



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Determinación de los principios bioactivos, propiedades farmacológicas y
antioxidantes de tres extractos medicinales de *Echinacea* para su control de
calidad y estandarización**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental

PRESENTA

M. en B. E. Rayn Clarenc Aarland

Comité Tutorial:

Codirector: Dr. Fernando Rivera Cabrera
Codirector: Dr. José Alberto Mendoza Espinoza
Asesora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Ciudad de México, Diciembre 2016

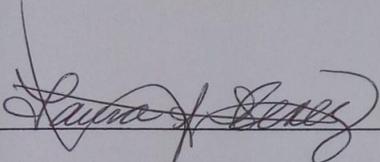
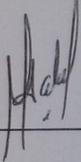
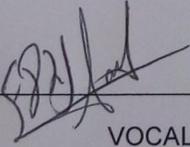
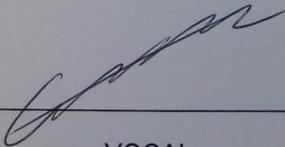
“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Durante el transcurso del Doctorado (periodo 2013-2016) en Biología Experimental en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACyT, con número de becario 248821.

Este proyecto se realizó en los laboratorios de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del departamento de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa y en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México-Plantel Casa Libertad.

Los miembros del jurado de examen, designado por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Determinación de los principios bioactivos, propiedades farmacológicas y antioxidantes de tres extractos medicinales de *Echinacea* para su control de calidad y estandarización**”, desarrollada por **Rayn Clarenc Aarland** quien realizó la disertación pública el 15 de diciembre del 2016, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

JURADO DE EXAMEN

 <hr/>	 <hr/>
PRESIDENTE	SECRETARIO
Dra. Laura Josefina Pérez Flores	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
Departamento de Ciencias de la Salud	Departamento de Farmacia
DCBS	Facultad de Química
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa	Universidad Nacional Autónoma de México
 <hr/>	 <hr/>
VOCAL	VOCAL
Dr. Fernando Díaz de León Sánchez	Dr. Angel Bañuelos Hernández
Departamento de Ciencias de la Salud	Departamento de Ciencias de la Salud
DCBS	DCBS
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa	Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

COMITÉ TUTORAL

Codirector:

Dr. Fernando Rivera Cabrera

Profesor Titular "C" Tiempo Completo.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

frc@xanum.uam.mx; ferivera2323@yahoo.com

Codirector:

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

Colegio de Ciencias y Humanidades

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Campus Casa Libertad

Josealberto.mendoza@uacm.edu.mx; amendozaespinoza@gmail.com.

Asesora:

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Profesor Titular "C" Tiempo Completo.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

ljpf@xanum.uam.mx; laujperetz@yahoo.com.mx

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mi alma mater la Universidad Autónoma Metropolitana por brindarme la oportunidad de seguir creciendo y desarrollándome como profesionista y también como persona.

Doy gracias a mi comité tutorial, el Dr. Fernando Rivera Cabrera, el Dr. José Alberto Mendoza Espinoza y la Dra. Laura Josefina Pérez Flores. Les estoy infinitamente agradecido por todas sus enseñanzas, por guiarme y por formarme. Esta tesis es de ustedes.

A los miembros del jurado Dra. Mabel Fragoso Serrano, Dr. Fernando Díaz de León Sánchez y Dr. Ángel Ernesto Bañuelos que aceptaron ser parte de este proyecto y aportar con sus valiosos comentarios.

A mis compañeros de laboratorio que son la razón de que el tiempo en el laboratorio pase más que rápido. Juan Manuel, Omar, Denise, Cristián, Darío, Faby, David, Oscar, Susana, Miriam, Michel, Jesús, Gaby, Tomás. Son banda.

Mi familia, mijn familie. Jullie zijn ver maar altijd in m'n hart. Hartelijk dank voor jullie steun. Mi lobi joe.

A todos que por falta de memoria, mas no de cariño no son mencionados.

Para Kyara, porque todo lo que hago es para que estemos mejor.

RESUMEN

Antecedentes: El género *Echinacea* pertenece a la familia Asteraceae y está compuesto de 9 especies de las cuales sólo *E. pallida*, *E. angustifolia* y *E. purpurea* emplean como plantas medicinales. Las ventas de los extractos medicinales en donde se emplean estas tres especies ascendieron a 21 millones de dólares en el 2002. Sin embargo, es importante aclarar que estos extractos son comercializados sin tener un control adecuado en el proceso de estandarización, definiendo estandarización no solo como la regulación fitosanitaria y agronómica sino incluyendo además variables que correlacionen el contenido químico con algún efecto biológico, disminuyendo con ello la variabilidad terapéutica la cual es el principal problema de los tratamientos herbales. Es por ello que en el presente trabajo se contempló como objetivo principal evaluar el contenido químico, capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hipoglucemiante y antiproliferativa de tres extractos hidroalcohólicos de *Echinacea*, con el fin de establecer las bases para su caracterización y a futuro de su estandarización. **Materiales y Métodos:** Se seleccionaron tres extractos de *Echinacea* que cumplen con la primera etapa de estandarización que corresponde a las normas de manufactura descritas por *United States Department of Agriculture* (USDA), en las que el principal requisito es la trazabilidad del producto y la garantía de origen. Los extractos seleccionados con esta condición fueron preparados por dos casas comerciales diferentes empleando distintos órganos o tejidos: extracto A (Echinacea®) el cual fue elaborado con raíces de *Echinacea purpurea*; extracto B (Super Echinacea®) elaborado con raíces, hojas,

flores y semillas de *E. purpurea* y el extracto C (Echinacea Supreme®) elaborado con raíces y partes aéreas de *E. purpurea* y raíces de *E. angustifolia*.

A los tres extractos seleccionados en el estudio, se les aplicó un protocolo de estandarización propuesto por el grupo de investigación y publicado en el 2014, que contempla tres etapas adicionales a las incluidas en las normas fitosanitarias y de producción agronómicas establecidas por USDA. Estas etapas fueron: 1) Análisis físico: Se determinó la densidad y cantidad de materia seca. 2) Análisis químico: Se realizaron ensayos cualitativos para determinar la presencia de algunos grupos fitoquímicos (taninos, saponinas, cumarinas, antraquinonas y alcaloides), así como la determinación de algunos constituyentes específicos relacionados con las propiedades funcionales como son fenólicos totales, flavonoides totales, ácido cafeico, ácido clorogénico, azúcares y alquilamidas. 3) Análisis biológico: Se determinó la capacidad antioxidante y antiproliferativa *in vitro*, así como el efecto antiinflamatorio, hipoglucemiante y de termotolerancia *in vivo*. Finalmente, se asoció la presencia de los compuestos químicos con algunos efectos biológicos. **Resultados:** El estudio mostró diferencias en los tres parámetros de estandarización. Se observó que tanto la cantidad de materia seca como la densidad fueron significativamente mayores en el extracto C. En la segunda etapa se encontró que el extracto A presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (975.5 mg EAG/gps) y flavonoides totales (6.8 mg EQ/gps), en base seca, tendencia que se modifica al analizarlo por mL de extracto hidroalcohólico, en que el extracto C mostró los valores más altos comparado con los otros dos extractos estudiados, lo cual es de suma importancia ya que este tipo de compuestos se dosifican por mL de

extracto. La presencia del ácido cafeico sólo se encontró en el extracto C (0.048 ppm). Del análisis de la fracción no polar del extracto hidroalcohólico se encontraron 11 alquilamidas para los extractos A y B, y 14 para el extracto C. En relación a la tercera etapa, la capacidad antioxidante fue mayor en el extracto C cuando se determinó por el método de DPPH (19.97 mM/ gps; 4.77 mM/ mL extracto) y cuando se determinó por ABTS, la capacidad antioxidante fue mayor en el extracto A (70.09 mM/ gps); sin embargo, la tendencia cambió cuando se expresó por mL de extracto, en que se observó la mayor capacidad antioxidante en el extracto C (10.45 mM/mL extracto). Se observó también efecto antiinflamatorio para el extracto B, efecto antiproliferativo para el extracto C y efecto hipoglucemiante para los extractos A y C. **Discusión.** Se pueden observar ciertas tendencias que nos permiten asociar algunos componentes químicos con los efectos biológicos, tales como mayores cantidades de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales para el extracto C expresado por mL de extracto, esto se puede asociar con lo observado en la determinación de capacidad antioxidantes por los métodos de DPPH y ABTS en los que el extracto C mostró la mayor capacidad antioxidante. Aunque la cantidad de fenoles totales fue abundante, la cantidad de ácido cafeico fue muy baja, quedando la incógnita de qué tipo de compuestos polifenólicos están presentes en el extracto. Por otra parte, en el extracto C se encontró el mayor número de alquilamidas, lo cual podría asociarse al efecto antiproliferativo observado en este extracto. Tres de estas alquilamidas sólo se observaron en el extracto C que es el único que contiene *E. angustifolia* lo que podría indicar que pueden ser utilizadas como marcadores de especie. El efecto antiinflamatorio que se observó para el extracto B se podría correlacionar con la

presencia de saponinas existiendo evidencia en la literatura de compuestos de este tipo asociados a procesos antiinflamatorios, aunque es importante mencionar que las saponinas son un grupo muy diverso lo cual sería interesante evaluar este grupo de compuestos de manera específica iniciando por parte aéreas donde observó la mayor cantidad y centrándonos en terpenoides que dentro de las saponinas son los que se asocian frecuentemente a este tipo de efecto farmacológico. **Conclusiones.** Se observaron diferencias en los parámetros físicos, químicos y biológicos en los tres extractos evaluados, mostrando la necesidad de plantear estrategias de estandarización llevando a cabo estudios que establezcan una correlación de una manera más fina y que permitan concluir la propuesta de asociación planteada en este estudio, avanzando con ello en el uso adecuado de los medicamentos herbales generando datos de composición química y efecto biológico, datos que se deben sumar a los protocolos actuales que se basan en su mayoría en garantizar la inocuidad e identidad del producto.

ABSTRACT

Background: The *Echinacea* genus belongs to the Asteraceae family and is composed of 9 species, of which *E. pallida*, *E. angustifolia* and *E. purpurea* are used as medicinal plants. Sales of medicinal extracts derived from these three *Echinacea* species reached 21 million dollars in 2002, however, it is important to mention that these extracts are being commercialized without adequate control over the standardization process, defining standardization not only as phytosanitary and agronomic regulation but also including variables that correlate the chemical content with some biological effect, decreasing the therapeutic variability, which is the main problem with herbal treatments. Because of all the above, the principal objective of the present work was to evaluate the chemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic and antiproliferative capacities of three hydro-alcoholic *Echinacea* extracts in order to establish the bases for their characterization and the future of their standardization. Materials and methods: Three *Echinacea* extracts were selected. These extracts meet the first step of the standardization process which implies the manufacturing standards described by the United States Department of Agriculture (USDA), where the main requirement is the traceability of the product and the guarantee of origin. The selected extracts were prepared by two different manufacturers using different organs or tissues. Extract A (Echinacea®) was prepared with roots of *E. purpurea*, extract B (Super Echinacea®) was prepared with roots, leaves, flowers and seeds of *E. purpurea* and extract C (Echinacea Supreme®) was prepared with roots and aerial parts of *E. purpurea* and roots of *E. angustifolia*.

The three selected extracts were applied a standardization protocol as proposed by our investigation group and published in 2014, which takes into account three phases subsequent to those included in the post phytosanitary and agronomic production standards established by USDA. These steps were 1) Physical analyses; density and dry matter were assessed. 2) Chemical analyses; some qualitative tests were performed to determine the presence of some functional groups (tannins, saponins, coumarins, anthraquinones and alkaloids), as well as some specific constituents related to functional properties like total phenols, flavonoids, caffeic and chlorogenic acid, sugars and alkylamides. 3) Biological analyses; antioxidant and antiproliferative capacities were measured *in vitro* and the anti-inflammatory, hypoglycaemic and thermotolerance effects were measured *in vivo*. Finally, some associations were made between the chemical compounds and the biological measurements. Results: this study showed differences between the three stages of standardization, highlighting some observations that were considered relevant. At first, we observed that both the dry matter and the density were significantly higher in extract C. In the second stage we found that extract A presented higher amounts of total phenols (975.5 mg GAE/gdw) and total flavonoids (6.8 mg QE/ gdw) when expressed in terms of dry weight, a tendency that is modified when the results are expressed as mL of each *Echinacea* extract. In this case extract C presented higher amounts of phenols and flavonoids compared to the other extracts, which is very important because these types of compounds are dosed with mL of extract. Caffeic acid was only detected in extract C (0.048 ppm) and by analysis of the non-polar fraction of the hydro-alcoholic extracts, 11 alkylamides were determined for extracts A and B and 14 for extract C. In

the third stage, extract C showed higher antioxidant capacity when determined by DPPH (19.97 mM TEAC/ gdw; 4.77 mM TEAC/ mL extract) and when determined by ABTS, extract A showed higher antioxidant capacity (70.09 mM TEAC/ gdw), however, when expressed as mL of extract, extract C showed a higher antioxidant capacity (10.45 mM TEAC/ mL extract). Only extract B showed anti-inflammatory activity, extract C showed antiproliferative capacity, extracts A and C showed hyperglycaemic capacity. Discussion: Certain tendencies can be observed that allow us to relate some of the chemical compounds with a biological effect. Extract C showed higher contents of phenols and flavonoids which can be related to higher antioxidant capacity by both DPPH and ABTS. Even when the content of total phenolic compounds was observed to be high, a very low content of caffeic acid was observed, leaving unknown which types of phenolic compounds are present. Extract C also showed a higher number of alkylamides which could be associated to its antiproliferative effect shown only in this extract. Three of these alkylamides were only observed in extract C which is the only one that contains *E. angustifolia*, which could indicate that they may be used as possible species markers. The anti-inflammatory effect observed in extract B could be related to the presence of saponins observed in the qualitative analyses. There is evidence in related literature that these types of compounds are related to anti-inflammatory processes, even though it is important to note that saponins are a very diverse group and for this reason it would be interesting to study them in more detail, starting with the aerial parts of *Echinacea* which is what extract B is made of and focusing on terpenoids, because within the group of saponins, terpenoids are frequently associated with this

kind of pharmacological effect. Conclusions: We observed differences in the physical, chemical and biological parameters showing the need to plan standardization strategies, carry out correlation studies in finer detail that allow us to conclude the proposed association raised in this study, advance the adequate use of herbal medicine and generate chemical content data related to biological effects. These data need to be added to the current protocols, which are mostly based on ensuring the safety and identity of the product.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE	DE
TABLAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 Regulación de fitofármacos.....	3
1.2 El proceso de estandarización para el desarrollo de fitofármacos	5
1.3 Métodos de estandarización	6
1.4 Problemas asociados al proceso de la estandarización.....	7
1.5 Las plantas medicinales, aspectos generales	9
1.5.1 Las plantas medicinales en México	11
1.6 <i>Echinacea</i> como modelo de estudio	12
2. Justificación	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos particulares.....	15
4. Hipótesis	15
5. Materiales y Métodos.....	16
5.1 Diseño del estudio.....	16
5.2 Selección del material biológico	16
5.3 Primera etapa- Parámetros físicos.....	17
5.3.1 Determinación de la cantidad de materia seca	17

