steroids and tannins were present. However, saponins, coumarins and alkaloids were absent. Furthermore, this extract is practically nontoxic according to the *A. salina* test.

Keywords: *Sideroxylon capiri*, secondary metabolites, cytotoxicity, *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son sustancias orgánicas que se encuentran en las plantas, los cuales no tienen un papel definido en los procesos de respiración, asimilación y transporte, a diferencia de los metabolitos primarios como los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Valencia-Ortiz, 1995; Taiz y Zeiger, 1998). Además, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades a partir del metabolismo primario y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

Sin embargo, a pesar de producirse en las plantas en pequeñas cantidades, algunos productos de este metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas que intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas, actuando como atrayentes y repelentes de animales, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas frente a diferentes patógenos. Muchos son pigmentos que proporcionan color a las flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. También tienen un importante valor medicinal, económico, en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Como ejemplos de estos metabolitos se encuentran los compuestos fenólicos, cumarinas, saponinas, esteroides y alcaloides entre otros.

Para poder consumir o bien aplicar estos metabolitos secundarios, se requiere determinar dosis adecuadas que eviten efectos tóxicos a los seres humanos. Por lo tanto, es importante la determinación de la citotoxicidad de cualquier sustancia. La citotoxicidad celular constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario. Consistente en la

*Autor para correspondencia: Del-Toro-Sánchez Carmen Lizette
Correo electrónico: lizetted@gmail.com

Recibido: 29 de septiembre de 2015

Aceptado: 08 de julio de 2016

capacidad para interactuar con otras células y destruirlas. Cualquier tipo celular, normal o patológico, puede ser potencialmente susceptible a las células citotóxicas y se emplea gráficamente el término "células diana" (target cells) para su designación (De Saint y Fischer, 2001).

En 1982 Meyer *et al.* propusieron el uso de larvas de *Artemia salina* (crustáceo pequeño de aguas salobres) como organismo de prueba en un bioensayo general para evaluar la citotoxicidad de sustancias vegetales. Esto se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (McLaughlin *et al.*, 1998; Abreu-Payrol *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2001; Kanegusuku *et al.*, 2002). Se ha reportado correlación positiva entre la toxicidad en *A. salina* y la citotoxicidad en células de carcinoma nasofaríngeo humano (McLaughlin *et al.*, 1998) y en diferentes líneas celulares de tumores humanos (Carballo *et al.*, 2002).

Sideroxylon capiri (Danto amarillo o Tempisque) se encuentra distribuida a lo largo de las costas del Pacífico y del Golfo, hasta gran parte de Centroamérica, también en las Pequeñas Antillas (Standley y Williams, 1967). En México se ha encontrado en San Luis Potosí, Querétaro, Nayarit, Colima, Michoacán, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Jalisco (Pennington, 1990). Las hojas y frutos son consumidos por los seres humanos (Uphof, 1968; Wollenweber y Arriaga-Giner, 1991) utilizándolos comúnmente como condimentos de guisados (Newman, 2008). La corteza de este árbol en remojo es utilizada para tratar enfermedades del riñón (Pennington, 1990; Barrance *et al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce su perfil fitoquímico y su citotoxicidad, por lo que son el objetivo de esta investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Las muestras se recolectaron de forma aleatoria en el estado de Jalisco, en la parte norte y sur de los municipios de Ocotlán y Jamay en el mes de febrero de 2014 (20 plantas por región). Posteriormente a la recolección de las muestras, las hojas se secaron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 48 h, posteriormente se pulverizaron en un mortero y se almacenaron en ausencia de oxígeno a -20 °C hasta su uso.

Perfil cualitativo fitoquímico

Para la realización del perfil cualitativo fitoquímico se realizó la siguiente extracción: Se pesaron 3 g de hoja seca pulverizada y se agregaron 30 mL de metanol en un matraz tapado y protegido de la luz. Posteriormente, se homogenizó en un ultraturrax, se sonicó durante 15 min y se adicionaron otros 30 mL de metanol y 60 mL de éter de petróleo. Se protegió de la luz y se dejó en un termoagitador durante 1 h a 1500 rpm. Transcurrido este tiempo se filtró la muestra y se colocó en un embudo de separación para obtener la fase éterea (oleosa) y la metanólica, para la identificación de a) fe-

noles, b) flavonoides, c) saponinas, d) alcaloides, e) esteroides y f) cumarinas.

a) Determinación de fenoles. A partir del extracto metanólico, se realizaron dos pruebas de identificación cualitativa para fenoles: una colorimétrica y la otra por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés). Para la prueba rápida colorimétrica se utilizó el método de cloruro férrico (FeCl₃) para su identificación. Un cambio de color a azul oscuro indica la presencia de fenoles o taninos pirogálicos (hidrosolubles). Si el cambio es a verde oscuro indica la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos condensados). La identificación de fenoles mediante TLC se llevó a cabo utilizando placas de TLC (7x4 cm) (MACHEREY-NAGEL, DC-Fertigfolien ALUGRAM, 907189) la fase móvil utilizada fue éter de petróleo:acetato de etilo:ácido fórmico (40:60:1). Una vez corridas las placas, se llevaron bajo luz UV (UVP, UVLS-26 El series UV Lamp, P/N 95-0279-0), a las longitudes de onda de 254 y 365 nm para observar el número de compuestos fluorescentes. Posteriormente, se utilizó el agente revelador FeCl₃ al 10 % y se colocó en una parrilla eléctrica (THERMO Scientific, SP131015) a 110 °C por un lapso de 10 min. Finalmente se obtuvo el factor de retención (Rf= distancia solvente/distancia muestra) de cada compuesto encontrado. Se utilizó ácido gálico como control positivo (García *et al.*, 2009; CUBOCUC, 2011).

b) Determinación de flavonoides. Se utilizó el extracto metanólico (Galindo *et al.*, 1989) y se realizó por TLC. Las placas tuvieron las mismas características y se utilizó el mismo procedimiento que para fenoles. La fase móvil fue acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético glacial:agua (100:11:11:27). Se utilizó quercetina como control positivo (García *et al.*, 2009; CUBOCUC, 2011).

c) Determinación de taninos. Esta prueba se realizó con muestra seca triturada de la planta en estudio. Se colocaron 0.37 g de muestra seca en un matraz aforado. Se le añadieron 100 mL de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆) para obtener una concentración de 0.004 M, en ausencia de luz y sometidos a 100 rpm por 15 min (Shaker. Maxq2000, Barnstead/Lab-Line, SHKA2000). Transcurrido el tiempo señalado se adicionaron 20 mL de cloruro férrico (FeCl₃) al 0.008 M. Si el color es verde oscuro sugiere la presencia de taninos condensados y si es azul son taninos hidrolizables (Alcaráz-López, 2009; García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

d) Identificación de esteroides. Se utilizó la prueba de Lieberman-Buchard. Para este ensayo se partió del extracto oleoso (etéreo). Se tomó 1 mL y se colocó en un crisol. Posterior a su volatilización en campana se adicionaron 4-5 gotas de cloroformo al crisol, se mezclaron bien y se repartieron mediante goteo a 4 tubos de vidrio con tapa. Posteriormente, se agregaron 2 gotas de anhídrido acético a cada tubo y una gota de ácido sulfúrico con pipeta Pasteur a solo 3 de los tubos para que uno de ellos sirva como control negativo. Una coloración azul o verde = esteroides; rojo, rosado o violeta = triterpenos; amarillo pálido = esteroides o

triterpenos saturados (Galindo *et al.*, 1989; García *et al.*, 2003, García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

e) Identificación de saponinas. Se utilizó el método de espuma. Se diluyó el extracto 9:1. Posteriormente se tomó 1 mL del extracto metanólico, más 9 mL de H₂O destilada, colocándolo en un tubo de ensaye con tapa (13 x 100 mm). Se agitó vigorosamente durante 30 s, preferentemente con la mano. Se dejó reposar 15 min. Si la altura de espuma es <5 mm: (-), se considera negativa, no contiene saponinas; alrededor de 5-10 mm (+) argumenta un contenido moderado; una altura >15 mm (+++), se le atribuye a un alto contenido de saponinas (Galindo *et al.*, 1989; García *et al.*, 2003, García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

f) Prueba rápida para cumarinas. A partir del extracto metanólico, se realizó una dilución siguiendo la proporción (9:1) de extracto:agua. De dicha dilución se tomaron 2 mL en un tubo de vidrio con tapa, colocando una tira de papel filtro dentro del tubo previamente empapada de una solución alcalina de NaOH (0.06 g/mL). Sin tocar el extracto dentro del tubo, se tapó y se llevó a calentar en un mechero Bunsen hasta desprendimiento de vapores. Las cumarinas presentes en los extractos se acumulan en el papel filtro. Posteriormente el papel filtro se llevó bajo lámpara UV (UVP, UVLS-26 El series UV Lamp, P/N 95-0279-0), la presencia de puntos fluorescentes indica que la muestra es positiva.

e) Ensayo para alcaloides. Se tomó 1 mL de extracto, adicionándole 4 gotas de hidróxido de amonio líquido. Después de llevarlo a sequedad se le adicionaron 3 gotas de ácido acético y una gota de agua bidestilada, concentrando la solución bajo campana de extracción. Se colocaron 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Un cambio de naranja a rojo o rosado sugiere la presencia de alcaloides (Galindo *et al.*, 1989; Maldoni, 1991).