5.3.2	Determinación de la densidad.....	18
5.3.3	Obtención de los espectros de UV/Visible	18
5.4	Segunda etapa- Parámetros químicos.....	18
5.4.1	Parámetros cualitativos.....	18
5.4.1.1	Determinación de presencia de alcaloides	19
5.4.1.2	Detección de taninos	19
5.4.1.3	Detección de saponinas.....	19
5.4.1.4	Determinación de la presencia de antraquinonas	20
5.4.1.5	Determinación de cumarinas	20
5.4.2	Parámetros cuantitativos	20
5.4.2.1	Determinación de compuestos fenólicos totales	20
5.4.2.2	Determinación de flavonoides totales	21
5.4.2.3	Determinación de polifenoles mediante HPLC.....	21
5.4.2.4	Determinación de azúcares	22
5.4.2.5	Determinación de alquilamidas.....	23
5.5	Tercera etapa- Parámetros biológicos	23
5.5.1	Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	23
5.5.2	Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	24
5.5.3	Determinación de la actividad hipoglucemiante <i>in vivo</i>	24
5.5.4	Determinación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i>	25
5.5.5	Determinación del efecto termoprotector en <i>C.elegans</i>	26
5.6	Análisis estadístico.....	27
6.	Resultados y Discusión	28
6.1	Selección de los extractos.....	28

6.2 Etapa 1. Análisis físico	28
6.2.1 Determinación de la densidad y cantidad de materia seca	28
6.2.2 Espectros de UV/Vis de los extractos de <i>Echinacea</i>	29
6.3 Etapa 2. Análisis químico	30
6.3.1 Parámetros cualitativos.....	30
6.3.2 Parámetros cuantitativos	31
6.3.2.1 Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales.....	31
6.3.2.2 Polifenoles mediante HPLC	33
6.3.2.3 Azúcares.....	34
6.3.2.4 Alquilamidas.....	34
6.4 Etapa 3. Análisis biológico	37
6.4.1 Capacidad antioxidante	37
6.4.2 Actividad antiinflamatoria	39
6.4.3 Actividad hipoglucemiante	40
6.4.4 Actividad antiproliferativa	41
6.4.5 Efecto termoprotector	42
7. Conclusiones.....	44
8. Perspectivas.....	46
9. Referencias	47
10. Anexo	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Investigaciones científicas llevadas a cabo en especies pertenecientes al género <i>Echinacea</i>	13
Tabla 2.	Diseño experimental	17
Tabla 3.	Gradiente de elución para la determinación de polifenoles	22
Tabla 4.	Análisis físico de los extractos de <i>Echinacea</i>	29
Tabla 5.	Grupos fitoquímicos determinados en los extractos de <i>Echinacea</i>	30
Tabla 6.	Compuestos polifenoles presentes en los extractos de <i>Echinacea</i>	33
Tabla 7.	Azúcares presentes en los extractos de <i>Echinacea</i>	34
Tabla 8.	Nombres y tiempos de retención de las alquilamidas presentes en los tres extractos de <i>Echinacea</i>	36
Tabla 9.	Efecto hipoglucemiante en los extractos de <i>Echinacea</i>	41
Tabla 10.	Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>Echinacea</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Parámetros a tomar en cuenta para llegar a la estandarización de fitomedicamentos	9
Figura 2.	Extractos comerciales de <i>Echinacea</i> , utilizados en este estudio	28
Figura 3.	Espectros de UV/Vis de los tres extractos comerciales de <i>Echinacea</i>	30
Figura 4.	Contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos de <i>Echinacea</i>	32
Figura 5.	Contenido de flavonoides totales en los extractos de <i>Echinacea</i>	32
Figura 6.	Cromatograma de ion total de la fracción no polar de los extractos de <i>Echinacea</i>	35
Figura 7.	Capacidad antioxidante ante DPPH	38
Figura 8.	Capacidad antioxidante ante ABTS	40
Figura 9.	Efecto antiinflamatorio de los extractos de <i>Echinacea</i> en el modelo edema plantar	42
Figura 10.	Efecto termoprotector de los extractos de <i>Echinacea</i> en <i>C. elegans</i> .	45

Introducción

El hombre siempre ha mantenido una estrecha relación con las plantas, con el fin de cubrir sus necesidades básicas tales como alimentarse, cuidar su salud y protegerse. Resultado de esta interacción hombre-planta-enfermedad nace la medicina indígena o medicina tradicional (Koehn y Carter, 2005; Jones y colaboradores, 2006). Hoy en día, el término medicina indígena o medicina tradicional ha evolucionado y organismos como la Organización Mundial de la Salud manejan Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) en que incorporan la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales (OMS, 2013).

Este empleo empírico de las plantas medicinales para tratar de mejorar las condiciones de salud ha sobrevivido al paso del tiempo e incluso algunas de ellas en la actualidad son empleadas sin regulación fitosanitaria ni sustento científico que valide su acción farmacológica. Estos tratamientos basados en plantas medicinales se pueden encontrar en los diferentes mercados del mundo en distintas presentaciones que van desde plantas enteras o molidas hasta formulaciones como cápsulas, infusiones, tinturas etc. Es importante mencionar que muchos de estos tratamientos no son reconocidos por la medicina alópata oficial, sin embargo, la industria farmacéutica ha aprovechado el uso de principios activos aislados de plantas para el desarrollo de muchos de los medicamentos empleados en clínica

generando una industria muy próspera (Cragg y colaboradores, 1997; Kinghorn, 2002).

A pesar de no haber contado con reconocimiento oficial ni validez científica, en las últimas décadas el interés sobre el uso de las plantas con propiedades terapéuticas ha venido en aumento (Brevoort, 1996; Blumenthal, 1999), esto se confirma con el incremento en el número de anuncios comerciales en la televisión donde se ofrecen productos herbolarios que no cuentan con garantía médica alguna y con un volumen de ventas que ascendió a más de 21 millones de dólares solo en el 2002 en Estados Unidos de América. En este contexto, México no ha sido la excepción y se puede observar la venta de un gran número de plantas medicinales en los mercados de Sonora y Jamaica ubicados en la Ciudad de México.

Es importante mencionar que el consumo no controlado de este tipo de productos con base en plantas medicinales puede causar daños a la salud por diversos motivos. Entre los casos más documentados destacan la mala dosificación de dichos productos, la confusión de especies, las interacciones entre productos herbolarios *versus* medicamentos alópatas, así como el caso en que los pacientes cambian sus medicamentos alópatas por productos herbolarios, empeorando con ello su estado de salud.

Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo se basa en la búsqueda de alternativas y estrategias que permitan el control y la estandarización de este tipo de productos medicinales que actualmente están siendo empleados sin un sustento basado en el rigor científico.

1. Antecedentes

1.1 Regulación de fitofármacos

La palabra fitofármaco se puede dividir en “fito” que viene del griego y significa planta o vegetal y “pharmakon” (también del griego) que significa remedio. Por lo tanto, los fitofármacos son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, así como ingredientes o preparaciones obtenidas a partir de plantas. En general, la mayoría de este tipo de productos son prescritos y comercializados como el resultado de mucha experiencia acumulada en la práctica de la medicina tradicional durante cientos de años (Kamboj, 2000; Yadav y Dixit, 2008). Sin embargo, en muchos casos no se sabe cuál es el ingrediente activo, responsable de la actividad terapéutica del fitomedicamento o fitofármaco (Akerlele, 1993; OMS, 1993, 1998; Calixto, 2000).

De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un fitomedicamento debe contener material vegetal como principio activo en estado crudo o procesado, pero también pueden contener solventes orgánicos o acuosos como excipientes o conservadores.

La OMS ha adaptado algunos términos en relación a la medicina herbolaria y entre los más importantes destacan los siguientes.

Hierba: material vegetal, así como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, raíces, rizomas u otra parte de la planta que puede ser entera, fragmentada o pulverizada.

Material herbolario: incluye jugos frescos, resinas, aceites fijos y esenciales, gomas y polvos secos.

Preparaciones herbolarias: son la base para los productos herbolarios finales y pueden incluir material herbolario triturado o pulverizado o sus extractos, tinturas y/o aceites. Son producidas por procesos físicos como extracción, fragmentación, purificación, concentración entre otros. También incluyen preparaciones hechas remojando o calentando material herbolario en alcohol, miel u otra sustancia (OMS, 2000).

Con respecto al consumo de productos herbolarios, actualmente algunos países como China, Alemania, India y África han introducido a su sistema de salud algunos tratamientos empleados en la medicina tradicional regional y los han exportado a otras regiones del mundo, algunos de los ejemplos más importantes son: ginseng (*Panax ginseng*), árbol de moringa (*Moringa oleifera*), valeriana (*Valeriana officinalis*), manzanilla (*Matricaria recutita*), plántago (*Plantago psyllium*), entre otros. Sin embargo, es importante mencionar que algunos de estos productos no cuentan con las garantías de producción y proceso de manufactura adecuadas, por la falta de normas y tratados de producción internacionales (Prieto, 2007). Aunque es importante mencionar que existen ciertas guías regulatorias para fitomedicamentos a nivel regional y sub regional. Sin embargo, hay una gran variación en las políticas regulatorias entre las diferentes regiones y países. En este sentido, en 1975 la OMS reconoció el valor de la medicina tradicional tanto de salud como de biodiversidad y ha financiado grupos de investigación, proyectos para estudiar y regular su uso (OMS, 2001, 2005), monografías para control de calidad (OMS, 1992, 1998), buenas prácticas agrícolas (OMS, 2003), buenas prácticas de manufactura y normatividad para garantizar la seguridad de productos herbolarios (OMS, 1993, 2004a) y

estrategias para su uso correcto dentro del sistema de salud primario (OMS, 2004b; Zhang, 2006; Prieto, 2007). Sin embargo, aún hace falta el desarrollo de regulaciones internacionales para garantizar la elaboración de fitofármacos basándose en la inocuidad y estandarización química del producto final siendo esto último el aporte principal de este proyecto de tesis.

1.2 El proceso de estandarización para el desarrollo de fitofármacos

La estandarización es un sistema que permite asegurar que cada caja de medicina que se venda, tenga la cantidad de principio activo adecuada para inducir un efecto terapéutico (Chaudhury, 1999). En otras palabras, este sistema debe asegurar en cada dosis los ingredientes con cantidad, calidad y que produzcan el efecto terapéutico (Zafar y colaboradores, 2005). Además, la estandarización debería involucrar la compilación de información completa de las plantas usadas, tales como la época de cosecha, el estado de maduración, el sabor, el olor, la apariencia, el método de secado, el almacenamiento, el procesamiento y los espectros de UV/Vis (Willard, 1996; Garg y colaboradores, 2012). Los fitofármacos no pueden ser tomados en cuenta científicamente si no han sido autenticados y caracterizados con el fin de asegurar la reproducibilidad en la fabricación del producto (Vaidya y Devasagayam, 2007). En 1992 la OMS definió a la estandarización y control de calidad como el proceso involucrado en la evaluación fisicoquímica de los productos herbolarios tales como la selección y manipulación del material crudo, la seguridad, la eficacia y evaluación de la estabilidad del producto final, la documentación de seguridad y riesgos con base en la experiencia, el suministro de información sobre

los productos a los consumidores y la promoción de ellos. Además, algunos autores sugieren que la estandarización debe comprender todo el proceso de manufactura que se puede dividir en dos etapas, la primera que va desde la germinación de las semillas hasta la cosecha de las plantas y la segunda parte desde la elaboración del fitofármaco hasta su uso clínico (Yadav y Dixit, 2008; Aarland y colaboradores, 2014).

Es importante resaltar que la actividad terapéutica de un fitomedicamento depende de sus constituyentes fitoquímicos. Por ello, el desarrollo de métodos analíticos para la obtención del perfil de composición química (fingerprints/ huellas digitales), que incluye el análisis cuantitativo de compuestos bioactivos marcadores y otros constituyentes importantes, representa uno de los mayores retos para los científicos ya que este perfil está ligado a la época de corte de la planta o de parte de la planta y a factores epigenéticos que se afectan por las condiciones ambientales del cultivo y que pueden cambiar el contenido de los metabolitos presentes. Así, la estandarización es un paso importante para establecer perfiles químicos y actividad biológica consistentes y fijar parámetros de corte y manejo del material biológico (Patra y colaboradores, 2010; Kunle y colaboradores, 2012; Aarland y colaboradores, 2014).

1.3 Métodos de estandarización

La OMS destaca la importancia de los métodos cualitativos y cuantitativos para la caracterización de muestras, cuantificación de biomarcadores, marcadores químicos

y los espectros de UV/Vis (OMS, 1996a, b). En este sentido, Yadav y Dixit (2008) mencionan que si se conoce cuál es el principio activo presente en el fitomedicamento, es lógico cuantificar ese compuesto en las muestras.

Los métodos de estandarización deben tomar en cuenta todos los aspectos que contribuyen a la calidad del fitofármaco y garantizan la identidad correcta de la muestra, evaluación sensorial, evaluación farmacognóstica, material volátil, evaluación cuantitativa del compuesto químico principal, evaluación fitoquímica, así como pruebas para determinar la presencia de xenobióticos, carga microbiana, toxicidad y actividad biológica. De todos estos aspectos, el perfil fitoquímico es de especial importancia ya que tiene una influencia directa sobre la actividad terapéutica de los fitofármacos. Los espectros de UV/Vis sirven como guía para el perfil fitoquímico del fármaco para garantizar su inocuidad y que permiten identificar y cuantificar material biológico contaminante perteneciente a otras especies, además de la cuantificación de los compuestos marcadores de la especie, esto puede aprovecharse como un parámetro adicional para la evaluación de la calidad terapéutica de la muestra, si se tienen datos de correlación entre los marcadores químicos y la actividad biológica (Calixto, 2000; Nikam y colaboradores, 2012).