Determinación de citotoxicidad

Antes de este ensayo, se obtuvieron extractos metanólicos, pesando 3 g de muestra seca con 30 mL de metanol. Se homogenizó, se sonicó (15 min), se centrifugó (4000 rpm, 15 min, 4 °C), se filtró el sobrenadante y se concentró para obtener el rendimiento de extracto. Este extracto se utilizó para la prueba de citotoxicidad.

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó el método de *Artemia salina* propuesto por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006) y Leos-Rivas (2010); con algunas modificaciones. En 1 L agua salina al 4 % se pusieron a crecer 100 mg de huevos de *A. salina* expuestos a luz blanca y a temperatura de 25 °C. Se dejaron eclosionar durante 48 h. Posteriormente se tomaron 120 µL conteniendo 10-15 nauplios en este volumen y se colocaron en pocillos de microplacas de 96 pozos. Se adicionaron 150 µL del extracto metanólico de la planta a diferentes concentraciones (10-1500 µg/mL). Durante el bioensayo se registró el número de nauplios puestos inicialmente (TV); al cabo de 24 horas de contacto con el extracto de la planta se realizó el conteo del número de nauplios muertos (TM). Se calculó el porcentaje de letalidad por cada una de

las concentraciones determinadas mediante la ecuación: % Letalidad = TM/ TV x 100, calculándose la concentración letal media (CL₅₀) por la siguiente ecuación y determinando el grado de toxicidad como lo indica la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de toxicidad según CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo)

Table 1. Toxicity classification according CYTED (Science and Technology for Development)

I	Extremadamente tóxico	1-10	µg/mL
II	Altamente tóxico	10-100	µg/mL
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/mL
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/mL
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/mL
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/mL

Fuente CYTED, 2014.

$$\log CL_{50} = \log X_1 + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log(X_2) - \log(X_1)]$$

X_1 → Concentración inhibición $Y_1 > 50$ %

X_2 → Concentración inhibición $Y_2 < 50$ %

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA y la prueba de LSD (mínima diferencia significativa, por sus siglas en inglés) ($P < 0.05$) utilizando el programa Statgraphics centurión XV versión 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extracto

Antes de realizar la determinación del perfil cualitativo fitoquímico y la citotoxicidad se procedió a calcular el rendimiento del extracto (Tabla 2). Se obtuvo en promedio el 11.22 % de rendimiento. Los rendimientos de las plantas son muy variables y dependen mucho de su composición, lugar de desarrollo, de la parte de la planta en estudio (raíz, hoja, tallo, fruto, etc.), así como del tipo y condiciones de extracción. Es por ello que las comparaciones entre otras especies de plantas se torna difícil. Sin embargo, existen plantas cuya determinación del rendimiento fue similar a nuestro estudio y también fueron en hojas. Por ejemplo, *Heliotropium amplexicaule* (7.12 %) (Leos-Rivas, 2010), *Ziziphus amole* (9.38 %) (Romero-castillo *et al.*, 2013), *Nicotiana trigonophylla* (12.11 %), *Solanum rostratum* (13.3 %) (Muñoz-Juárez, 2011), *Crataegus gracilior* (13.78 %) (López-Corona, 2013), *Borago officinalis* (15.38 %) (Leos-Rivas, 2010). Por lo tanto, el rendimiento obtenido en *Sideroxylon capiri* se encuentra dentro de los límites que se han obtenido considerándose que es alto comparado con el de otras plantas.

Perfil cualitativo fitoquímico

Los resultados colorimétricos obtenidos indican la presencia (+) o ausencia (-) de los metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, esteroides, saponinas, cumarinas, alcaloides y taninos, identificados de manera cualitativa y repor-

Tabla 2. Rendimiento de extracto de hoja seca de *Sideroxylon capiri*.
Table 2. Yield of dry leaf extract of *Sideroxylon capiri*.