1.4 Problemas asociados al proceso de la estandarización

El principal problema que afrontan los sistemas de regulación de medicamentos herbales es sin duda la estandarización en el desarrollo de fitofármacos, por lo cual en el presente trabajo se pretende abordar este problema desde la caracterización física, química y biológica, con el objetivo de fijar parámetros de control más

adecuados y específicos que nos aporten información acerca la composición del tejido vegetal (tallos, raíz o la planta completa) o componentes vegetales (secreciones, látex etc.) usados para la elaboración de los fitomedicamentos, debido a que el tejido empleado está directamente relacionado con los metabolitos presentes en la formulación y en consecuencia con el efecto farmacológico (Zhang, 2006).

Es por ello que en general, la actividad terapéutica es el resultado de la combinación de varios componentes activos productos de una o varias especies vegetales, formando así una mezcla compleja que es difícil de estudiar empleando solo los métodos analíticos convencionales centrados en medir impurezas relacionadas con metales pesados e inocuidad.

En las mezclas complejas, aunque muchos de los constituyentes sean inertes de manera directa en el mecanismo de acción terapéutico, es razonable pensar que puedan tener un efecto sinérgico en la actividad, influenciar la biodisponibilidad y/o excreción del componente activo (Kunle y colaboradores, 2012). En este tenor se planteó un proceso de estandarización basado en el análisis de tres etapas importantes en el proceso de caracterización, una etapa física donde se evalúen algunos parámetros de densidad y materia seca, una etapa química que tiene como objetivo explorar la presencia de algunos constituyentes y finalmente una etapa de evaluación de la actividad en algunos modelos biológicos, esto nos permitirá tener una idea clara de los principales constituyentes así como relacionar algunos compuestos químicos con el efecto biológico (figura 1) (Aarland y colaboradores, 2014).

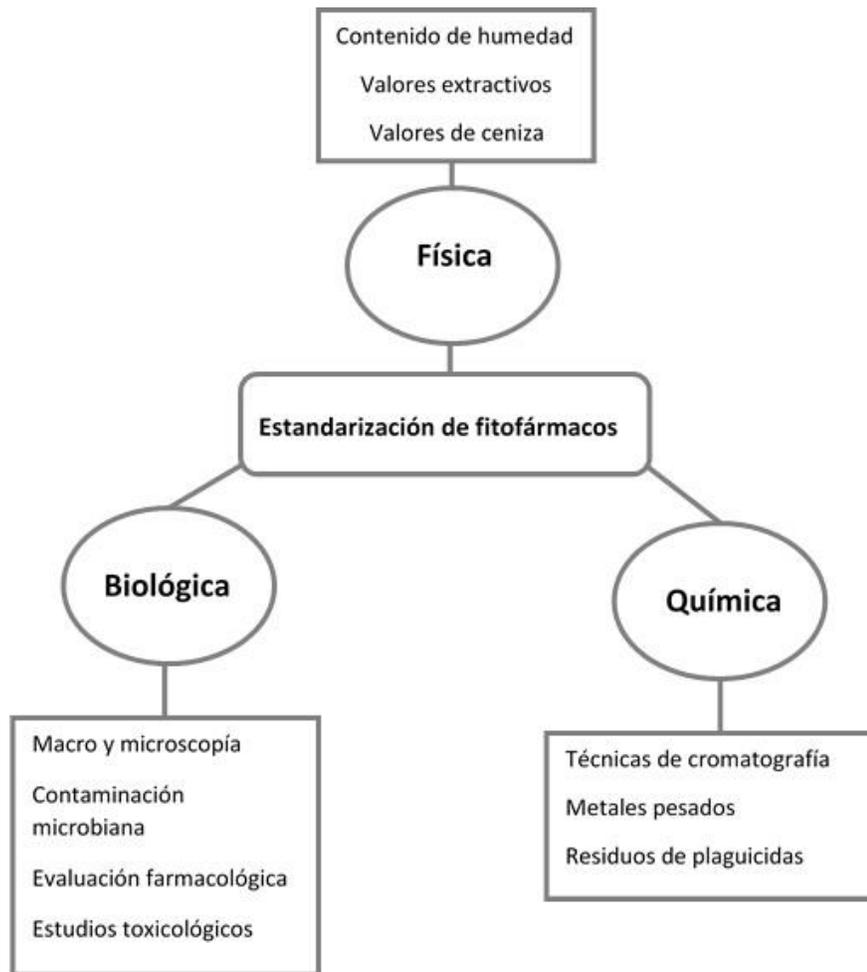


Figura 1. Parámetros a tomar en cuenta para llegar a la estandarización de fitomedicamentos (Aarland y colaboradores, 2014).

1.5 Las plantas medicinales, aspectos generales

Diversas fuentes antropológicas han demostrado que el hombre, a lo largo de su historia y con el objetivo de cubrir sus necesidades básicas como son la vivienda, alimentación y salud, ha mantenido una estrecha relación con las plantas.

Un buen ejemplo de ello es el Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis, escrito por

Martín de la Cruz y traducido por Juan Badiano en 1552 (Koehn y Carter, 2005; Jones y colaboradores, 2006). De esta importante y estrecha relación surge la medicina tradicional, concepto empleado por la OMS para referirse a las diversas formas de medicina indígena como son la china, hindú (ayurveda), árabe (unani), etc. (Almaguer y Mas, 2009).

Mundialmente, la medicina tradicional tiene un papel importante en el sector salud, debido al aumento de costos de la medicina alópata y a la falta de tratamientos en algunas de las enfermedades crónicas degenerativas, algunos ejemplos importantes son el caso de: África, donde cerca del 80% de la población hace uso de la medicina tradicional, por ser más accesible comparada con la medicina alópata, y los casos de Asia y de Latinoamérica, donde las poblaciones siguen utilizando este tipo de medicina como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. Un caso excepcional es China, donde se contabiliza alrededor de un 40% de personas que usan este tipo de medicina, pero a excepción de los otros ejemplos, en este caso la medicina tradicional se encuentra dentro de su marco regulatorio de salud (Zhang, 2002). Es gracias al caso de China, que la OMS ha puesto atención al éxito obtenido en el empleo de tratamientos herbolarios dentro de un marco regulatorio general y planteado con ello algunas estrategias a los países miembros, con el objetivo de incorporar las prácticas de medicina tradicional a los sistemas de salud, siendo para ello, una de las claves primordiales el proceso de obtención y estandarización de los medicamentos herbales (Mendoza-Espinoza, 2009).

1.5.1 Las plantas medicinales en México

En la actualidad, en México el consumo de plantas con actividad farmacológica ha crecido de forma logarítmica; desafortunadamente, este crecimiento no va a la par con el desarrollo de metodologías científicas que validen y estandaricen su uso, causando con ello problemas en la salud de quienes las utilizan.

En el marco regulatorio en México, no existe una regulación clara en el tema de fitofármacos por lo que el desarrollo de este tipo de productos no ha prosperado de manera importante, a la fecha el QG5® (Genomma Lab) es el único reconocido como fitofármaco, mientras tenemos una enorme gama de compuestos herbales tratados como suplementos alimenticios, todos ellos carentes de validación científica (Kunle y colaboradores, 2012).

Es por ello que en la actualidad México, al ser parte de los países miembros de la OMS, tiene que avanzar en la inclusión de las medicinas complementarias en el Sistema de Salud en México, para ello deberá de proponer mecanismos de validación donde participen diversos grupos y sin duda el proceso de estandarización de los fitomedicamentos será una variable importante. En el presente trabajo se abordan algunos procesos que deberían de seguir los medicamentos empleados actualmente como remedios herbolarios, para ello se tomó como ejemplo a *Echinacea* por ser una de las plantas más empleadas a nivel mundial, por sus efectos atribuidos como modulador del sistema inmune (Almaguer y Mas, 2009).

1.6 *Echinacea* como modelo de estudio

La *Echinacea* es un género de plantas de las cuales existen 9 especies, pero sólo *E. purpurea*, *E. angustifolia* y *E. pallida* son utilizadas como plantas medicinales. Históricamente, *E. purpurea* fue una de las plantas más utilizadas por los nativos de Norteamérica para tratar una gran variedad de condiciones como heridas, piquetes de insectos, infecciones, dolores y también como antídoto para mordeduras de serpientes ponzoñosas. Al principio del siglo XX, *Echinacea* fue establecida como el remedio principal para resfriados y gripe en la medicina europea gracias a su actividad como modulador del sistema inmune, propiedad que se expandió a todos los continentes y hacen de *Echinacea* la especie vegetal más consumida mundialmente por sus propiedades medicinales (Blumenthal, 2002).

Generalmente, la forma en la que se consumen las plantas de *Echinacea* es como jugo o extractos alcohólicos de las partes aéreas o de las raíces. Se ha sugerido que los metabolitos responsables de la actividad curativa de esta planta son derivados del ácido cafeico, alquilamidas y polisacáridos (Bauer, 1998; Barnes y colaboradores, 2005). En la Tabla 1 se muestran algunos estudios científicos realizados con *Echinacea*, sin embargo, en ninguno de ellos se realiza una correlación entre las alquilamidas presentes o algún otro compuesto químico con la actividad farmacológica. No pudiéndose asociar a la fecha un efecto biológico a un patrón o perfil químico, siendo un reto actual en la estandarización de este material biológico (Chicca y colaboradores, 2007).

Tabla 1. Investigaciones científicas llevadas a cabo en especies pertenecientes al género *Echinacea*

Estudio (Autor)	Breve síntesis
Determinación compuestos fenólicos (Brown y colaboradores, 2011)	Mediante HPLC-UV se cuantificaron varios compuestos fenólicos (los ácidos caftarico, clorogénico y chicórico, cinarina y equinacósido), en extractos de material fresco y seco y en tinturas líquidas
Efecto sobre mielopoyesis en ratas (Ramayahayam y colaboradores, 2011)	Se utilizaron extractos comerciales de dos especies de <i>Echinacea</i> para evaluar el efecto mielopoyético en médula ósea en ratas.
Efecto de virus en la producción de metabolitos secundarios de <i>Echinacea</i> (Pellati y colaboradores, 2011)	Se evaluó el efecto de los virus e infecciones del fitoplasma en la producción de metabolitos secundarios de <i>E. purpurea</i> .
Análisis de alquilamidas, comparación extracto crudo con suplemento comercial (Mudge y colaboradores, 2011)	Se realizó la identificación de diferentes alquilamidas en raíces de <i>E. angustifolia</i> y <i>E. purpurea</i> y en suplementos alimenticios comerciales.
Comparación alquilamidas en muestra seca y en fresco (Spelman y colaboradores, 2009)	Se obtuvo un perfil de alquilamidas presentes en raíces de <i>E. purpurea</i> y lo compararon con el perfil de extractos etanólicos comerciales.
Efecto de un extracto de <i>Echinacea</i> sobre hiperplasia de la próstata (Skaudickas y colaboradores, 2009)	Se evaluó el efecto de <i>E. purpurea</i> en próstatas con hiperplasia benigna en ratones.
Efecto citotóxico de extractos de <i>Echinacea</i> en células cancerosas (Chicca y colaboradores, 2007)	Se evaluó el efecto citotóxico y las propiedades pro apoptóticas de extractos etanólicos de raíces de <i>E. pallida</i> , <i>E. angustifolia</i> y <i>E. purpurea</i> en líneas celulares humanas de cáncer de páncreas.

2. Justificación

En la actualidad, la producción de fitomedicamentos y su comercialización en el mundo se lleva a cabo sin tener un control adecuado del proceso de estandarización. Los protocolos actuales que se aplican se basan en su mayoría en garantizar la inocuidad e identidad del producto comercializado.

Sin embargo, es importante incluir además de estas variables, aquellas que correlacionen el contenido químico con algún efecto biológico y que garanticen el uso terapéutico asociado al producto herbal.

Es por eso que, en el presente trabajo se aplicó el protocolo de estandarización en tres etapas (discutido anteriormente) a 3 extractos comerciales de *Echinacea*.

Los extractos utilizados cuentan con la certificación del Programa Nacional Orgánico (NOP, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) que garantizan la identidad, la homogeneidad en la producción agrícola del material utilizado y en la manufactura de los extractos (inocuidad), además de incluir su origen, pero carecen de información que permita relacionar el patrón químico con sus propiedades biológicas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el contenido químico, capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hipoglucemiante y antiproliferativa de tres extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea*, con el fin de establecer las bases de su caracterización.

3.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar el contenido de principios activos (flavonoides y fenólicos totales, ácido cafeico y alquilamidas) de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea*.
2. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea*.
3. Determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* (ratas Wistar) de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea*.
4. Determinar el efecto de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea* sobre la glucemia en ratas Wistar.
5. Determinar la actividad antiproliferativa de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea* en líneas celulares.
6. Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea* sobre la termotolerancia en *C. elegans*.

4. Hipótesis

La evaluación farmacológica de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea* y la cuantificación de sus principios activos permitirá la caracterización de estos extractos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Diseño del estudio

El estudio se planteó iniciando la selección de los extractos para posteriormente analizarlos en 3 etapas principales como se observa en la Tabla 2 y se describe a continuación. Finalmente, se asociaron estos resultados para establecer las posibles correlaciones.

5.2 Selección del material biológico

Se trabajaron con tres extractos hidroalcohólicos preparados con *Echinacea*. Para poder elegir estos extractos se realizó una búsqueda en el mercado internacional de los extractos que se comercializan, tomando en cuenta que contaran con información sobre la especie de *Echinacea* utilizada para su elaboración. Además, se eligieron extractos que contaran con una certificación de fabricación para garantizar la autenticidad del producto.

Tabla 2. Diseño experimental

Parámetros físicos		
	Materia seca	
	Densidad	
	Perfil químico	
Parámetros químicos	Análisis cualitativos	Saponinas
		Cumarinas
		Antraquinonas
		Taninos
		Alcaloides
	Análisis cuantitativos	Fenoles totales
		Flavonoides totales
		Polifenoles (HPLC)
		Azúcares
		Alquilamidas
Parámetros biológicos	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	DPPH
		ABTS ⁺
	Efecto antiinflamatorio <i>in vivo</i>	Ratas Wistar
	Efecto hipoglucemiante <i>in vivo</i>	Ratas Wistar
	Efecto antiproliferativo <i>in vitro</i>	MCF-7, HeLa, HCT-15
	Efecto termoprotector	<i>C. elegans</i> var. Bristol

5.3 Primera etapa- Parámetros físicos

5.3.1 Determinación de la cantidad de materia seca

La cantidad de materia seca se calculó mediante gravimetría. Se tomaron 10 mL de los extractos utilizados y se llevaron a sequedad, bajo condiciones de esterilidad en una

estufa hasta alcanzar un peso constante. La materia seca se expresó como gramos del producto seco entre mililitros del extracto hidroalcohólico.

5.3.2 Determinación de la densidad

Se calculó la densidad de cada uno de los extractos utilizando un picnómetro. Primero, se pesó el picnómetro vacío. Posteriormente, se llenó con agua destilada y se volvió a pesar. Finalmente, se llenó el picnómetro con cada uno de los extractos de *Echinacea* y se volvió a pesar. Se calculó la densidad empleando la fórmula

$$\rho_{(\text{extracto})} = [\text{Peso}_{(\text{picnómetro+extracto})} - \text{Peso}_{(\text{picnómetro})}] / [\text{Peso}_{(\text{picnómetro+agua})} - \text{Peso}_{(\text{picnómetro})}] [\rho_{(\text{agua})}].$$

Asimismo, para estandarizar las técnicas se analizaron 10 plantas empleadas en el tratamiento de la diabetes, obtenidas en el Mercado de Sonora (Aarland y colaboradores, 2015).

5.3.3 Obtención de los espectros de UV/Visible

Se obtuvieron los espectros de absorción UV/Visible de los tres extractos de *Echinacea* en un rango de 190-1000 nm con un espectrofotómetro Jenway 6705. Como blanco se utilizó etanol 96% (v/v).

5.4 Segunda etapa- Parámetros químicos

5.4.1 Parámetros cualitativos

La finalidad de realizar ensayos cualitativos fue evaluar los grupos químicos de metabolitos secundarios responsables de la mayoría de las propiedades farmacológica de las plantas. Así, se evaluaron la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, antraquinonas y cumarinas. Estas determinaciones se realizaron de acuerdo a las técnicas

descritas por Coolborn y Bolatito (2010) y adaptadas por Peralta-Gómez y colaboradores (2013).

5.4.1.1 Determinación de presencia de alcaloides

Para determinar la presencia de alcaloides en los extractos de *Echinacea*, se separaron los extractos mediante cromatografía en capa fina. Se cortaron placas de sílica gel con medidas de 3 x 5 cm, se colocó el extracto y se eluyó con un sistema de solventes cloroformo: metanol (95:5 v/v), después se reveló con reactivo de Dragendorff y posteriormente se observó bajo luz ultravioleta (UV). La coloración roja-marrón indicó la presencia de alcaloides.

5.4.1.2 Detección de taninos

Se evaporaron 5 mL de los extractos hidroalcohólicos a sequedad y el residuo se disolvió en 10 mL de agua destilada; posteriormente, esta solución se dividió en tres partes iguales en su respectivo tubo de ensayo, a cada uno de los cuales se les adicionó un reactivo diferente para determinar las condiciones del precipitado. Así, los 3 tubos de ensayo tuvieron las siguientes características: 1) Tubo de ensayo número 1: solución de gelatina (solución de grenetina al 1% (p/v) en agua destilada). 2) Tubo de ensayo número 2: reactivo de gelatina-sal (1 g de grenetina al 1% (p/v), 10 g de cloruro de sodio y agua destilada para aforar a 100 mL). 3). Tubo de ensayo número 3: solución salina (cloruro de sodio al 10% (p/v) en agua destilada).

5.4.1.3 Detección de saponinas

Para determinar la presencia de saponinas en los extractos de *Echinacea*, se colocó 0.02 g de tejido seco de cada extracto en 10 mL de agua destilada y se puso en baño María hasta llegar a 100 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agitó

vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se clasificó la presencia de saponinas a partir de la formación de espuma y su altura.

5.4.1.4 Determinación de la presencia de antraquinonas

La determinación de las antraquinonas se realizó mediante cromatografía de capa fina en placas de sílica gel, las cuales fueron cortadas de 3 x 5 cm. Se colocaron marcas del extracto y se corrieron con un sistema de solventes diclorometano: metanol (95:5 v/v) sistema de solventes adecuado, después se observaron bajo luz UV donde una fluorescencia amarilla o rojo marrón indicó la presencia de las antraquinonas.

5.4.1.5 Determinación de cumarinas

Las cumarinas se determinaron mediante la siguiente reacción. 10 mL de agua destilada fueron añadidos a 0.02 g de tejido seco de *Echinacea* en tubos de ensaye. Cada tubo fue cubierto con papel filtro, previamente humedecido con una solución de hidróxido de sodio (1 g en 15 mL de agua destilada). Se colocaron los tubos en baño María hasta su ebullición y posteriormente se retiró el papel filtro y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, el papel filtro fue revisado bajo luz UV donde una fluorescencia azul indicaba la presencia de cumarinas en los extractos.

5.4.2 Parámetros cuantitativos

5.4.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó usando el reactivo de Folin–Ciocalteu mediante la técnica descrita por Singleton y Rossi (1965). Se mezcló una alícuota de 200 µL de los extractos hidroalcohólicos comerciales de *Echinacea* con 1 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu (previamente diluido con agua en proporción 1:10 v/v) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente antes de adicionarle 0.8 mL de carbonato de

sodio (7.5% p/v). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la absorbancia a 765 nm. El contenido total de compuestos fenólicos se reportó como equivalentes de ácido gálico (EAG) en 1 mL de extracto de *Echinacea*.

5.4.2.2 Determinación de flavonoides totales

Para la determinación de los flavonoides totales, se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Chang y colaboradores, 2002). 0.5 mL de los extractos hidroalcohólicos de *Echinacea* se mezclaron con 1.5 mL de metanol, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se determinó la absorbancia a 415 nm. Se preparó una curva de calibración de quercetina de 10-100 µg/mL en metanol. Los resultados se reportaron en µg de quercetina por mL del extracto de *Echinacea*.

5.4.2.3 Determinación de polifenoles mediante HPLC

Los polifenoles se determinaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando una modificación de la técnica descrita por Pellati y colaboradores (2011). Se utilizó un equipo Agilent Technology 1260, con una columna Agilent C₁₈ (5 µm, 150 x 4.6 mm) y un detector de longitud de onda múltiple (MWD, G1315B; Alltech Co. USA). Cada muestra de los extractos hidroalcohólicos de *Echinacea* fue filtrada (0.45 µm, filtro de nylon Millex, Millipore antes de ser inyectada en el equipo. Como fase móvil se utilizó una mezcla de (A) ácido acético 0.1% (v/v) y (B) acetonitrilo. Se manejó un gradiente de elución (Tabla 3) con un flujo de 1 mL min⁻¹.

Tabla 3. Gradiente de elución para la determinación de polifenoles

Tiempo (min)	Ácido acético	Acetonitrilo
0	85	15
10	70	30
18	35	65
25	20	80
30	10	90
35	10	90

El volumen de inyección de muestra fue de 20 μL y se usó una longitud de onda de 320 nm para MWD. El software cromatográfico CHEMSTATION (Rev. A.08.03; Agilent Technologies) fue utilizado para la adquisición de los datos del detector. La concentración de los polifenoles en los extractos se determinó mediante la elaboración de curvas patrón de los estándares de los ácidos cafeico, clorogénico, rosmarínico y gálico.

5.4.2.4 Determinación de azúcares

Se determinaron los azúcares en los extractos de *Echinacea* mediante HPLC (equipo mencionado anteriormente). Antes de las determinaciones, cada extracto de *Echinacea* fue filtrado con un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm (Millex, Millipore, Bedford, USA). 20 μL del filtrado fueron inyectados al equipo. Se realizaron los análisis con una columna Agilent Hi-Plex Ca (8% crosslinked, 7.7 \times 300 mm, 8 μm) y la fase móvil consistió de agua MiliQ de manera isocrática. El flujo fue de 0.6 mL min^{-1} y la temperatura de la columna se fijó en 70°C. Los resultados se expresaron como ppm de azúcar por gramo de peso seco de los extractos de *Echinacea*.

5.4.2.5 Determinación de alquilamidas

Para la determinación de las alquilamidas en los extractos de *Echinacea*, se llevó a cabo una separación líquido-líquido para obtener una fracción lipofílica. 10 mL de cada extracto de *Echinacea* fueron colocados en un embudo de separación con 20 mL de una mezcla de hexano: acetato de etilo (1:1 v/v). Se recuperó la fase orgánica y se concentró en un rotavapor. Posteriormente, se filtró para su análisis por cromatografía de gases acoplada a masas. El cromatógrafo fue un equipo Agilent Technologies 6890N, equipado con un detector de masas Agilent Technologies 5975B, utilizando una columna HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) y helio como gas acarreador (5µL/min). Las condiciones de cromatografía fueron similares a las publicadas por Hudaib y colaboradores en 2002.

5.5 Tercera etapa- Parámetros biológicos

5.5.1 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

La determinación de la capacidad antioxidante se basó en la evaluación de la capacidad de los extractos hidroalcohólicos de *Echinacea* para atrapar radicales libres (DPPH y ABTS). El método con DPPH se realizó de acuerdo a lo descrito por Brand-Williams y colaboradores (1995). Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidracil) 0.1mM en metanol. La mezcla de reacción contenía 50 µL de la respectiva dilución de cada uno de los extractos hidroalcohólicos de *Echinacea* y 950 µL de la solución de DPPH 0.1mM. La capacidad antioxidante se determinó mediante el decremento de la absorbancia a 515 nm. El método con ABTS se realizó de acuerdo a lo descrito (Re y colaboradores, 1999) con ligeras modificaciones. Se preparó una solución de ABTS (Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM en 100 mL de agua desionizada y se dejó reaccionar durante 16 horas. Posteriormente, se ajustó el pH de esta solución a 7.4 con amortiguador PBS 1X y se

ajustó la absorbancia a 0.7, utilizando agua destilada como blanco. La mezcla de reacción constó de 100 μL de la respectiva dilución de cada extracto de *Echinacea* y 1 mL de ABTS y se determinó a 734 nm. Tanto para DPPH como para ABTS, los resultados se reportaron como la capacidad antioxidante equivalente de trolox mM mL^{-1} del extracto hidroalcohólico (CAET).

5.5.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria, se llevó a cabo el modelo de edema plantar, inducido por carragenina. Este modelo fue descrito por Cai y colaboradores (2014). Se trabajaron con ratas Wistar macho de 84 días de edad y con un peso entre 300 y 320 g. Todos los animales fueron entregados por el bioterio de la UAM-Iztapalapa y se manejaron de acuerdo a los estatutos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, basado en la Norma Oficial Mexicana [NOM-062-ZOO-1999] (NOM, 1999). Se indujo la inflamación en 40 ratas Wistar. Las ratas fueron divididas en 5 grupos ($n=8$), un control negativo (500 mL de agua), un control positivo (indometacina 10mg/kg en 500 mL de agua), tres grupos de *Echinacea*, uno para cada extracto analizado (1.66 mL de extracto de *Echinacea* in 500 mL de agua, corresponde a una dosis diaria de 0.4 mL de extracto/kg). La inflamación fue inducida en la pata derecha mediante una inyección sub plantar de 0.1 mL de carragenina 1% (p/v) en solución salina 0.9% (p/v). Se midió el tamaño del edema comparando el diámetro de la pata derecha con la pata izquierda. Las mediciones de edema se tomaron cada 24 h durante 11 días.

5.5.3 Determinación de la actividad hipoglucemiante *in vivo*

Para determinar la actividad hipoglucemiante de los extractos de *Echinacea*, se trabajaron con 40 ratas macho de la cepa Wistar de 84 días de edad y un peso entre 300 y 320 g. Todos los animales fueron entregados por el bioterio de la UAM-Iztapalapa y se manejaron

de acuerdo a los estatutos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, basado en la Norma Oficial Mexicana [NOM-062-ZOO-1999] (NOM, 1999). La diabetes fue inducida mediante una inyección peritoneal de una dosis de 130 mg/kg de aloxano monohidratado disuelto en solución salina 0.9% (p/v). Para corroborar que las ratas eran diabéticas, una semana posterior a la inyección de aloxano se midieron los niveles de glucosa en sangre obtenida de la cola de las ratas. Se utilizó un glucómetro ECLIPSE (Corea) para registrar las mediciones. Una vez que se comprobó que las ratas eran diabéticas, las ratas fueron divididas en cinco grupos (n=8). Un control negativo (500 mL de agua), control positivo glibenclamida 5mg/kg en 500 mL de agua), tres grupos de *Echinacea*, uno para cada extracto analizado (1.66 mL de extracto de *Echinacea* in 500 mL de agua, corresponde a una dosis diaria de 0.4 mL de extracto/kg). Se tomaron las mediciones de la glucosa durante 33 días, cada 72 h. Durante todo el estudio, los animales fueron alimentados ad libitum (Shah y Khan, 2014). El análisis de los datos se realizó mediante una comparación de medias de los grupos tratados comparados con el control para los días 2, 6 y 12 de tratamiento.

5.5.4 Determinación de la actividad antiproliferativa *in vitro*

La evaluación de la actividad antiproliferativa se realizó mediante el ensayo de Sulforrodamina B (SRB). Se trabajaron con tres líneas celulares, MCF-7 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cérvico uterino) y HCT-15 (cáncer de colon), las cuales se cultivaron en medio RMPI 1640 con suero bovino fetal 10% (p/v) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (100% HR). Las células en fase log fueron tratadas con *Echinacea* (se evaporó 1 mL de cada extracto utilizando un flujo de N₂, el residuo fue resuspendido en DMSO y se incubaron durante 72h a 37°C). Se midió la absorbancia de SRB a 564 nm en placas de 96 cavidades. Como control positivo se utilizó la colchicina y como blanco se utilizó DMSO

(Skehan y colaboradores, 1990; Mendoza-Espinoza y colaboradores, 2009; Campos- Lara y colaboradores, 2011).