Muestra	Peso inicial (g)*	Extracto (g)*	Rendimiento gE/gms ^{1*}	Rendimiento (%)*
Extracto metanólico	3 ± 0.001	0.34 ± 0.05	0.11 ± 0.02	11.22 ± 1.84

¹gramos de extracto por gramos de muestra seca. *Media ± desviación estándar de tres réplicas.

tados en la Tabla 3. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó presencia de todos los metabolitos secundarios, con excepción de saponinas, cumarinas y alcaloides.

Dentro de las pruebas colorimétricas, se observó que la composición fenólica (flavonoides, taninos y cumarinas) predomina más que el resto de los metabolitos estudiados. A estos compuestos se les han atribuido infinidad de propiedades, entre ellas como antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996), antimalaria (Reddy *et al.*, 2007), antiinflamatorios (Middleton *et al.*, 2000; Ganesan *et al.*, 2010), antimicrobianos (Reddy *et al.*, 2007), antifúngicos (Aziz *et al.*, 1998), entre otros. Con estos atributos, las aplicaciones del extracto podrían ser diversas, sobre todo en las industrias farmacéuticas y alimentarias. Adicionalmente, su aplicación podría ser más fácil al haber ausencia de saponinas y alcaloides, ya que se especula que estos metabolitos son unos de los principales tóxicos para los humanos (Carretero, 2000).

Por otra parte, se determinaron los factores de retención para fenoles y flavonoides por TLC (Tabla 4). Esto permite identificar cualitativamente los compuestos presentes en las muestras dependiendo su posición dentro de la placa.

Tabla 3. Identificación de metabolitos secundarios en el extracto de hoja seca de *Sideroxylon capiri*.

Table 3. Identification of secondary metabolites in the *Sideroxylon capiri* dry leaf extract

Metabolitos	Hoja seca de <i>Sideroxylon capiri</i>	Control positivo
Fenoles	Presencia de fenoles de tipo catecol (+)	Ácido gálico
Flavonoides	Presencia de flavonoides (+)	Quercetina
Esteroides	Presencia de esteroides o triterpenos (+)	Algestrona y estradiol
Saponinas	No tiene presencia de saponinas (-)	Extracto de agave
Cumarinas	No tiene presencia de cumarinas (-)	Extracto de gordolobo
Alcaloides	No tiene presencia de alcaloides (-)	Cafeína (cafiásipirina)
Taninos	Presencia de taninos hidrolizables (+)	-----

El compuesto con mayor Rf es menos polar debido a que interactúa con menos fuerza con el absorbente polar en la placa. El menor Rf obtenido en las muestras de hoja seca de *S. capiri* para fenoles fue de 0.45 a longitudes de 254 y 365 nm, mientras que para flavonoides fue de 0.28 (254 nm) y 0.74 (365 nm). El mayor Rf observado fue de 0.94 tanto para fenoles como flavonoides en ambas longitudes de onda.

Tabla 4. Valores de Rf (factor de retención) observados en fenoles y flavonoides de los extractos *Sideroxylon capiri*.
Table 4. Rf values (retention factor) observed in phenols and flavonoids from *Sideroxylon capiri* extracts.

Método	Rf de extracto metanólico de hoja seca de <i>Sideroxylon capiri</i>												Q	
	AG	Fenoles						Flavonoides						
		254 nm			365 nm			254 nm			365 nm			
	H1	H2	H3	H1	H2	H3	H1	H2	H3	H1	H2	H3		
Cromatografía en capa fina (TLC)	-	-	-	-	-	-	0.28	0.28	0.28	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	0.52	0.52	0.52	-	-	-	-	
	-	-	-	0.66	0.66	0.66	-	-	-	-	-	-	-	
	-	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.76	0.76	0.76	-	
	-	-	-	-	-	-	0.77	0.77	0.77	-	-	-	-	
	-	-	-	0.81	0.81	0.81	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	0.86	0.86	0.86	-	-	-	-	-	-	-	
	-	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	-	-	-	-	-	-	
-	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	-	-	-	0.94	0.94	0.94	-	

AG= ácido gálico; Q= Quercetina. H1, H2, H3= Son las tres repeticiones

Las muestras indican que se tiene presencia de ácido gálico (fenol) y de quercetina (flavonoide) al encontrarse en ambas muestras el mismo Rf correspondiente a estos estándares. A 254 nm se observa la presencia de 4 compuestos fenólicos, y a 365 nm se observaron 7. Para flavonoides fueron menos los compuestos observados en ambas longitudes de onda (254 nm: 4 compuestos, 365 nm: 3 compuestos).