5.5.5 Determinación del efecto termoprotector en *C.elegans*

Se evaluó el efecto de los extractos de *Echinacea* en la termotolerancia de nemátodos *Caenorhabditis elegans*. Se trabajaron con larvas de *C. elegans* de la cepa silvestre N2, variedad Bristol que se encontraban en la etapa larvaria L4. Estas larvas se obtuvieron a través de una sincronización de embriones, proceso que permite que los embriones eclosionen al mismo tiempo y por lo tanto tengan un proceso de desarrollo uniforme (Stiernagle, 2006). Una vez en etapa L4, las larvas fueron divididas en tres grupos. Un grupo control negativo que fue tratada con el vehículo (solución etanol: agua, 40:60 v/v), un grupo control positivo que fue tratado con quercetina 50 μ M y cinco grupos experimentales que fueron tratados con extracto de *Echinacea* (10, 50, 250, 500 y 750 μ g en etanol como se indica posteriormente), durante 24h a 20°C. A continuación, las larvas se expusieron a una temperatura de 35°C durante 5 horas para determinar si la adición de distintas concentraciones del extracto de *Echinacea* protegía del estrés térmico (termotolerancia). Finalmente, las larvas se retiraron de las condiciones de estrés térmico y se cuantificó el número de larvas vivas (Di Paola Naranjo y colaboradores, 2016).

Los extractos secos de *Echinacea* se obtuvieron utilizando 10 mL de cada uno de los extractos comerciales estudiados. Los cuales se llevaron a sequedad a temperatura ambiente en una campana de extracción durante una semana. Una vez obtenido el extracto seco, se preparó una solución patrón (10mg/mL) de cada uno de los extractos secos obtenidos a partir de cada extracto comercial. Para la preparación de cada una de las concentraciones de extracto antes mencionadas, se tomaron alícuotas de la solución

patrón (1, 5, 25, 50 y 75 μL) y se aforaron con etanol a 100 μL finales, los cuales fueron adicionados a cada una de los cinco grupos experimentales.

5.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa NCSS (2001, Jerry Hintze) para realizar el análisis de varianzas (ANOVA, de acuerdo a un diseño complemente al azar) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. En ambos casos el nivel de significancia estadística fue de $\alpha=0.05$.

6. Resultados y Discusión

6.1 Selección de los extractos

Después de la búsqueda de los extractos disponibles en el mercado (como se mencionó en la metodología), se utilizaron tres extractos comerciales que fueron Echinacea® (Herb Pharm), Super Echinacea® (Herb Pharm) y Echinacea Supreme® (Gaia Organics) (figura 2), todos obtenidos en los Estados Unidos y que cuentan con certificación ante el Programa Nacional Orgánico del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).



Figura 2. Extractos comerciales de *Echinacea*, utilizados en este estudio

Tratándose de extractos hidroalcohólicos, se continuó con la identificación del tipo de alcohol con el que fueron elaborados estos extractos. El estudio de Resonancia Magnética Nuclear indicó que estos extractos fueron preparados con etanol.

6.2 Etapa 1. Análisis físico

6.2.1 Determinación de la densidad y cantidad de materia seca

Debido a que este estudio se realizó con extractos obtenidos de manera comercial, se determinó la densidad de los extractos, así como la cantidad de materia seca con la que

fueron elaborados. En la tabla 4 se muestran los resultados de la cantidad de materia seca y la densidad calculadas, así como los tejidos de las plantas de *Echinacea*, usados para elaborar los extractos, dicha información se encuentra en el marbete de cada uno de los extractos.

Tabla 4. Análisis físico de los extractos de *Echinacea*

Extracto comercial	Tejido utilizado para la elaboración de los extractos	Materia seca calculada (g/mL)	Densidad calculada (g/mL)
Echinacea® (Herb Pharm) A	Raíces de <i>Echinacea purpurea</i> .	0.024	0.933
Super Echinacea® (Herb Pharm) B	Raíces, hojas, flores y semillas de <i>Echinacea purpurea</i> .	0.027	0.930
Echinacea Supreme® (Gaia Organics) C	Partes aéreas y raíces de <i>Echinacea purpurea</i> , raíces de <i>Echinacea angustifolia</i> .	0.239	0.978

Se puede observar que tanto la cantidad de materia seca como la densidad fueron mayores para el extracto C, mostrando un aumento de diez veces en el caso de la materia seca con respecto a A y B. Sin embargo, la dosis recomendada para los tres extractos es la misma, esto evidencia aún más la necesidad de una estandarización de este tipo de extractos.

6.2.2 Espectros de UV/Vis de los extractos de *Echinacea*

En la figura 3, se muestran los espectros de UV/Vis de los tres extractos de *Echinacea*, donde se puede observar que no hay diferencias entre los patrones de los tres extractos. Esto indica que no se podría distinguir entre los tres extractos basándose en su perfil químico espectrofotométrico.

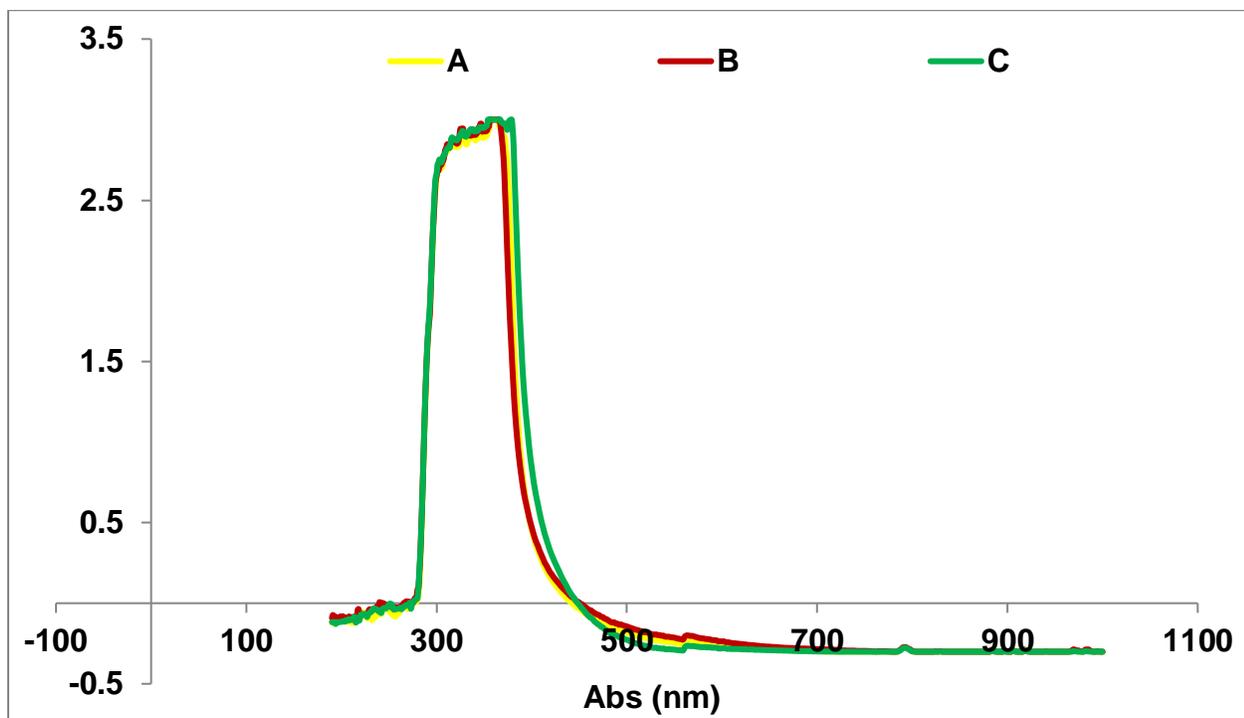


Figura 3. Espectros de UV/Vis de los tres extractos comerciales de *Echinacea*

6.3 Etapa 2. Análisis químico

6.3.1 Parámetros cualitativos

Para poder identificar de manera cualitativa los grupos fitoquímicos, determinados, se creó una escala idónea donde se indicó la ausencia o presencia de cada uno de estos grupos en los extractos de *Echinacea* (Tabla 5).

Tabla 5. Grupos fitoquímicos determinados en los extractos de *Echinacea*

Extracto/ Grupo químico	Saponinas	Antraquinonas	Alcaloides	Taninos	Cumarinas
A	+	-	-	+	+
B	++	+	-	-	-
C	+	+	-	+	+

Escala idónea donde – significa ausencia, + presencia moderada y ++ presencia abundante

Como se puede observar en la tabla 5, se encontró una presencia moderada de saponinas, taninos y cumarinas en los extractos A y C. B presentó una presencia

abundante de saponinas, pero no se encontraron taninos y cumarinas en este extracto. Se observó una presencia moderada de antraquinonas en los extractos B y C. No se observaron alcaloides en ninguno de los extractos estudiados.

6.3.2 Parámetros cuantitativos

6.3.2.1 Compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

En los análisis cuantitativos se observó un mayor número de compuestos fenólicos totales (figura 4) y flavonoides totales (figura 5) para el extracto C cuando se expresa por mL de extracto, parámetro importante en la dosificación ya que es la forma en que está indicada la posología en este tipo de medicamentos.

Entre los extractos A y B no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, cuando los resultados se expresan con base en materia seca (tomando en cuenta la cantidad de materia seca que se calculó), el extracto A mostró mayores niveles de fenoles y flavonoides totales y el extracto C los menores niveles.

El alto nivel de los compuestos fenólicos totales del extracto A (preparado con raíces de *E. purpurea*) concuerda con lo descrito por la OMS donde indican que las raíces de *E. purpurea* tienen altos contenidos de compuestos fenólicos totales (OMS, 1999), valores incluso superiores a los reportados para té verde.

Es importante mencionar que los altos contenidos de fenoles y flavonoides totales del extracto C correlaciona con lo observado en la capacidad antioxidante (figura 7 y 8) y pudiera ser resultado de la mayor cantidad de materia seca que se calculó para este extracto (Tabla 4). Esta correlación positiva entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales ha sido observada en diez plantas medicinales de la India, así como en algas verdes comestibles (Kumar y colaboradores, 2008; Farasat y colaboradores, 2014)

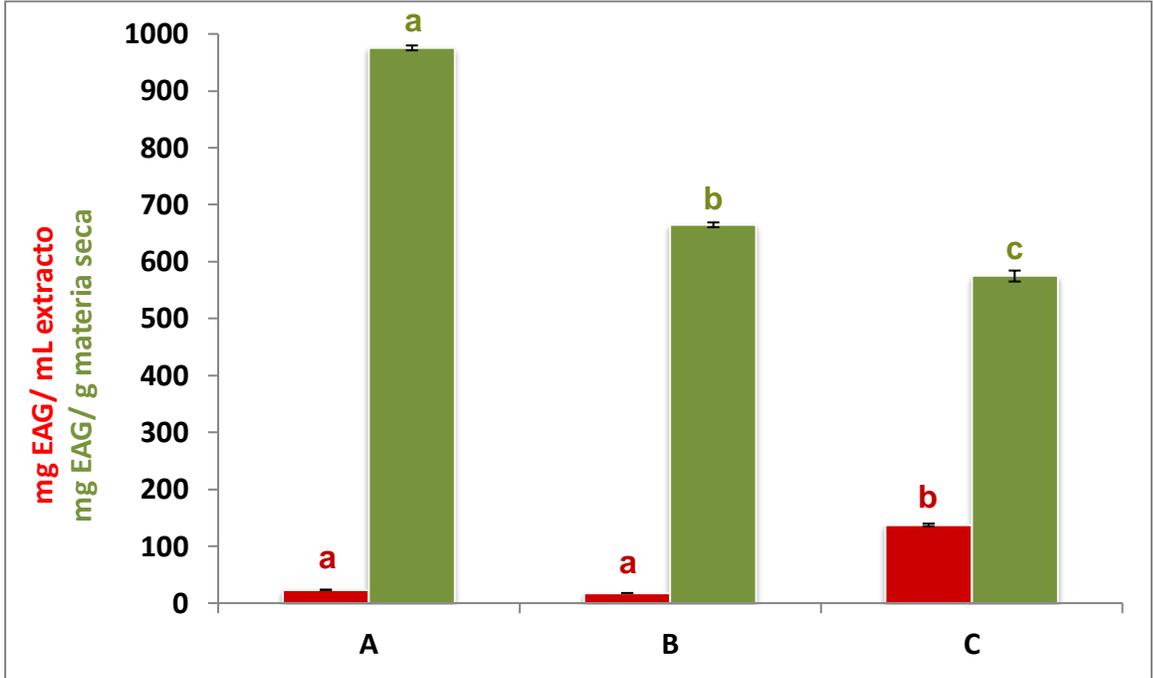


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos de *Echinacea*, expresado en mg equivalentes de ácido gálico por mL de extracto o por g de materia seca. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($\alpha= 0.05$).

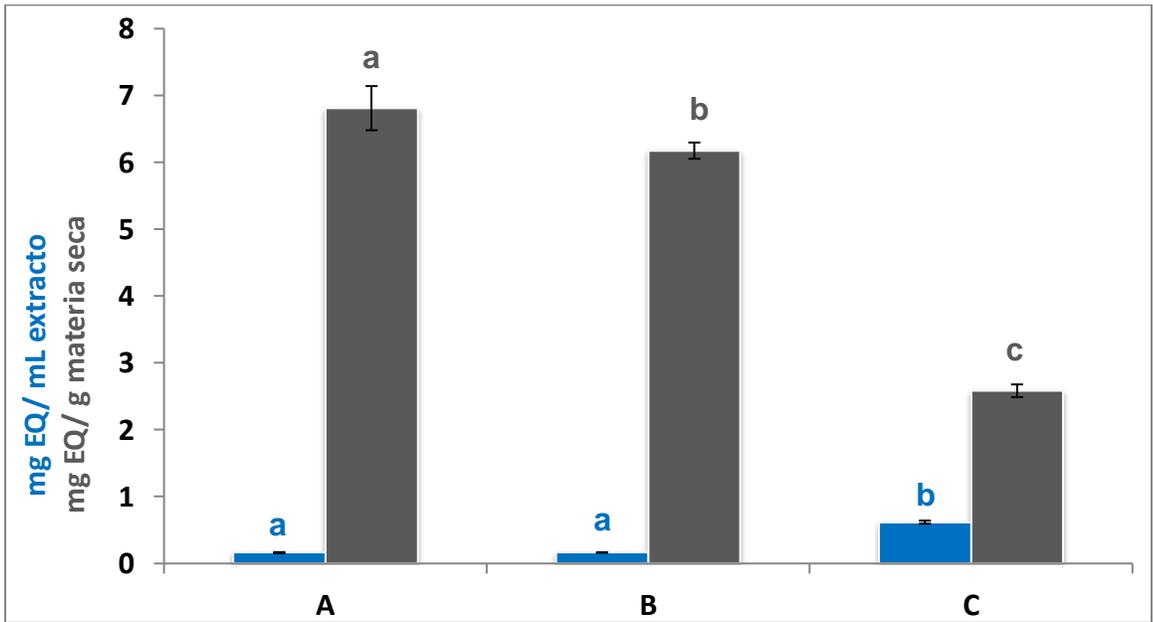


Figura 5. Contenido de flavonoides totales en los extractos de *Echinacea*, expresado en mg equivalentes de quercetina por mL de extracto o por g de materia seca. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($\alpha= 0.05$).

6.3.2.2 Polifenoles mediante HPLC

En la cuantificación de los polifenoles llevada a cabo por HPLC, se observó la presencia de ácido cafeico en el extracto C, a una concentración de 0.048 ppm (Tabla 6). Este compuesto no fue detectado en los extractos A y B. En los extractos B y C sí se observó el ácido clorogénico, que es un derivado del ácido cafeico. Sin embargo, no se pudo cuantificar ya que la concentración fue menor al límite de detección del equipo.

Estos resultados indican que el ácido cafeico se encuentra en raíces de *E. angustifolia* y que el ácido clorogénico probablemente se encuentre mayoritariamente en las partes aéreas de *Echinacea* spp. Es importante señalar que el contenido de compuestos fenólicos totales, determinados por espectrofotometría fue muy alto (figura 4). Sin embargo, esto no se ve reflejado en los resultados de los polifenoles cuantificados mediante HPLC por lo que sería interesante determinar si están presentes otros compuestos fenólicos y de cuáles se trata, o si hay interferencia de otros metabolitos como los azúcares que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, en la determinación de compuestos fenólicos totales por la técnica espectrofotométrica.

Tabla 6. Compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Echinacea*

	Concentración ácido (ppm)			
	Cafeico	Clorogénico	Rosmarínico	Gálico
A	n.d	n.d	n.d	n.d
B	n.d	<1	n.d	n.d
C	0.048	<1	n.d	n.d

Estos polifenoles fueron identificados mediante estándares comerciales. n.d = no detectado

6.3.2.3 Azúcares

En la elaboración de extractos medicinales, es común la adición de azúcares ya que generalmente ese tipo de extractos puede tener un sabor amargo. Los azúcares cuantificados en los tres extractos de *Echinacea* fueron glucosa, fructosa y sacarosa, observándose las concentraciones más altas en el extracto C (Tabla 7).

Dentro del mismo análisis realizado para determinar los azúcares, se determinó el porcentaje de etanol en cada uno de los extractos ya que tratándose de extractos hidroalcohólicos, no se contaba con la información sobre la relación alcohol- agua. En este ensayo se observó que los extractos A y B presentan 40% de etanol y el extracto C 30%.

Tabla 7. Azúcares presentes en los extractos de *Echinacea*

	Concentración (ppm)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
A	267	1,660	6,788
B	78	2,475	3,555
C	68,061	2,522	29,939

6.3.2.4 Alquilamidas

En el análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas se determinaron 11 alquilamidas en los extractos A y B. En el extracto C se determinaron estas mismas 11 alquilamidas y otras tres más que se pudieran asociar a *E. angustifolia* (Tabla 8, figura 6). La concentración y el tipo de alquilamidas dependen de la especie de *Echinacea* y de la parte de la planta usada en la preparación de los extractos.

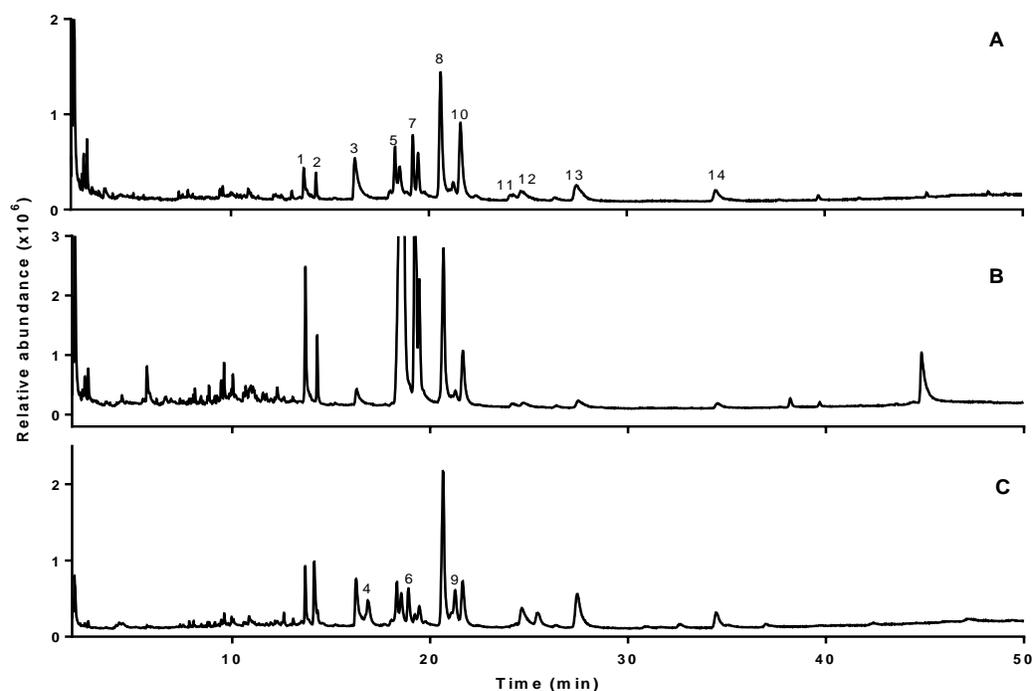


Figura 6. Cromatograma de ion total de la fracción no polar de los extractos de *Echinacea*.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Mudge y colaboradores (2011) en que indican que las raíces de *E. angustifolia* tienen un mayor número de alquilamidas que las de *E. purpurea*, lo cual concuerda con los resultados observados en este estudio, debido a que el extracto C fue preparado con una mezcla que contiene raíces de *E. purpurea* y *E. angustifolia*. Es importante mencionar que en un estudio llevado a cabo por Pellati y colaboradores (2011) en plantas de *Echinacea*, utilizando un método de extracción similar, se observaron 22 alquilamidas en *E. angustifolia* y 17 en *E. purpurea*, más que la observadas en este trabajo lo que indica que la procedencia de la planta también influye en el número de este tipo de compuestos encontrados en el extracto. La presencia de alquilamidas únicas para *E. angustifolia* indica que estas moléculas podrían ser utilizadas como marcadores de especie.

Tabla 8. Nombres y tiempos de retención de las alquilamidas presentes en los tres extractos de *Echinacea*

Pico	Rt (min)	Compuesto	A	B	C
1	13.69	Undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dien-8,10-dinoato deisobutilamida	X	X	X
2	14.12	Undeca-2 <i>E</i> -en-8,10-dinoato de isobutilamida	X	X	X
3	16.25	Dodeca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-dinoato de isobutilamida	X	X	X
4	16.87	Undeca-2 <i>Z</i> -en-8,10-dinoato de isobutilamida			X
5	18.09	Undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dien-8,10-dinoatode 2-metilbutilamida	X	X	X
6	18.89	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoatode isobutilamida			X
7	19.46	Dodeca-2 <i>E</i> -en-8,10-dinoato de isobutilamida	X	X	X
8	20.65	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> -tetraenoato de isobutilamida	X	X	X
9	21.25	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> -tetraenoato de isobutilamida			X
10	21.60	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> -tetraenoato de isobutilamida	X	X	X
11	24.66	Undeca-2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> -dien-8,10-dinoato de 2-metilbutilamida	X	X	X
12	25.46	Dodeca-2 <i>E</i> -en-8,10-dinoato de 2-metilbutilamida	X	X	X
13	27.467	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dien-8,10-dinoato de isobutilamida	X	X	X
14	34.44	Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dien-8,10-dinoato de2-metilbutilamida	X	X	X

6.4 Etapa 3. Análisis biológico

6.4.1 Capacidad antioxidante

Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante, en este estudio, se determinó mediante dos ensayos en los cuales se emplean los radicales estables DPPH y ABTS. Para la capacidad antioxidante determinada mediante el método de DPPH (figura 7) se observó el mismo patrón que se había visto para los compuestos fenólicos y flavonoides totales, expresados en mL de extracto. No se observaron diferencias significativas entre los extractos A y B. El extracto C mostró la mayor capacidad antioxidante cuando fue determinada por el método de DPPH, expresado tanto por materia seca como por mL de extracto (19.97 mM/ gps y 4.77 mM/ mL extracto respectivamente). Cuando fue determinada por el método de ABTS (figura 8) se observó que el extracto C mostró la mayor capacidad antioxidante (10.45 mM/mL extracto). Sin embargo, la tendencia cambió cuando se expresó por materia seca ya que en este caso la capacidad antioxidante fue mayor en el extracto A (70.09 mM/ gps). Es importante recalcar de nuevo que los extractos son prescritos con base en volumen de la solución hidroalcohólica y no con base en la materia seca.

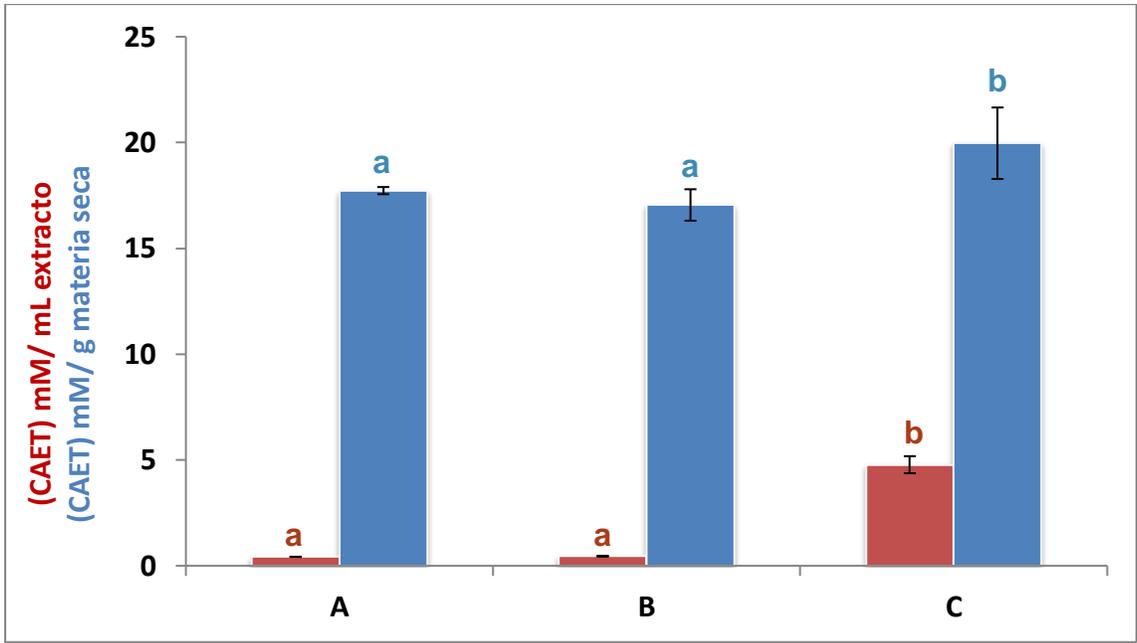


Figura 7. Capacidad antioxidante determinada mediante el método de DPPH, expresada en mM equivalentes de Trolox por mL de extracto o por g de materia seca. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$).

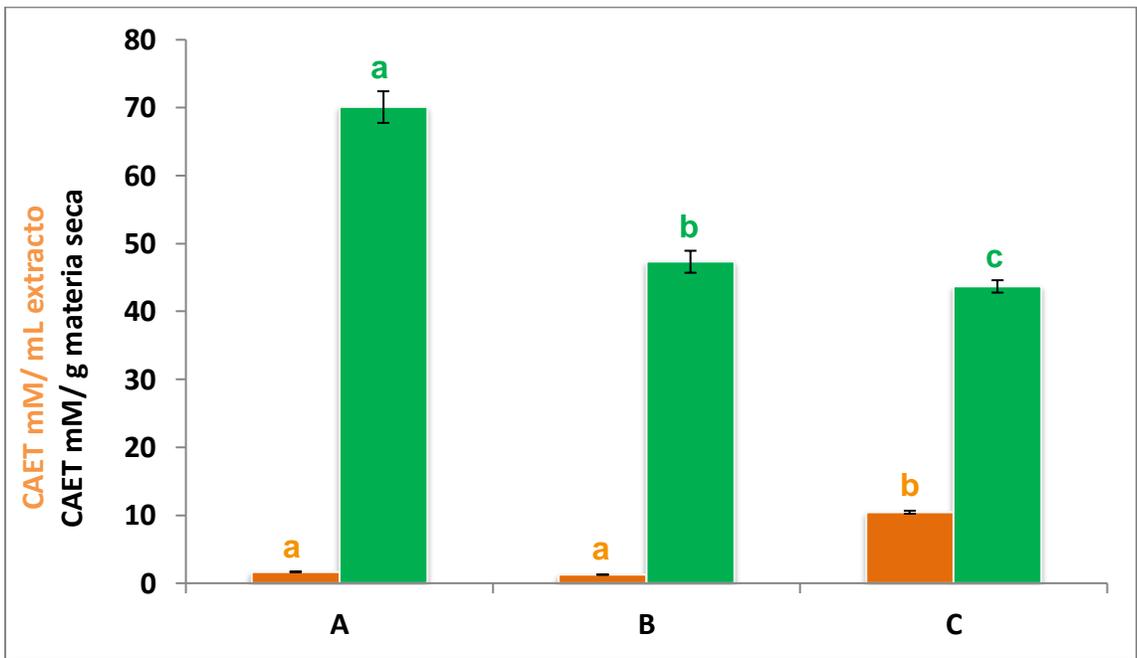


Figura 8. Capacidad antioxidante determinada mediante el método de ABTS, expresada en mM equivalentes de Trolox por mL de extracto o por g de materia seca. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$).