Los flavonoides son una clasificación de los fenoles y en relación del número de compuestos encontrados aproximadamente más del 50 % pertenecen a los flavonoides. Sin embargo, esto solo se podría confirmar realizando una cuantificación e identificación de los mismos a través de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés).

Determinación de la citotoxicidad del extracto metanólico de hoja seca de *Sideroxylon capiri*.

Se realizaron las pruebas para determinar la citotoxicidad del extracto de hoja seca de *Sideroxylon capiri* utilizando nauplios de *Artemia salina* durante 48 h de exposición con el extracto bajo luz a una temperatura menor a 25 °C. El grado de toxicidad se muestra en la Tabla 5. Además se calculó la concentración letal media (CL₅₀) en donde 1231 µg/mL fue la concentración en la cual se mueren el 50 % de los nauplios. Por lo tanto, se puede concluir que los extractos de la planta *Sideroxylon capiri* pueden ser prácticamente no tóxicos obteniendo grado V de toxicidad según la Tabla 1. Quizá este resultado pueda ser relacionado con la ausencia de saponinas y alcaloides en el extracto, ya que a estos compuestos se les han atribuido propiedades tóxicas. Sin embargo, este análisis solo da un aproximado de la concentración letal media, se tienen que realizar en estudios posteriores más análisis pero ahora con células especializadas para determinar exactamente el grado de toxicidad dependiendo la procedencia celular.

Tabla 5. Grado de toxicidad encontrada en extractos de *Sideroxylon capiri*.
Table 5. Toxicity found in *Sideroxylon capiri* extracts.

Concentración µg/ mL	Número de nauplios antes de incubar (promedio)*		Número de nauplios después de incubar (promedio)*		% de nauplios muertos después de incubar a 24 horas con extracto (promedio)*	Grado de toxicidad
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos		
Blanco (agua salina)	10.6±0.57	0	10.3±0.57	0.3±0.57	3±5.19	No tóxica
10	10.0±1.70	0	9.6±2.00	0.3±0.57	3.6±6.35	No tóxica
100	10.0±1.00	0.6±0.57	9.6±0.57	1.0±0.00	9.3±0.5	No tóxica
500	10.0±0.00	0	8.3±0.57	1.6±0.57	16.6±5.7	No tóxica
1,000	9.6±0.57	0.3±0.57	5.6±1.50	4.0±2.0	40.6±19.0	No tóxica
1,500	10.3±0.57	0	3.3±0.57	7.0±1.0	68.3±7.6	Prácticamente no tóxico

*Media ± desviación estándar de tres réplicas.

CONCLUSIONES

El extracto de hoja seca de *Sideroxylon capiri* pudiera ser buena fuente de metabolitos secundarios con propiedades importantes para la industria farmacéutica y/o alimentaria, ya que su rendimiento fue alto (11.22 %) en comparación con otras plantas. Además, se clasificó como un extracto prácticamente no tóxico según el ensayo con *Artemia salina*, por lo que su aplicación podría ser más segura. Sin embargo, este estudio da las bases científicas para en un futuro poder determinar la composición del extracto y estudiar de forma particular cada compuesto y sus CL₅₀ en células especializadas.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo al becario del Doctorado en Ciencias M. en C. Miguel Angel Robles García con número de C.V.U. 311260

REFERENCIAS

- Abreu-Payrol, J., M. Miranda-Martínez, G. Toledo-Carrabeo y O. Castillo-García. 2001. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Revista Cubana de Farmacología*. 35(1): 56-60.
- Alcaráz-López, O. A. 2009. Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in Vitro* de las plantas medicinales *Heterotheca inuloides*, *Calea urticifolia*, *Buddleia spp.* y *Sambucus spp.* usadas en el estado de Jalisco. Tesis de Maestría presentada en el Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Pp. 48-49.
- Avalos-García A, y Perez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*. 2(3): 119-145.
- Barrance, A. J. Beer, D.H. Boshier, J. Chamberlain, J. Cordero, G. Detlefsen, B. Finegan, G. Galloway, M. Gómez, J. Gordon, M. Hands, J. Hellin, C. Hughes, M. Ibrahim, R. Leakey, F. Mesén, M. Montero, C. Rivas, E. Somarriba, J. Stewart. 2013.

- Descripciones de especies de árboles nativos de América Central; Árboles de Centroamérica un Manual para el Extensionista, CATIE. 877-878.
- Carballo, J. Hernández-Inda Z. Pérez P. y García-Grávalos M. 2002. A comparison between two brine shrimp assay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2(1): 17-25.
- Carretero Accame, M. E. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual del Medicamento*. 24(235): 633-636.
- CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2014. Consultado en: <http://www.cytex.org>. Accesado 24 de enero de 2014.
- CUBOCUC (CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses). 2011. TLC – Retention Factor (Rf). University Of Colorado. Disponible en: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/TLC/TLCrf.html>. Accesado en febrero 2014.
- De Saint, B. G. y Fischer, A. 2001: The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis. *Current Opinion in Immunology*. 13(5): 549-554.
- Galindo, W. F., Rosales, M., Murgueitio, E. y Larrahondo, J. E. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*. 1(1): 1- 6.
- Ganesan S., Faris A. N., Comstock, A. T., Chatteraj S. S., Chatteraj A., Burgess J. R., Curtis J. L., Martinez F. J., Zick S., Hershenson M. B., Sajjan U. S. 2010. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. *Respiratory Research*. 11: 131.
- García, CM. Kim, P. Bich, NB. Tillan, NT. Romero, J. C. Dario, JA. y Fuste, V.M. 2009. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora Incarnata* L, *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14(2): 1-5.
- García, DE. Ojeda, F. y Montejo, I. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). I Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y Forrajes*. 26: 335.
- Kanegusuku, M., J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, R.A. Yunes, V. Cechinel-Filho, A. Azevedo-Maia, M.M. de Souza, F. Delle-Monache y R. Niero. 2002. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c:272-276.
- Galindo, WF. Rosales, M. Murgueitio, E. y Larrahondo, JE. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*. 1(1):1-6.
- Leos-Rivas. 2010. Estudio de la actividad biológica de los extractos de tres plantas de la familia Boraginaceae. (Tesis doctoral.) Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas, Nuevo León.
- López –Corona, MGB. 2013. Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus glacillor* Phipps Disertación tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Maldoni, B. 1991. Alkaloids: Isolation and purification. *Journal of Chemical Education*. 68(8):700-703.
- McLaughlin, J.L, Rogers L.L. y Anderson J.E.. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32:513-524.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. Y McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*. 45:31-34.
- Middleton E. Jr., Kandaswami C., y Theoharides T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cáncer. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 673-751.
- Molina-Salinas, G. M., y Said-Fernández, S. 2006. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology online*. 3: 633-638.
- Muñoz-Juárez, MA. 2011. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos de *Nicotiana glauca* Gram, *Nicotiana trigonophylla* Dunaly, *Solanum rostratum* Dunal. Disertación de tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Newman M. F. 2008. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 57. *SAPOTACEAE Juss. Royal Botanic Garden Edinburgh*. 57:1-20.
- Parra, L., A. Silva, R. y Guerra I, Iglesias. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice to determine acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 8(5):395-400.
- Pennington, T. D. (1990). *Flora neotropica. Monograph 52. Sapotaceae*. New York Botanical Garden for the Organization for Flora Neotropica. 52. 770 p.
- Reddy M. K., Gupta S.K., Jacob M. R., Khan S. I. Ferreira d. 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin- Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*. 73(5): 461.
- Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A., Abo-Zaid M. A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93(374): 43-54.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.
- Romero –Castillo, PA. Pérez, AB. Guevara FP. Muñoz, OV. Reyes, DA. Aguirre GF. Amaya CA. 2013. Actividad antiinflamatoria de *Ziziphus amole*. *Revista internacional de botánica experimental*. 82:75-80.
- Sánchez, Y.G., Rondón, L.A., Hermosilla, R.E. y Almeida, M.S. 2010. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de *Helychrysum bracteatum*. *Revista Química Viva*. 1: 40-45.
- Standley, P. & Williams, L. H. O. 1967. Sapotaceae. Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany* 24(3):211-244.
- Taiz, L. & Zeiger. E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Ed. pp. 792.
- Uphof, J. F. 1968. *Dictionary of economic plants*. 2 ed. Verlag von J. Cramer, Lehre. 601 p.
- Valencia-Ortiz C. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Editorial Trillas. México. pp. 77-80.
- Wollenweber, E., y Arriaga-Giner F. J. 1991. Fruit surface wax of *Mastichodendron capiri*. *Fitoterapia*. 62:361-362.