6.4.2 Actividad antiinflamatoria

En el modelo de edema plantar para determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos en ratas Wistar, se observó un efecto antiinflamatorio posterior a los dos y tres días (figura 9) para el extracto B (elaborado con raíces, hojas, flores y semillas de *E. purpurea*). Sin embargo, este efecto fue menos potente que observado en el control positivo usado (indometacina). Generalmente, esto se relaciona a que los medicamentos alopáticos contienen niveles más altos de principio activo, comparado con extractos medicinales. No se observó efecto antiinflamatorio para los extractos A y C, lo que indica que el metabolito responsable de este efecto posiblemente se encuentre en las hojas de *E. purpurea* y no en la raíz como lo reportó la OMS en un estudio etnobotánico (1999). Nuestros resultados concuerdan con un estudio contra la hepatotoxicidad causada por dietilnitrosamina (Rezaie y colaboradores; 2013) y el efecto protector contra la colitis inducida (Dogan y colaboradores; 2014) debido a que en ambos estudios el efecto es atribuido a la capacidad antiinflamatoria

Es importante mencionar que no queda claro cuál es el papel de las alquilamidas en este ensayo ya que no se observó un efecto antiinflamatorio en el extracto C, que es el que mostró el mayor número de alquilamidas, aunque éstas no han sido cuantificadas. Por otra parte, el efecto antiinflamatorio del extracto B podría deberse al efecto de las saponinas que se encontraron en este extracto (Tabla 5). Esto se sustenta en que algunas de las saponinas han sido asociadas con propiedades antiinflamatorias en algunas plantas medicinales de Nigeria y en *Caulophyllum thalictroides* (Hassan y colaboradores, 2012; Lee y colaboradores, 2012). Sin embargo, las saponinas son un grupo químico muy diverso y sería interesante investigar qué tipo de saponinas se encuentran en las partes aéreas de *Echinacea* ya que el extracto B fue elaborado con partes aéreas de *E. purpurea*. De manera más específica, dentro del grupo de las saponinas, los terpenoides son los que

se asocian a los efectos antiinflamatorios por lo que sería interesante empezar a estudiar este grupo de compuestos en específico.

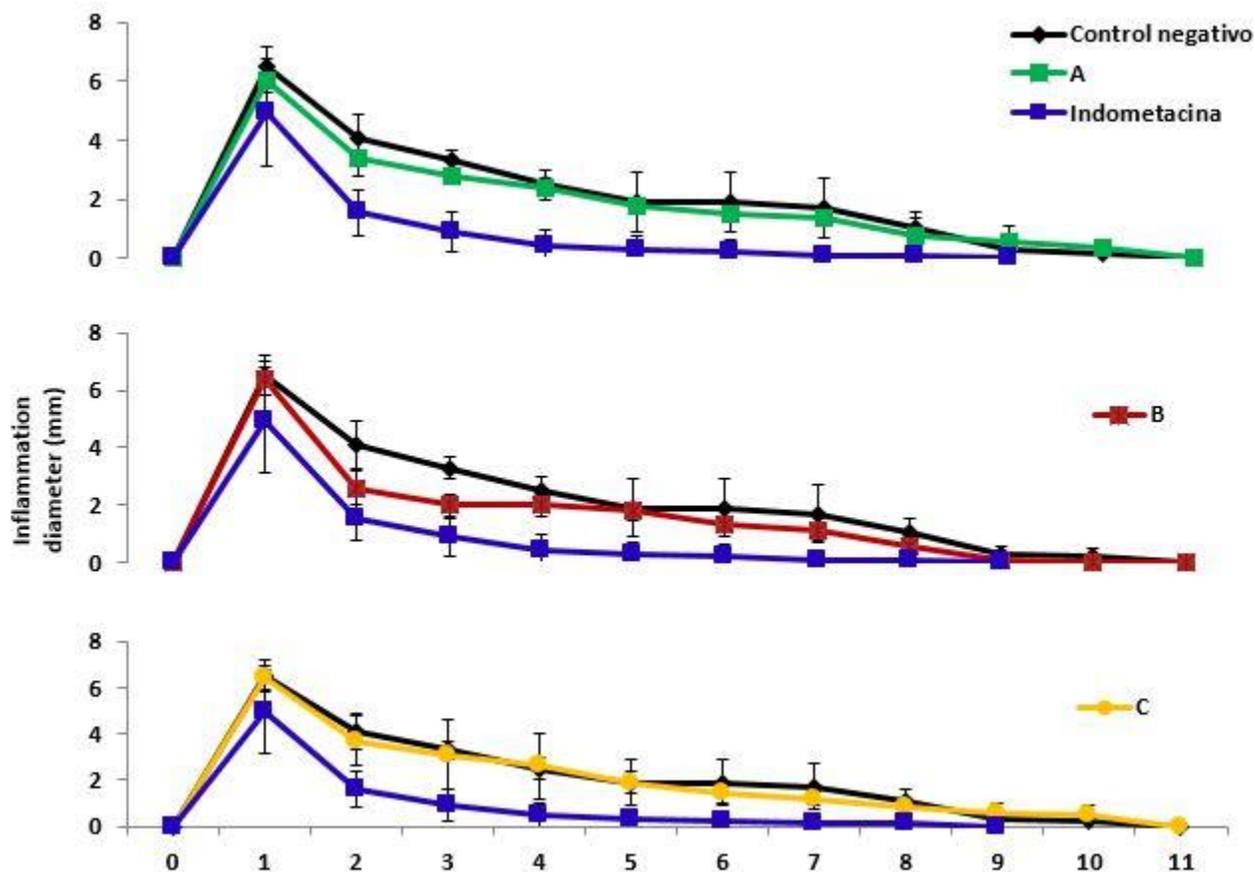


Figura 9. Efecto antiinflamatorio de los extractos de *Echinacea* en el modelo edema plantar. Cada valor es la media de ocho repeticiones \pm desviación estándar.

6.4.3 Actividad hipoglucemiante

Se observó un efecto hipoglucemiante para los extractos A y C durante el estudio (Tabla 9). El extracto B mostró un efecto hipoglucemiante al inicio del estudio (día 3 de medición), pero este efecto no se mantuvo durante el resto de los tiempos estudiados. Estos resultados sugieren que el compuesto responsable de este efecto se encuentra en raíces de *E. purpurea* y *E. angustifolia*. Vale la pena mencionar que es la primera vez que

se relaciona a *Echinacea* con algún efecto hipoglucemiante por lo que resulta interesante profundizar e investigar acerca del compuesto activo, responsable de este efecto.

Tabla 9. Efecto hipoglucemiante en los extractos de *Echinacea*

	Día de medición		
	3	18	33
A	116.5 ± 6.9*, **	124.8 ± 9.5*, **	133.25 ± 10.04*, **
B	112.8 ± 19.3*, **	295.0 ± 43.2	317.5 ± 21.5
C	125.0 ± 54.4*, **	232.5 ± 131.6*, **	232 ± 135.4*, **
Control	412.3 ± 11.1	387.0 ± 72.4	436.25 ± 58.78
Glibenclamida	140.0 ± 34.6*	104.0 ± 15.2*	147.75 ± 31.91*

Promedio de la glicemia (mg/dL) ± SD, ANOVA, Tukey, $n = 8$, *Diferencias significativas comparado con el control ($\alpha=0.05$); **No se encontraron diferencias significativas con la glibenclamida ($\alpha=0.05$).

6.4.4 Actividad antiproliferativa

En el ensayo antiproliferativo se observaron valores de concentración inhibitoria (CI₅₀) por arriba de 30,000 mg mL⁻¹ para los extractos A y B, indicando que estos extractos no detienen la proliferación celular, mientras que el extracto C mostró valores en el rango de 200- 1000 mg mL⁻¹(Tabla 10) siendo más agresivo para la línea HeLa y moderadamente agresivo para HCT15 y MCF-7. El efecto antiproliferativo del extracto C podría ser atribuible al mayor número de alquilamidas encontradas en este extracto (Tabla 6). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los publicados por Chicca y colaboradores (2007) en un estudio donde se vio que *Echinacea* tenía la habilidad de inhibir el crecimiento de líneas celulares humanas de cáncer de páncreas. Las diferencias en el efecto antiproliferativo se puede explicar por el tipo y la concentración de las

alquilamidas presente en cada extracto, ya que estos compuestos han sido relacionados con este efecto biológico.

Tabla 10. Efecto antiproliferativo de los extractos de *Echinacea*

Líneas celulares	Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) (mg/mL)			
	Colchicina	A	B	C
HeLa	0.1	>30,000	>30,000	270.8
MCF-7	0.4	>30,000	>30,000	8,171
HCT-15	10	>30,000	>30,000	9,338

6.4.5 Efecto termoprotector

Se determinó el efecto termoprotector de los extractos de *Echinacea*, utilizando como modelo biológico a *C. elegans*. El estrés térmico causa un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Si este incremento no se contrarresta con sistemas antioxidantes, el organismo puede sufrir daño oxidativo lo cual se verá reflejado en su tiempo y calidad de vida (Beaulieu y colaboradores, 2014).

Antes de llevar a cabo el ensayo para determinar el efecto termoprotector de los extractos de *Echinacea*, se realizó un ensayo para ver si los extractos no son tóxicos para el nemátodo *C. elegans*. En este ensayo no se observó toxicidad en el rango de concentraciones que se manejó. Para el ensayo de termotolerancia, se manejó el mismo rango de concentración de los extractos de *Echinacea*.

En el ensayo de termotolerancia con los extractos de *Echinacea*, no se observó efecto termoprotector en *C. elegans* (figura 10). Esto podría deberse al hecho de que no se observó un efecto antioxidante en los tres extractos de *Echinacea*. En general, dentro de las propiedades medicinales de *Echinacea*, no se reporta la capacidad antioxidante.

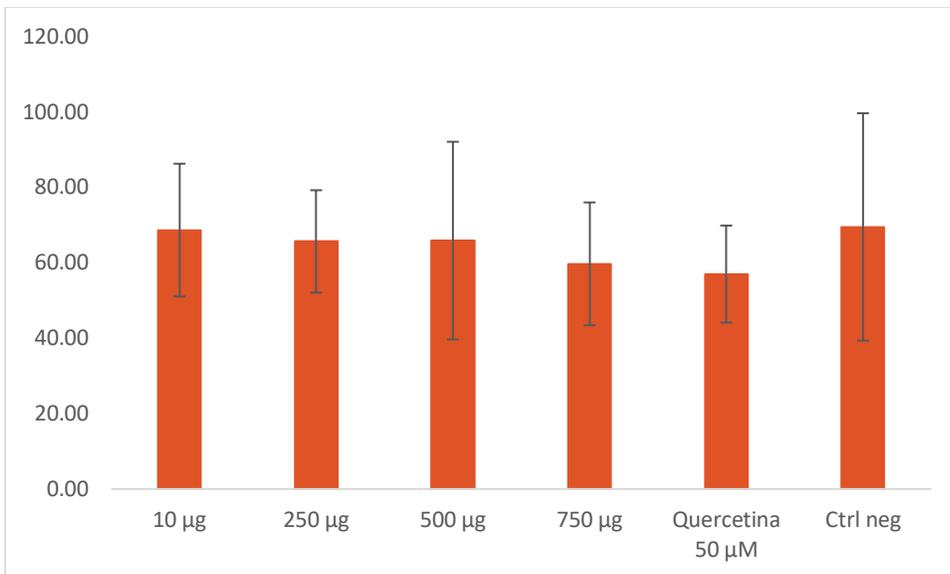


Figura 10. Efecto termoprotector de los extractos de *Echinacea* en *C. elegans*.

7. Conclusiones

- Se encontraron diferencias entre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los tres extractos evaluados de *Echinacea*. En este estudio se identificaron 11 alquilamidas en los extractos A y B, observando 14 en el extracto C.
- Únicamente el extracto B mostró efecto antiinflamatorio, lo que sugiere que el compuesto activo que produce este efecto probablemente se encuentre en las partes aéreas de *E. purpurea*. Aunque el extracto C también fue preparado con partes aéreas de *E. purpurea*, no se observó efecto antiinflamatorio para este extracto, esto podría deberse al efecto de la dilución del compuesto activo en el extracto C, ya que éste fue preparado con dos especies de *Echinacea* (partes aéreas y raíces de *E. purpurea* y raíces de *E. angustifolia*); pudiendo dar por resultado el enmascaramiento del efecto antiinflamatorio que se observó para el extracto B.
- El efecto hipoglucemiante observado para los extractos A y C podría ser atribuido a las raíces de *E. purpurea*. No se encontraron reportes anteriores donde se asocie a *Echinacea* con este efecto.
- Se observó efecto antiproliferativo moderado para el extracto C, esto correlaciona con los contenidos altos de alquilamidas encontrados en la fracción no polar de este extracto.
- Los resultados presentados en este estudio aportan evidencias de la necesidad de desarrollar estrategias y políticas de estandarización, no sólo para garantizar la identidad y seguridad de los productos herbolarios, sino también para garantizar su efecto biológico y terapéutico.
- Es importante mencionar que la dosis recomendada en la etiqueta es la misma para los tres extractos de *Echinacea* estudiados. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el contenido químico y efecto biológico son diferentes.

Apoyando la idea de que los extractos estudiados deben ser comercializados y dosificados de manera distintiva para sus diferentes usos terapéuticos.

8. Perspectivas

- Llevar a cabo la búsqueda del principio o principios activos responsables de la capacidad antiinflamatoria del extracto B
- Evaluar si el efecto antiinflamatorio es atribuible a las partes aéreas de *E. purpurea*.
- Si la cantidad de polifenoles totales es alta y no corresponden a los tres polifenoles evaluados en este trabajo, sería interesante purificar y cuantificar qué tipo de compuestos polifenoles están presentes.
- Llevar a cabo un estudio de la farmacodinamia en el proceso hipoglucemiante observado en los extractos A y C.
- Evaluar el (los) metabolito (s) responsable (s) del efecto hipoglucemiante.
- Evaluar si existe un cambio en el perfil químico de los extractos durante el tiempo de almacenamiento.
- Realizar el cultivo de *Echinacea* para preparar nuestros extractos con tejido de la planta bien definido y concentraciones de etanol conocidas.

9. Referencias

- Aarland R., Rivera-Cabrera F., Pérez-Flores L., Díaz de León-Sánchez F., Mendoza-Espinoza J. (2014). Relevance of chemical Standardization and innocuousness in the process of development of herbal medicines: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences* 13: 1-7.
- Aarland R., Peralta-Gómez S., Sánchez Morales C., Parra-Bustamante F., Villa-Hernández J., Díaz de León-Sánchez F., Pérez-Flores L., Rivera-Cabrera F., Mendoza-Espinoza J.(2015). A pharmacological and phytochemical study of medicinal plants used in Mexican folk medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge*14: 550-557.
- Akerele O. (1993). Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram* 28: 13-19.
- Almaguer G., Mas J. (2009). Interculturalidad en salud, experiencia y aportes para el fortalecimiento de los servicios de salud. Imprenta Universitaria, 2ª ed. 158-159.
- Barnes J., Anderson L., Gibbons S., Phillipson J. (2005). "Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties," *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 929–954.
- Bauer R. (1998). "Echinacea: biological effects and active principals," in *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*, L. D. Lawson y R. Bauer, Eds., vol. 691 of American Chemical Society Symposium series, pp. 140- 157, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Beaulieu M., Haas A., Schaefer M. (2014). Self-supplementation and effects of dietary antioxidants during acute and thermal stress. *The Journal of Experimental Biology* 217: 370- 375.
- Blumenthal M (1999). Harvard study estimates consumers spend \$5.1 billion on herbal products. *HerbalGram* 45: 68.
- Blumenthal M. (2002). Herb sales down in mainstream market, up in natural food stores. *HerbalGram*. 55: 60.
- Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25-30.
- Brevoort P. (1996). The U.S. botanical market. An overview. *HerbalGram* 36: 49-59.

- Brown P., Chan M., Paley L., Betz J. (2011). Determination of major phenolic compounds in *Echinacea* spp. raw materials and finished products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation matrix extension. *Journal of AOAC International* 94:1400-1410.
- Cai C., Chen Y., Zhong S., Ji B., Wang J., Bai X., Shi G. (2014). Anti-inflammatory activity of n-butanol extract from *Ipomoea stoloniferain vivo* and *in vitro*. *PLoS One*. 9: e95931.
- Calixto J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research* 33: 179-189.
- Campos-Lara M., Mendoza-Espinoza J., (2011). Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin, and effect of fluvastatin in the Hela cell cycle. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5: 189-193.
- Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chaudhury R. (1999). Herbal medicine for human health. *World Health Organization*, New Delhi: 51-57.
- Chicca A., Adinolfi B., Martinotti E., Fogli S., Breschi M., Pellati F., Benvenuti S., Nieri P. (2007). Cytotoxic effects of *Echinacea* root hexanic extracts on human cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology* 110: 148-153.
- Coolborn A., Bolatito B. (2010). Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products*3: 27-34.
- Cragg G., Newman D., Snader K. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60: 52-60.
- Di Paola Naranjo R., Otaiza S., Saragusti A., Baroni V., Carranza A., Peralta I., Valle E., Carrari F., Asis R. (2016). Hydrophilic antioxidants from Andean tomato landraces assessed by their bioactivities *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry* 206: 146-155.
- Dogan Z., Ergul B., Sarikaya M., Filik L., Gonultas M., Hucumenoglu S., Can M. (2014). The protective effect of *Echinacea* spp. (*Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea*) in a rat colitis model induced by acetic acid. *Pakistani Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 1827-1835.

- Farasat M., Khavari-Nejad R., Nabavi S. Namjooyan F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iran Journal of Pharmaceutical Research* 13: 163-170.
- Garg V., Dhar V., Sharma A., Dutt R. (2012). Facts about standardization of herbal medicine: a review. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 10: 1077-1083.
- Hassan H., Sule M., Musa A.(2012). Anti- inflammatory activity of saponin extracts from five Nigerian medicinal plants. *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine* 9: 250-255.
- Hudaib M., Fiori J., Bellardi M., Rubies-Autonell C., Cavrini V. (2002). GC-MS analysis of the lipophilic principles of *Echinacea purpurea* and evaluation of cucumber mosaic cucumovirus infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 1053-1060.
- Jones W., Chin Y., Kinghorn A. (2006). The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Current Drug Targets* 7:247-264.
- Kamboj V. (2000) Herbal medicine. *Current Science* 78: 35-39.
- Kinghorn A. (2002). The role of pharmacognosy in modern medicine. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 3: 77-79.
- Kumar A., Mazumder A., Vanitha J. (2008). Evaluation of antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Indian medicinal plants. *Pharmacognosy Magazine* 4: 143-147.
- Kunle O., Egharevba H., Ahmadu P., (2012). Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 4: 101-112.
- Koehn F; Carter G. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4:206-220.
- Lee Y., Jung J., Ali Z. (2012). Anti-inflammatory effect of triterpene saponins isolated from Blue Cohosh (*Caulophyllum thalictroides*). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1-8.
- Mendoza-Espinoza J. (2009). Ciencia y Tecnología cuadernos de trabajo Vol.1. Universidad Autónoma de la Ciudad de México. pp.28-30.
- Mendoza-Espinoza J., López-Vallejo F., Pereda-Miranda R., Cerda-García-Rojas C. (2009). Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of hypurticin, a highly flexible polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. *Journal of Natural Products* 72: 700-708.

- Mudge E., Lopes-Lutz D., Brown P. (2011). Analysis of alkylamides in *Echinacea* plant materials and dietary supplements by ultrafast liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 8086- 8094.
- Mukherjee P. (2002). Quality Control of Herbal Drugs: An Approach to Evaluation of Botanicals. Business Horizons Publishers, New Delhi, India.
- Nikam P., Kareparamban J., Jadhav A., Kadam V. (2012). Future trends in standardization of herbal drugs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2: 38-44.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [online] Available at: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>. Accessed on July, 20,2014.
- OMS- WHO. (1992). Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. World Health Organization, Geneva.
- OMS- Bulletin of the World Health Organization (1993). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. Geneva, 1-86.
- OMS- WHO. (1996a). Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection. World Health Organization, Geneva. 2.
- OMS- WHO. (1996b). Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. WHO Technical Report Series, World Health Organization, Geneva.
- OMS- Bulletin of the World Health Organization. (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 1-43
- OMS- World Health Organization. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants- Vol. 1. Malta.
- OMS- World Health Organization. (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, WHO/EDM/TRM/2000.1).
- OMS- WHO. (2001). Legal Status of Traditional Medicine and Complementary/Alternative Medicine: A Worldwide Review. WHO/EDM/TRM/2001.2. Editions of the OMS, Geneva, Switzerland.
- OMS (2003). Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ediciones de la OMS, Ginebra, Suiza.

- OMS-WHO. (2004a). WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems. Editions of the OMS, Geneva, Switzerland.
- OMS- WHO. (2004b). WHO Guidelines on Developing Consumer Information on Proper Use of Traditional Complementary and Alternative Medicine. Editions of the OMS, Geneva, Switzerland.
- OMS- WHO. (2005). Summary report of the global survey on national policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. Editions of the WHO, Geneva, Switzerland.
- OMS- (2013). Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2014- 2023. Ginebra, OMS. ISBN 978 92 4 350609 8.
- Patra K., Pareta S., Harwansh R., Jayaram Kumar K. (2010). Traditional approaches towards standardization of herbal medicines- A review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2: 372-379.
- Pellati F., Epifano F., Contaldo N., Orlandini G., Cavicchi L., Genovese S., Bertelli D., Benvenuti S., Curini M., Bertaccini A., Bellardi MG. (2011). Chromatographic methods for metabolite profiling of virus- and phytoplasma-infected plants of *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10425-10434.
- Peralta-Gómez S., Aarland R., Campos-Lara M., Jiménez-Lara M., Mendoza-Espinoza J. (2013). Toxicity analysis, phytochemical and pharmacological study of the plant known as *Mora Herb*, collected at the Environmental Education Center of Yautlica (CEA-Yautlica). *Asian Journal of Plant Sciences* 12: 159-164.
- Prieto J. (2007). Special Issue on regulation of phytomedicines. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6: 92-101.
- Ramasahayam S., Baraka H., Abdel F., Abuasal B., Widrlechner M., Sayed K., Meyer S. (2011). Effects of chemically characterized fractions from aerial parts of *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia* on myelopoiesis in rats. *Planta Medica* 77:1883-1889.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231- 1237.
- Rezaie A., Fazlara A., Karamolah M., Shahriari A., Zadeh H., Pashmforosh M. (2013). Effects of *Echinacea purpurea* on hepatic and renal toxicity by diethylnitrosamine in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 8: 60-64.

- Shah N., Khan M. (2014). Antidiabetic effect of *Sida cordata* in alloxan induced diabetic rats. *BioMed Research International* 2014: 1-15.
- Singlenton V., Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdiphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144- 158.
- Skaudickas D., Kondrotas A., Kevelaitis B., Venskutonis. (2009).The effect of *Echinacea purpurea* (L.) Moench extract on experimental prostate hyperplasia. *Phytoterapy Research* 23:1474-1475.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82: 1107-1112.
- Spelman K., Wetschler M., Cech N. (2009). Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry *Echinacea purpurea* utilizing HPLC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49: 1141-1149.
- Stiernagle T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. In WormBook (ed. TCer community).
- Vaidya A., Devasagayam T. (2007). Current status of herbal drugs in India: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 41:1– 11.
- Willard T. (1996). Edible and medicinal plants of the Rocky Mountains. Calgary: Wild Rose College of Natural Healing.
- Yadav N., Dixit V. (2008). Recent approaches in herbal drug standardization. *International Journal of Integrative Biology* 2: 195-203.
- Zafar R., Panwar R., Sagar Bhanu P. (2005). Herbal drug standardization. *The Indian pharmacist* 4: 21-25.
- Zhang X. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. WHO 1:1-78.
- Zhang X. (2006). International Regulatory Cooperation on Proper Use of Traditional Medicine. Oral Presentation in the International Regulatory Cooperation on regulation of Herbal Medicines (IRCH) 29 march, Brazil.

10. Anexo

ASISTENCIA A CONGRESOS

- 2014; PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF THREE COMMERCIAL *ECHINACEA* EXTRACTS. 9º Encuentro Nacional de Biotecnología IPN/ 1st Biotechnology World Symposium. **RAYN CLARENC AARLAND**, LAURA JOSEFINA PÉREZ FLORES, FERNANDO RIVERA CABRERA, FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ, JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA. Tlaxcala, México.
- 2014; EVALUACIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE UN EXTRACTO COMERCIAL DE *ECHINACEA PURPUREA*. Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. **RAYN CLARENC AARLAND**, LAURA JOSEFINA PÉREZ-FLORES, JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA, FERNANDO RIVERA CABRERA. Puerto Vallarta, México.
- 2014; ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LAS PLANTAS EMPLEADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES EN EL MERCADO DE SONORA. IX Congreso Mexicano de Etnobiología. JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA, **RAYN CLARENC AARLAND**, FRANCISCO PARRA BUSTAMANTE, CÉSAR MORALES SÁNCHEZ, EDGAR DEL CARMEN SIERRA PALACIOS. Chiapas, México.
- 2015; FLORISTIC AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF PLANTS COLLECTED IN AMECAMECA, MEXICO FROM FEBRUARY TO MARCH 2014. 4th International Congress on Pharmacology of Natural Products. MENDOZA-ESPINOZA JA, **AARLAND R**, PEÑA-MIRANDA I, BAÑUELOS-HERNÁNDEZ AE, PERALTA-GÓMEZ S, SIERRA-PALACIOS E, GARCÍA-OCÓN B. Cuba.
- 2015; EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE TRES EXTRACTOS COMERCIALES DE *ECHINACEA*. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y VI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, **RAYN CLARENC AARLAND**, JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA, FERNANDO RIVERA CABRERA, LAURA JOSEFINA PÉREZ FLORES, FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ. Cancún, México.
- 2015; ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRES EXTRACTOS COMERCIALES DE *ECHINACEA*. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y VI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, **RAYN CLARENC AARLAND**, JOSÉ ALBERTO MENDOZA ESPINOZA, LAURA JOSEFINA PÉREZ FLORES, FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ, FERNANDO RIVERA CABRERA. Cancún, México.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 1) Peralta Gómez Susana, **Rayn Clarenc Aarland**, María G. Campos Lara, María Elena Jiménez Lara, Mendoza Espinoza José Alberto. 2013. TOXICITY ANALYSIS, PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDY OF THE PLANT KNOWN AS MORA HERB, COLLECTED AT THE ENVIRONMENTAL EDUCATION CENTER OF YAUTLICA (CEA-YAUTLICA). *Asian Journal of Plant Sciences*, Vol.12, Pag.159-164.
- 2) **Aarland R.**, Rivera-Cabrera F., Pérez-Flores L., Díaz de León Sánchez F., Mendoza Espinoza A. 2014. RELEVANCE OF CHEMICAL STANDARDIZATION AND INNOCUOUSNESS IN THE PROCESS OF DEVELOPMENT OF HERBAL MEDICINES: A REVIEW. *Asian Journal of Plant Sciences*, Vol.13, Pag.1-7.
- 3) **Aarland Rayn Clarenc**, Peralta-Gómez Susana, Sánchez Morales Cesar, Parra-Bustamante Francisco, Villa-Hernández Juan Manuel, Díaz de León-Sánchez Fernando, Pérez-Flores Laura Josefina, Rivera-Cabrera Fernando, Mendoza-Espinoza José Alberto. 2015. A PHARMACOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF MEDICINAL PLANTS USED IN MEXICAN FOLK MEDICINE. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, Vol.14, Pag.550-557.
- 4) José Alberto Mendoza Espinoza, **Rayn Clarenc Aarland**, Imelda Peña Miranda, Susana Peralta-Gómez, Edgar Sierra-Palacios, Bernarda García-Ocón. 2016. PHARMACOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL POTENTIAL STUDY OF PLANTS COLLECTED IN AMECAMECA, STATE OF MEXICO, MEXICO. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, Vol.15, Pag.62-67.

ARTÍCULO ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN

- 1) **Rayn Clarenc Aarland**, Angel Ernesto Bañuelos-Hernández, Mabel Fragoso-Serrano, Edgar del Carmen Sierra-Palacios, Fernando Díaz de León-Sánchez, Laura Josefina Pérez-Flores, Fernando Rivera-Cabrera, José Alberto Mendoza-Espinoza.

Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts.

Aceptado para su publicación en "Pharmaceutical Biology".



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00082

Matrícula: 2131800169

DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPIOS BIOACTIVOS, PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES DE TRES EXTRACTOS MEDICINALES DE *Echinacea* PARA SU CONTROL DE CALIDAD Y ESTANDARIZACIÓN.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 15 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES
 DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ
 DR. ANGEL ERNESTO BAÑUELOS HERNANDEZ
 DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

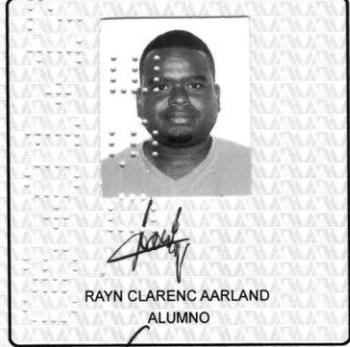
Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
 DE: RAYN CLARENC AARLAND

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ-FLORES

VOCAL

[Signature]
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

VOCAL

[Signature]
DR. ANGEL ERNESTO BAÑUELOS HERNANDEZ

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO