

Universidad de Costa Rica
Facultad de Farmacia

**Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica
de los extractos alcohólicos de tres plantas del género *Impatiens*
(Balsaminaceae)**

Fabian Delgado Rodriguez.

2016

Índice de contenidos:

Sección	Página
1. Objetivo General	3
2. Objetivos específicos	3
3. Hipótesis	4
4. Justificación	4
5. Marco teórico	7
5.1 Relevancia de los productos naturales como sustancias útiles en la investigación para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y citotóxicos	7
5.2 Importancia farmacológica del género <i>Impatiens</i> (Balsaminaceae)	17
5.3 Clasificación taxonómica y características botánicas de las especies del género <i>Impatiens</i> propuestas para el estudio	49
5.3.1 Clasificación taxonómica del género <i>Impatiens</i>	49
5.3.2 Descripción botánica de las especies propuestas para el estudio	52
5.3.2.1 <i>Impatiens walleriana</i> Hook. f	52
5.3.2.2 <i>Impatiens balsamina</i> L	55
5.3.2.3 <i>Impatiens hawkeri</i> Bull	57
6. Metodología	59
6.1 Recolección del material vegetal	59
6.2 Preparación de los extractos	63
6.3 Cuantificación de compuestos fenólicos	65
6.3.1 Determinación de compuestos fenólicos totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu	65

6.3.2 Cuantificación colorimétrica de flavonoides	69
6.4 Determinación de actividad antioxidante <i>in vitro</i>	73
6.4.1 Determinación de la actividad secuestrante radicales libres por medio del ensayo de reducción difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	73
6.4.2 Determinación del potencial reductor	77
6.5 Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> mediante el método de difusión en agar cilindro-placa	79
6.6 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> mediante el ensayo de reducción de MTT	84
7. Referencias	94
8. Anexo: Descripción botánica de <i>Impatiens turrialbana</i>	126

PROTOCOLO

Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica de los extractos alcohólicos de tres plantas del género *Impatiens* (Balsaminaceae)

OBJETIVOS DEL PROTOCOLO

1. Objetivo general:

Determinar mediante ensayos *in vitro* la actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica de los extractos alcohólicos de planta entera de las especies *Impatiens balsamina* (IB), *Impatiens hawkeri* (IH) e *Impatiens walleriana* (IW) a partir de especímenes recolectados en Costa Rica.

2. Objetivos específicos:

2.1 Cuantificar los compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides totales) presentes en los extractos alcohólicos de planta entera de IB, IH e IW mediante los métodos colorimétricos de Folin–Ciocalteu y formación de complejos en solución con cloruro de aluminio.

2.2 Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos alcohólicos de planta entera de IB, IH e IW mediante los ensayos de reducción del radical difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y de determinación del potencial reductor sobre ferricianuro potásico.

2.3 Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos alcohólicos de planta entera de IB, IH e IW sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus* spp. por medio del ensayo de difusión en agar cilindro-placa.

2.4 Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas de células tumorales (**tipo de línea aún es pendiente de fijar**) de los extractos alcohólicos de planta entera de IB, IH e IW mediante el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

HIPOTESIS DE INVESTIGACION

3. Hipótesis:

Los extractos alcohólicos obtenidos con la planta entera de las especies *I. walleriana* e *I. hawkeri* son capaces de exhibir actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica *in vitro* considerando que los extractos o diversos tipos de metabolitos secundarios de otras especies de su género, como *I. balsamina*, *I. bicolor*, *I. glandulifera*, *I. textori*, *I. capensis* e *I. pritzellii* son capaces de exhibir dichas actividades biológicas.

JUSTIFICACION

4. Justificación:

En la actualidad, la salud pública se enfrenta a un acelerado proceso de desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos responsables de infecciones bacterianas y de origen fúngico (1-3), por lo que es necesario proceder a la investigación para el desarrollo de nuevos antibióticos que sean útiles en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismo resistentes a los recursos farmacológicos actualmente disponibles (4-8), a pesar de ello la velocidad con que se descubren nuevos fármacos de este tipo resulta inadecuado considerando el rápido avance del proceso de desarrollo de resistencia a los antibióticos (4,9).

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido su preocupación por la diseminación de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos capaces de generar infecciones contagiosas y persistentes mientras el descubrimiento de nuevos antimicrobianos sigue siendo un proceso lento y reducido (10). La disminución de la eficacia de los antibacterianos y antifúngicos usados actualmente en la clínica contra los microorganismos patógenos, impulsado por el desarrollo de resistencia a los antibióticos, así como la escasez de nuevas moléculas capaces de reemplazarlos eficazmente, ha generado la necesidad de un mayor impulso de la investigación para el descubrimiento de mejores agentes antibióticos hasta el punto de que esta rama de estudio sea considerada como uno de los principales retos en lo que respecta a la investigación para el descubrimiento de nuevas drogas (8). Cabe mencionar que cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* con resistencia a los antibióticos se encuentran dentro de la lista de bacterias patógenas que más preocupación generan dentro de la Organización Mundial de la Salud (11), mientras que *C. albicans* y *Aspergillus* spp. forman parte del grupo de microorganismos fúngicos que mayor relevancia poseen por su efecto negativo para la salud humana debido a la diseminación mundial de cepas resistentes a los antifúngicos (12-13).

Por otra parte, el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer constituye un elemento de interés público considerando que esta enfermedad es la segunda causa de muerte más importante alrededor del mundo (14-15); la Organización Mundial de la Salud ha establecido que los cánceres pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal, esofágico, mama y cervical como los tipos de cáncer que más mortalidad producen a nivel mundial (16). El incremento en el reporte de casos de pacientes con tumores, los efectos adversos severos provocados por la quimioterapia y la pérdida de la eficacia de los fármacos citotóxicos empleados actualmente en la clínica, representan factores predisponentes al desarrollo de una constante necesidad por hallar nuevas drogas activas contra el cáncer, siendo por lo tanto relevante el estudio de los agentes citotóxicos que puedan derivarse de productos naturales (17).

Los productos naturales constituyen la principal fuente de agentes antimicrobianos, inclusive hallándose en mayor cantidad que los de origen sintético (18), además a partir de la modificación de su estructura es posible la obtención de moléculas con un mejor perfil farmacológico y con mayor espectro antimicrobiano (19). Los productos naturales también representan una fuente importante de moléculas con actividad citotóxica que pueden convertirse en drogas de utilidad para tratar el cáncer o bien pueden servir para la obtención de análogos con mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas para su uso clínico (20-22).

Las plantas aún constituyen un elemento de investigación para la obtención de nuevas drogas en la lucha contra los microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos (23), son múltiples los reportes de investigaciones publicados en los últimos diez años en los cuales se estudian plantas de importancia etnofarmacológica de diversas regiones (24-30), mientras que la existencia de zonas de rica biodiversidad han permitido el estudio de las propiedades antimicrobianas de los extractos de plantas que en ellas se desarrollan (31), este tipo de investigación es útil en el proceso de selección de plantas para proceder a la investigación para el aislamiento y elucidación estructural de sus moléculas activas contra microorganismos patógenos, dichas moléculas puedan ser sometidas posteriormente al análisis de su actividad para permitir el desarrollo de análogos antimicrobianos más seguros y eficaces (24). Las plantas han representado una fuente importante de moléculas útiles para el tratamiento del cáncer, de modo que su estudio ha tomado fuerza en este sentido (15,17,33-34), estas han proveído moléculas capaces de funcionar como punto de partida para el desarrollo de fármacos contra el cáncer, ejemplos de ello lo representa la vinblastina, vincristina, los derivados de la

camptotecina, el etopósido derivado de la epipodofilotoxina y el paclitaxel (32,35-36). La determinación de la actividad citotóxica de extractos de plantas sobre líneas de células tumorales ha constituido una guía para la selección de especies para proceder al estudio del aislamiento y elucidación estructural de sus componentes activos (20).

Por otro lado, los antioxidantes son reconocidos como una herramienta valiosa para la prevención del cáncer debido a que previenen la oxidación de macromoléculas como enzimas, proteínas, lípidos y ADN, mediante la captación de radicales libres, lo cual previene el desarrollo del estrés oxidativo vinculado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como el envejecimiento, la enfermedad arterial coronaria, reducción de la función inmunológica, deterioro de la función cerebral, desarrollo de cataratas y el cáncer (37-38). Los compuestos fenólicos presentes en las plantas (como los taninos, flavonoides y ácidos fenólicos) son reconocidos como poderosos antioxidantes, por lo tanto no es extraño que en la literatura se indique que los compuestos fenólicos son potenciales agentes de utilidad para la prevención del cáncer (17).

En el caso de las plantas del género *Impatiens*, existe un amplio número de reportes relacionadas con el hecho de que múltiples especies de dicho género se caracterizan porque sus extractos o metabolitos secundarios específicos son capaces de demostrar una significativa actividad antipruriginosa, antiinflamatoria, antianafiláctica, antinociceptiva, antimicrobiana, citotóxica, antihiperlipemiente entre otros efectos biológicos (39-61). Por lo tanto se justifica la investigación con la finalidad de determinar si las especies IW e IH poseen dichas actividades biológicas, tomando en cuenta que estas son cultivadas masivamente en Costa Rica para su uso ornamental y que además IW se reporta como una especie naturalizada en este mismo país (62-66), además de considerar que en una base de datos de reconocida relevancia para las ciencias biomédicas como PubMed no se reporta el estudio de estas especies con fines farmacológicos a fecha del 21 de enero de 2016.

Una investigación de este tipo consiste en una con enfoque quimiosistemático, puesto que la selección del material vegetal de partida así como de los ensayos ha llevarse a cabo con sus extractos se establece tomando en cuenta aspectos taxonómicos y antecedentes como el reporte de plantas del mismo género con metabolitos que han demostrado un mismo tipo de actividad biológica (67). Por otra parte la especie IW se reporta como una especie comestible (68) por lo tanto resulta útil conocer su valor como agente antioxidante, además tanto para IW como para

IH no se reporta la cuantificación de compuestos fenólicos, por lo que puede ser de utilidad el proceder a dicha determinación considerando que se ha comprobado para los extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas de IB que su actividad antioxidante y antimicrobiana se relaciona con su contenido de compuestos fenólicos (51).

MARCO TEORICO

5. Marco teórico:

5.1. Relevancia de los productos naturales como sustancias útiles en la investigación para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y citotóxicos.

Los fármacos antimicrobianos han constituido una herramienta de trascendental importancia en el desarrollo de la medicina moderna, permitiendo avances en el tratamiento de cuadros infecciosos, traumas, cirugías y pacientes inmunosupresos (69), así como un incremento en la expectativa de sobrevivencia infantil (70); sin embargo el acelerado desarrollo de resistencia a los mismos por parte de bacterias y microorganismos fúngicos (1-2), debido en parte a su uso excesivo e inapropiado (1), a la generación de biopelículas por parte de los microorganismos (71-73) y el desarrollo de mutaciones en los genes que codifican para las dianas de los fármacos antimicrobianos (21), ha provocado preocupación hasta el punto de ser considerado un serio problema de salud pública en la actualidad (3), constituyendo un riesgo en especial para los pacientes con algún grado de inmunosupresión, como aquellos que se encuentran bajo tratamiento contra el cáncer o para la prevención del rechazo de trasplantes de órganos (1), además, en el caso de las infecciones producidas por bacterias con multirresistencia a los antibióticos, se tiene que estas no se limitan a ser del tipo nosocomial, siendo posible su adquisición a nivel comunitario con una alta tasa de mortalidad en ambos casos (5).

Los antecedentes señalan que es imperativo el desarrollo de nuevos medicamentos antibióticos para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismo resistentes a los recursos farmacológicos actualmente disponibles (3-8), sin embargo el ritmo con que se descubren nuevos fármacos de este tipo resulta inadecuado considerando lo acelerado del proceso de desarrollo de resistencia a los antibióticos (4,9), lo cual puede deberse al mayor interés que

presentan las industrias farmacéuticas por el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos distintos a los antimicrobianos que impliquen mayor rentabilidad (74-75), a la existencia obstáculos regulatorios (7,75-76) y a los pocos incentivos disponibles para la investigación en el descubrimiento de nuevos antibióticos (75), a pesar de ello, no debe dejarse de lado que el desarrollo de un antimicrobiano seguro y eficaz es un proceso lento por sí mismo, considerando la necesidad de que este demuestre un amplio espectro sobre patógenos con un efecto mínimo sobre dianas moleculares humanas, lo cual a su vez constituye un factor para la alta probabilidad de fracaso en el proceso de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (1).

Por otra parte, se ha definido que es importante el establecimiento de prioridades en lo que respecta a la investigación para el descubrimiento de nuevos antibióticos, así como del monitoreo cuantitativo de la efectividad de las terapias con este tipo de fármaco a nivel local, nacional, regional y mundial lo cual puede resultar útil para el establecimiento de dichas prioridades (3). También se requiere de un mayor esfuerzo por parte de los gobiernos en lo que respecta al apoyo financiero para la investigación en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, la creación de marcos regulatorios adecuados (77) y la generación de incentivos para que las industrias puedan ingresar en el mercado de los antibióticos con un menor riesgo económico considerando lo costoso del proceso de desarrollo de antimicrobianos. (9,75-76); mientras que el sector académico debería renovar su infraestructura y fortalecer su papel en lo que respecta a la investigación para el descubrimiento de nuevos antibióticos (77).

Consistentemente con lo hasta ahora mencionado, la Organización Mundial de la Salud ha manifestado su preocupación por la propagación de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos capaces de generar infecciones contagiosas y persistentes mientras la investigación para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos sigue siendo un proceso lento y reducido que debe ser fortalecido para dotarlo dinamismo (10). El declive de la eficiencia de las terapias actuales contra las bacterias patógenas impulsado por el desarrollo de resistencia a los antibióticos así como la escasez de nuevos tipos de moléculas capaces de sustituirlos o complementarlos, han constituido elementos de presión para un mayor impulso

de la investigación para el descubrimiento de mejores agentes antibacterianos hasta el punto de que esta línea de investigación sea considerada como uno de los principales retos en el siglo XXI para disciplinas como la química medicinal (8).

No es extraño que en la literatura se señalen a especies bacterianas contra las cuales es preciso el desarrollo de más y mejores antibióticos de forma más expedita, dentro de las cuales se puede mencionar a *Clostridium difficile* (78-79), *Staphylococcus aureus* metilina resistente (70-71,80), *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (5,79-80), *Mycobacterium tuberculosis* (70,81), *Neisseria gonorrhoeae*, bacterias gram negativas portadores de la enzima metalo beta-lactamasa de Nueva Delhi (70), *Helicobacter pylori* (82), entre otras.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido a las especies bacterianas que mayor preocupación generan a nivel mundial debido a su resistencia ante los antibióticos así como al aumento de su prevalencia tanto a nivel intrahospitalario como comunitario, dichas especies corresponden a *Escherichia coli* (cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, beta-lactamasas y fluoroquinolonas), *Klebsiella pneumoniae* (cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, beta-lactamasas y carbapenemos), *Staphylococcus aureus* (cepas resistentes a los betalactámicos), *Streptococcus pneumoniae* (cepas resistente o no susceptibles a la penicilina), *Salmonella no typhi* (cepas resistentes a las fluoroquinolonas), *Shigella spp.* (cepas resistentes a fluoroquinolonas) y *Neisseria gonorrhoeae* (cepas con susceptibilidad reducida a cefalosporinas de tercera generación) (11).

Por otro lado, existen reportes relacionadas a cepas de microorganismos fúngicos, incluidos *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, que han desarrollado resistencia a los agentes antifúngicos y cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años a escala global (12), inclusive existe un estudio en el que se señala a *Candida spp.* como uno de los principales agentes etiológicos de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados de los Estados Unidos (13). Si bien es cierto que las infecciones fúngicas invasivas pueden desarrollarse en pacientes con un

sistema inmune competente, no puede dejarse pasar de lado que este tipo de patología se da con mayor prevalencia en individuos con algún grado de inmunosupresión lo cual implica mayor relevancia para la terapia con antifúngicos, sin embargo los medicamentos de este tipo disponibles para su uso clínico son reducidos con lo que se ha planteado la necesidad de fortalecer la investigación para el descubrimiento de nuevos agentes antifúngicos (83), más aún considerando el desarrollo resistencia por parte de cepas de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* contra los fármacos azólicos, equinocandinas y en menor grado frente a los polienos (12,83-85).

Los avances generados mediante el estudio de la genómica microbiana ha permitido el establecimiento de nuevas dianas de interés para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (86). Por otro lado, distintas son las estrategias planteadas para el diseño de drogas antimicrobianas con menor susceptibilidad de generar resistencia, se ha propuesto que el desarrollo de antimicrobianos capaces de actuar sobre diferentes blancos terapéuticos como una manera de combatir la generación de resistencia a los mismos, siendo posible que esto sea considerado más sencillo que el desarrollo de terapias combinadas con dos diferentes fármacos, idealmente un antibiótico capaz de actuar en distintos blancos debería hacerlo sobre los vinculados a una misma ruta metabólica de modo que se presente un efecto sinérgico, además es posible que estos blancos no sean solo aquellos relacionados con la inducción directa de la muerte del microorganismo patógeno, sino otros tipos de diana terapéutica que incluyen los factores de virulencia (4), incluidos aquellos que promueven la generación de biopelículas capaces de brindar protección a los microorganismos bacterianos y fúngicos contra los antibióticos (73). El desarrollo de anticuerpos monoclonales también ha representado otra alternativa para el potencial tratamiento de infecciones por bacterias de una manera específica, inclusive en combinación con antibióticos (69).

Dentro de las estrategias utilizadas para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos también se encuentra la síntesis de moléculas derivadas de fármacos actualmente no utilizados en la práctica clínica (6), sin embargo los productos naturales constituyen la principal fuente de

agentes antimicrobianos, inclusive superando en número a los de origen totalmente sintético (18), siendo especialmente importantes los metabolitos secundarios de molécula pequeña sintetizados por bacterias y microorganismos fúngicos, (18,75,87), esto puede deberse a que las moléculas de origen sintético pueden tener obstáculos de permeabilidad sobre las membranas de los microorganismos, mientras las moléculas de origen natural corresponden a productos evolutivos comúnmente seleccionados para permear las membranas de los microorganismos blanco (18).

La investigación para el aislamiento de productos naturales activos contra microorganismos pueden enfrentar barreras como una baja tasa de síntesis por parte de los organismos que los producen, la posibilidad de que estos pierdan la habilidad de sintetizarlos, inestabilidad dada la complejidad de sus estructuras químicas e incluso el no ser efectivos clínicamente una vez que han sido purificados (18), sin embargo este último punto puede eventualmente resolverse a través de la modificación de su estructura para obtener moléculas con un mejor perfil farmacológico y mayor espectro antimicrobiano lo cual es competencia de la química medicinal (19).

Por otra parte, las plantas aún constituyen un elemento de investigación como potenciales agentes en la lucha contra los microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, al punto de despertar el interés de las autoridades en salud humana y animal para su potencial uso terapéutico (23). Son múltiples los reportes de investigaciones publicados en los últimos diez años en los cuales se estudian plantas de importancia etnofarmacología de diversas regiones, un ejemplo es el descubrimiento de la actividad antibacteriana y antifúngica de plantas medicinales de la isla Socotra en Yemen (26,88), India (25), Sudáfrica (27), islas del Caribe (28) así como de plantas comestibles de Camerún (29) y otras empleadas en la medicina tradicional china (24,30).

Es importante mencionar que, las zonas de rica biodiversidad, como la selva del Amazonas, han dado oportunidad para el estudio de las propiedades antimicrobianas de las plantas que en

ellas se desarrollan (31). Este tipo de investigación es útil en cuanto a que orientan la selección de plantas para proceder al estudio del aislamiento y elucidación estructural de sus moléculas activas, mismas que posteriormente puedan ser sometidas al análisis de su relación estructura-actividad para permitir el desarrollo de nuevos antimicrobianos seguros y eficaces (24).

Ejemplo de lo expuesto en el párrafo anterior lo constituye el descubrimiento de la actividad bactericida frente a *H. pylori* demostrada por los extractos etanólicos de las plantas *Curcuma amada* Roxb., *Mallotus philippinesis* (Lam) Muell., *Myrsctica fragrans* Houtt. y *Psoralea corylifolia* L., empleadas tradicionalmente en Pakistán para el tratamiento malestares gastrointestinales (82). Además se ha determinado que la combinación de los aceites esenciales de las plantas *Eucalyptus globulus*, *Dianthus caryophyllus*, *Menthe piperita*, *Thymus vulgaris* permite la obtención de fórmulas con un significativo efecto antibactericida frente a *Escherichia coli* O157:H7, mismas que pueden ser potencialmente empleadas para el tratamiento de la colibacilosis en aves de corral (23).

Por otra parte, los extractos acuosos de frutos como los arándanos, uvas, frambuesas y de hierbas como la albahaca, tomillo, *Brassica olerace* (col rizada), romero, jengibre y de cúrcuma son capaces de inhibir el sistema *Quorum sensing* de la bacteria *Chromobacterium violaceum* en cultivos, los investigadores responsables de estos resultados señalan que este descubrimiento plantea la posibilidad de establecer nuevas estrategias en el combate de bacterias resistentes a antibióticos a través de la inhibición de sus sistemas *Quorum sensing* (89). Resultados análogos se reportan para el extracto etanólico al 70% v/v de la planta *Phyllanthus amarus* (90), tradicionalmente empleada para el tratamiento de enfermedades como la disentería, diarrea, fiebre entre otras (91).

El mecanismo mediante el cual actúan los componentes de los extractos antibacterianos de las plantas *Callicarpa formosana*, *Melastoma candidum* y *Scutellaria barbata* ha sido sujeto a estudio de modo que sea posible determinar que estos actúan sobre las proteínas triacilglicerol lipasa, N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa, flagelina, protein A de membrana externa, Ssp A

(*stringent starvation protein A*), proteína s1 asociada a la subunidad ribosomal 30S y la chaperonina de 60 kDa, las cuales se encuentran vinculadas con la síntesis de proteínas, el mantenimiento de la integridad de la membrana externa o el metabolismo bacteriano, lo que las convierte en potenciales dianas terapéuticas, inclusive ha sido propuesta por los autores de estos resultados la posibilidad de que los componentes de estos extractos actúen por sí solos o bien contribuyendo a un efecto antibacteriano sinérgico (92).

Los productos naturales provenientes de plantas también pueden funcionar como coadyuvantes en la terapia con los antibióticos disponibles en la práctica clínica gracias a que favorecen un incremento del efecto antimicrobiano por medio del desarrollo de un efecto sinérgico (93-94), un ejemplo de esto es el mantenimiento de la actividad antibacteriana de la penicilina frente a *S. aureus* en combinaciones con epigalocatequina galato, una molécula de origen natural (93). En general, los productos naturales obtenidos de plantas, capaces de funcionar de manera sinérgica con los antimicrobianos convencionales, actúan a través de mecanismos que incluyen su efecto sobre blancos conocidos para los fármacos utilizados en la práctica clínica que han sido modificados por mutaciones, inhibición de las enzimas que desactivan los antibióticos, incremento de la permeabilidad bacteriana e inhibición de bombas de eflujo (94-95).

Es importante mencionar que las plantas también pueden proveer de moléculas con actividad antimicrobiana de forma indirecta gracias al albergamiento de microorganismos endófitos responsables de su síntesis, estos microorganismos endófitos generalmente establecen una relación simbiótica con la plantas, de modo que proveen de defensa a la mismas contra fitopatógenos a través de la liberación de metabolitos antimicrobianos (96). Existen reportes de la actividad de diversos policétidos y péptidos sintetizados por microorganismos endófitos contra *Mycobacterium tuberculosis* lo cual constituye una prueba fiable del importante potencial que tienen este tipo de producto natural como punto de partida para el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos (96).

Por otro lado, el descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos con la finalidad de tratar el cáncer constituye un elemento de interés público considerando la alta mortalidad atribuible a esta enfermedad considerada la segunda causa de muerte alrededor del mundo (14-15); la Organización Mundial de la Salud ha definido que el cáncer pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal y de esófago como los tipos de cáncer que más mortalidad producen en hombres, mientras que en las mujeres el cáncer de mama, pulmón, estómago, colorrectal y cervical son los que más muertes produce, sin embargo el cáncer cervical puede ser el principal tipo de cáncer responsable por muertes de mujeres de países en vías de desarrollo (16). Además, el aumento en la incidencia de tumores, los efectos adversos severos producidos por los fármacos empleados actualmente en la quimioterapia y la pérdida de su eficacia, constituyen factores para la constante necesidad por desarrollar nuevas drogas activas contra el cáncer o bien capaces de establecer sinergia con los fármacos utilizados actualmente en la práctica clínica de modo que se pueda reducir la gravedad de sus efectos adversos, siendo por lo tanto relevante el estudio de los agentes citotóxicos que puedan derivarse de productos naturales (17).

Los productos naturales constituyen una fuente importante de moléculas con actividad citotóxica capaces de convertirse en fármacos de utilidad para el tratamiento contra el cáncer, o bien, que puedan servir para la obtención de análogos con mejor perfil farmacológico para su uso clínico (20-22). Las plantas han constituido una fuente importante de moléculas útiles para el tratamiento y la prevención del inicio y progresión metastásica del cáncer, de modo que su estudio ha tomado fuerza en este sentido (15,17,32-34), además las plantas pueden proveer de nuevas moléculas capaces de funcionar como punto de partida para el desarrollo de fármacos contra el cáncer, ejemplos de ello lo representa la vinblastina y la vincristina (sustancias obtenidas a partir de *Catharanthus roseus*), los derivados de la camptotecina (compuesto sintetizado por *Camptotheca acuminata*) como el topotecan e irinotecan, el etopósido derivado de la epipodofilotoxina (compuesto aislado de las raíces de *Podophyllum peltatum*), el paclitaxel (obtenido a partir de *Taxus baccata*, *T. brevifolia*, *T. canadensis*), entre otros (32,35-36).

La determinación de la actividad citotóxica de extractos de plantas sobre líneas celulares de cáncer humano constituye una guía para la selección de especies para el estudio del aislamiento y elucidación estructural de sus componentes activos, esto ha sido de utilidad para la obtención de nuevas moléculas con actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer humano a partir de plantas terrestres de la India utilizadas en la medicina tradicional de ese país (20). A pesar de que se han obtenido productos naturales a partir de plantas que muestran actividad citotóxica *in vitro*, en muchos casos se desconoce su mecanismo de acción preciso, esto se ha convertido en aspecto de interés para la ciencia al punto de que en la literatura se pueden encontrar reportes de la determinación del mecanismo de acción mediante ensayos *in vitro* para compuestos como el epigallocatequina galato (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 6, CDK-6) y la catequina, sustancia presente en el té verde, (inhibición de la topoisomerasa II y unión al receptor del factor de crecimiento endotelial 2, VEGFR-2) (97).

La flora marina, constituida por bacterias, actinobacterias, cianobacterias, microorganismos fúngicos, micro y macroalgas, plantas con inflorescencia, también constituyen una fuente para la obtención de nuevas moléculas con actividad citotóxica que puedan convertirse en fármacos contra el cáncer, ejemplo de este tipo de moléculas lo constituyen las briostatinas, la discodermolida, la eleuterobina y la sarcodictina aisladas a partir de la microflora marina (35). Además, a partir de los organismos animales que habitan en este tipo de ecosistema se han podido obtener nuevos agentes citotóxicos tales como el compuesto kahalido F aislado del molusco *Elysia rufescens*, el cual se cree que es sintetizado por microorganismos que crecen de manera asociados a este animal (35). Los microorganismos en general, han sido una fuente importante para la obtención de productos naturales útiles en el desarrollo de medicamentos contra el cáncer y con otros tipos de actividad biológica (por ejemplo: antibióticos, inmunosupresores, antihelmínticos, antivirales) (87), por lo tanto, no solo el estudio de las plantas representa una oportunidad para el aislamiento de nuevos agentes citotóxicos.

Por otra parte los antioxidantes son reconocidos como una herramienta potencial para la prevención del cáncer mediante la reducción, inhibición o prevención de la oxidación de macromoléculas como enzimas, proteínas, lípidos y ADN mediante la captación de radicales libres lo cual previene el desarrollo de estrés oxidativo, mismo que puede estar relacionado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como el envejecimiento, la enfermedad arterial coronaria, reducción de la función inmunológica, deterioro de la función cerebral, desarrollo de cataratas y el cáncer (37-38). Es importante mencionar que los compuestos fenólicos presentes en las plantas (por ejemplo: taninos, flavonoides, ácidos fenólicos) son reconocidos como poderosos antioxidantes, inclusive con mayor potencia que el ácido ascórbico, α -tocoferol y los carotenoides (37,98-99), por lo tanto no es extraño que en la literatura se indique que los compuestos polifenólicos son potenciales agentes útiles para la prevención del cáncer (17).

Por último cabe destacar que existen resultados de ensayos clínicos de diseño aleatorio doble ciego controlados mediante placebo en los que productos fitofarmacéuticos con uno o más tipos de extractos demuestran la misma eficacia clínica que el fármaco de origen sintético utilizado como estándar de referencia para una aplicación clínica específica, inclusive con una menor incidencia de efectos adversos, lo que se atribuye al efecto sinérgico de sus componentes (93). La sinergia, además representa una posible explicación a la eficacia observada para los productos fitoterapéuticos inclusive cuando su principal componente activo se encuentra a dosis bajas en un extracto de una sola planta o en combinación con el de otras (100). A pesar de estos resultados debe tomarse en cuenta que los productos herbales pueden generar reacciones adversas y en la mayoría de casos es preciso contar con más investigaciones de diseño adecuado que permita el establecimiento de pautas de seguridad para su uso apropiado, de modo que la sustitución de las terapias convencionales con el uso de drogas herbales con escasa evidencia clínica en cuanto a seguridad y eficacia puede representar un riesgo para la salud humana (101).

5.2 Importancia farmacológica del género *Impatiens* (Balsaminaceae).

Impatiens balsamina L. (IB) consiste en una planta comestible (68) relevante desde el punto de vista etnofarmacológico, ejemplos de ello es el uso que se le ha dado a la planta completa en China, conocida con los nombres *Tou Gu Cao* o *Feng Xian Hua*, como agente útil para el alivio de la artritis y otros cuadros nociceptivos, mismo uso que se reporta para otras especies de su género tales como *I. noli-tangere* L. e *I. textori* Miq (102-103), así mismo se reporta el uso de IB en la medicina tradicional de ese país como agente antimicrobiano, antitumoral, antipruriginoso así como recurso terapéutico en casos de proceso de parto dificultoso o dolor puerperal (104), beriberi e hinchazón (105). En Taiwán se reporta el uso de IB como un agente antirreumático y útil para el tratamiento de la hinchazón y dolor en las uñas (106). En Bangladesh IB recibe el nombre de *Dopati*, en este país sus flores son tradicionalmente empleadas para el alivio del lumbago, neuralgias, quemaduras y escoriaciones (46); en Japón los pétalos son utilizados para tratar de forma tópica la dermatitis (41). En Costa Rica, IB puede ser conocida bajo los nombres Balsamina, China o Chinarosa, se reporta su importancia etnobotánica como planta con propiedades catárticas, diuréticas, eméticas, alixéricas frente a piquetes de insectos, antibióticas, expectorante, antitumorales, tónicas, refrigerantes así como agente útil para la remoción de verrugas, tratamiento de mordeduras de serpiente, quemaduras y escoriaciones; mientras en las Guyanas IB es empleada para tratar el panadizo y uñas encarnadas (107).

IB corresponde a la especie del género *Impatiens* más reconocida por presentar múltiples metabolitos con actividades biológicas igualmente diversas, una muestra de ellas es el efecto antianafiláctico demostrado por el extracto etanólico al 35 % v/v de pétalos blancos de IB que se estudio tomando como antecedente el uso del jugo de estos pétalos para tratar de manera tópica la dermatitis y la urticaria (39), esto se definió mediante modelos de inducción *in vivo* de respuesta anafiláctica, uno de estos modelos consiste en que a un grupo de ratones se les aplica por vía intravenosa (I.V) lisozima de clara de huevo de gallina (HEL, por sus siglas en inglés), esta proteína constituye el inductor de la respuesta anafiláctica; en primer instancia la administración de HEL se dió en grupos de ratones previamente tratados con el extracto etanólico, fracciones derivadas de este (a dosis de 100 mg/kg/1 mL por vía oral (V.O)) o bien con compuestos aislados y recristalizados obtenidos a partir del extracto etanólico (a dosis de 10 mg/kg/mL V.O), estos ratones no se encontraban previamente sensibilizados con HEL con la finalidad de observar dicha actividad antes de la producción de IgE, se determinó el porcentaje de ratones fallecidos por choque anafiláctico por grupo de tratamiento, el plasma de

estos ratones posteriormente fue empleado para definir la intensidad de las respuestas cutáneas anafilácticas pasivas (*Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reactions*) en ratas, ensayo que consiste en la administración intradérmica sobre la espalda de rata del plasma de ratón proveniente de alguno de los grupos de los tratamientos anteriormente mencionados para la posterior aplicación intravenosa de HEL y azul de Evans, posteriormente las ratas son sometidas a eutanasia para proceder a la remoción de la piel de la espalda con la finalidad de medir el diámetro de la mancha de azul de Evans en el lado interno de la piel en el sitio de administración del plasma de ratón, el diámetro de la mancha es proporcional a la extensión de la extravasación inducida por la respuesta anafiláctica provocada por la administración intravenosa de HEL (39).

Los resultados obtenidos mediante los ensayos descritos en el párrafo anterior han permitido concluir que el extracto etanólico de flores blancas de IB administrado V.O un día antes de la administración de HEL a los ratones de prueba, reduce significativamente el número de ratones fallecidos por choque anafiláctico, mientras que los resultados obtenidos con la administración de los compuestos aislados y recristalizados del extracto señalan a la nicotiflorina (flavonol) y a la lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) como los principios activos responsables de la reducción de la mortalidad por choque anafiláctico (39). Por otra parte el ensayo de determinación de la intensidad de las respuestas cutáneas anafilácticas pasivas ha permitido definir que el extracto etanólico de flores blancas de IB reduce la generación de IgE (reducción de la sensibilización) por HEL, siendo el kaempferol (flavonol) la principal sustancia responsable de la inhibición de la producción de dicho tipo de anticuerpo, sin demostrar la inducción de una reducción significativa de la mortalidad por choque anafiláctico en los ratones tratados lo cual ha permitido concluir que el kaempferol actúa por un mecanismo diferente al de la lawsona y la nicotiflorina (39). Así mismo, el extracto etanólico al 35 % v/v de flores de IB, tienen la capacidad de inhibir la reducción del flujo sanguíneo en ratones sensibilizados a los que se les induce anafilaxis por la administración intravenosa de HEL, los compuestos kaempferol-3-rutinósido y lawsona son componentes de dicho extracto capaces de exhibir esta misma actividad biológica (108).

Por otra parte, los ensayos anteriores también fueron llevados a cabo en ratones previamente sensibilizados con HEL antes de la administración de los tratamientos ya mencionados a las mismas dosis pero con administración intravenosa o intraperitoneal (I.P) con la finalidad de establecer su actividad antianafiláctica una vez que sea ha dado la producción de IgE por parte

del sistema inmune de los ratones sujetos a prueba, los resultados en este caso señalan que el extracto etanólico de flores blancas de IB permite una reducción significativa de la mortalidad por choque anafiláctico en los ratones tratados, dada la baja solubilidad de los compuestos aislados en solución salina, sólo fue posible para los investigadores el obtener resultados mediante la administración intraperitoneal, los cuales señalan que la lawsona, la nicotiflorina y la 2-metoxi-1,4-naftoquinona son capaces de inducir una reducción significativa de la mortalidad de los animales sujetos a estudio (39).

Destaca la presencia de flavonoles en la fracción *n*-butanólica derivada del extracto etanólico de flores de IB, entre ellos se han identificado a el kaempferol-3-rutinósido, quercetina, quercetin-3-rutinósido, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido y el kaempferol-3-*O*-[2"-*O*- β -L-ramno- piranosil-3"-*O*-D-glucopiranosil]-D-glucopiranosido, con lo que los autores responsables de estos hallazgos han concluido que la reducción de la mortalidad de los ratones tratados con esta fracción se puede deber al conocido efecto que tienen estos flavonoides como inhibidores de la liberación de histamina por parte de mastocitos y del metabolismo del ácido araquidónico, por otra parte también determinaron que la fracción obtenida con acetato de etilo a partir del mismo extracto etanólico debe su capacidad reductiva de la intensidad de las respuestas cutáneas anafilácticas pasivas por el efecto antagonista de la lawsona presente en la fracción sobre el receptor de histamina tipo 1 (39). Cabe hacer mención en este punto, que la lawsona también es considerado como un potencial agente inmunomodulador dada su capacidad de reducir la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de células polimorfonucleares y mononucleares humanas *in vitro* (109).

Por otro lado, tomando en consideración el uso tradicional de los pétalos de IB en Japón como tratamiento tópico de la dermatitis, se ha llevado a cabo el estudio del extracto metanólico del pericarpio del fruto de IB, a partir del cual fueron aislados derivados del dinaftofuran-7,12-diona (balsaminona A y balsaminona B) y 2-metoxi-1,4-naftoquinona, este último compuesto así como la balsaminona B han evidenciado efectos antipruriginosos de mecanismo de acción desconocido estadísticamente significativos con respecto al control negativo al ser utilizados como tratamiento a dosis de 10 mg/kg V.O en el modelo de comportamiento de rascamiento en ratones inducido por compuesto 48/80 (polímero inductor del purito), modelo animal en el cual se da la administración subcutánea (S.C) de compuesto 48/80 de manera posterior a la aplicación de los tratamientos, luego se procede al conteo del número de veces que el animal observado se rasca la nariz en determinado periodo de tiempo desde la administración de las

sustancias a evaluar (40). Destaca el hecho de que estos descubrimientos han servido de antecedente para desarrollo de un método de síntesis química de la balsaminona A (110).

Resultados similares se han obtenido con el extracto etanólico al 35% v/v de pétalos blancos de IB del cual además se aislaron los compuestos kaempferol, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-ramnosildiglucósido, quercetina, quercetin-3-rutinósido, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 2-metoxi-1,4-naftoquinona, tanto el extracto como los compuestos ya mencionados fueron empleados como tratamiento en el modelo rascamiento en ratones inducido tanto por compuesto 48/80 como con dextrano T40 (promotor de la liberación de histamina por mastocitos), los resultados de dicho estudio demuestran una reducción del prurito inducido con dextrano T40 proporcional a la dosis I.V utilizada del extracto etanólico, siendo dicha disminución significativa a partir de dosis de 10 mg/kg, por otra parte los compuestos aislados muestran también dicha actividad, a excepción del kaempferol que no contaba con la solubilidad necesaria para la administración I.V y 2-metoxi-1,4-naftoquinona para la cual el efecto antipruriginoso no es significativo al compararlo con el control negativo, de los compuestos administrados, los glicósidos del kaempferol así como la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona constituyen a los que mayor actividad antipruriginosa demuestran en el modelo animal en cuestión (41).

Mediante el modelo que utiliza el compuesto 48/80 (promotor de la liberación de histamina por mastocitos) como inductor del prurito, se han obtenido resultados que demuestran una actividad antipruriginosa significativa a dosis de 10 mg/kg I.V y 100 mg/10kg/mL V.O cuando fueron administradas 24 horas o 3 horas antes de inducir el prurito, con respecto a los resultados obtenidos por la administración V.O de los compuestos aislados del extracto a dosis de 10 mg/kg, estos señalan que la quercetina, kaempferol, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 2-metoxi-1,4-naftoquinona como las sustancias responsables de la actividad antipruriginosa observada con el extracto de partida cuando son administrados 24 horas antes de inducir el prurito con el compuesto 48/80, mientras el compuesto kaempferol-3-ramnosildiglucósido es el responsable de dicho efecto biológico cuando el extracto se administra V.O 3 horas antes de la inducción del prurito (41).

El extracto etanólico al 35 % v/v de pétalos blancos de IB ha demostrado ser eficaz como agente contra el prurito y la dermatitis atópica severos bajo un modelo de dermatitis atópica en el cual se hacía uso de ratones NC (43), los cuales se caracterizan por desarrollar lesiones

cutáneas similares a la dermatitis atópica en humanos (42), los resultados de esta investigación señalan que el extracto etanólico de los pétalos es eficaz para la reducción y prevención del prurito experimentado por los animales bajo observación a dosis de 100 mg/kg I.V mientras la lawsona y el kaempferol-3-rutinósido, compuestos aislados a partir del extracto en cuestión, son capaces de reducir significativamente el prurito de los ratones NC sujetos a observación a dosis de 10 μ g/kg I.V (43).

Este mismo tipo de extracto ha demostrado tener actividad inhibitoria sobre el decaimiento de la presión arterial mediado por el Factor Activador de Plaquetas (PAF, por sus siglas en inglés), el cual es común en el desarrollo de cuadros de choque anafiláctico, esto ha sido determinado mediante el monitoreo de la presión arterial de ratones ddY previamente sensibilizados con HEL a los que se les indujo una reducción de la presión arterial mediante la administración I.V de PAF a una dosis de 10 μ g/kg, los animales de prueba presentan una menor disminución de la presión arterial que difiere de forma estadísticamente significativa con respecto al control negativo cuando se les administra dosis de 0,01 mg/kg I.V una hora antes de la inyección I.V de PAF, con respecto a los compuestos aislados del extracto, el kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-rutinósido, kaempferol-3-ramnosildiglucósido, quercetina, quercetin-3-glucósido así como 2-hidroxi-1,4-naftoquinona demuestran ser eficaces para revertir el proceso hipotensivo mediado por la administración de PAF cuando se inyecta a dosis de 0,01 mg/kg I.V, los autores de este estudio indican que de estos compuestos solo para la quercetina y el kaempferol existe evidencia publicada que demuestra su actividad como agentes capaces de revertir procesos de agregación plaquetaria y anafilácticos inducidos por PAF lo cual es explicado por la capacidad que tienen estos compuestos de inhibir la síntesis de PAF mediada por las enzimas fosfolipasa A₂ o lizoPAF acetiltransferasa (44). De forma análoga, el kaempferol-3-rutinósido y el kaempferol-3-ramnosildiglucósido son capaces de prevenir significativamente la reducción de la presión arterial al inducir choque anafiláctico por la administración de HEL por I.V en ratones sensibilizados cuando se administran a dosis de 10 mg/kg V.O (45).

El extracto metanólico obtenido por maceración de flores de IB puede presentar diversos tipos de compuestos que incluyen alcaloides, saponinas, glucósidos y taninos (46), este extracto ha demostrado actividad antinociceptiva significativa *in vivo* bajo una serie de pruebas constituida por el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético en ratones, prueba del plato caliente, el modelo de inmersión de cola en agua caliente así como por la prueba de

nocicepción inducida con formalina, modelos llevados a cabo en ratones utilizando dosis de 100, 200 y 400 mg/kg V.O del extracto; destaca el hecho de que mediante la administración simultánea de las dosis ya mencionadas de extracto y de naloxona en ratones bajo los modelos de inmersión de cola en agua caliente y el de plato caliente se ha podido observar que esta última sustancia tiene la capacidad de antagonizar el efecto antinociceptivo del extracto pues dicho efecto es significativamente inferior al mostrado cuando el extracto es administrado como único tratamiento (46). Por otra parte, los resultados obtenidos al administrar las mismas dosis de extracto indican la inducción de depresión de la actividad del sistema nervioso central *in vivo* la cual es dependiente del tiempo desde la administración de los tratamientos, los autores de esta investigación concluyen que el efecto antinociceptivo del extracto metanólico de flores de IB se debe a la presencia de compuestos del tipo 1,4-naftoquinona con la capacidad de inhibir a la enzima COX-2 (46-47) además de tener constituyentes capaces de antagonizar los receptores de opioides lo cual se establece considerando que el efecto antinociceptivo del extracto es antagonizado por la naloxona, la depresión de la actividad del sistema nervioso central podría ser explicada por un aumento en la actividad de los receptores GABA_A que puede ser atribuida a compuestos fenólicos presentes en el extracto, o bien, podría explicarse por la presencia de alcaloides y taninos en el extracto (46).

Como anteriormente se mencionó, IB se caracteriza por sintetizar 1,4-naftoquinonas capaces de inhibir a la enzima COX-2 *in vitro*, dichos compuesto se han obtenido a partir del extracto etanólico al 35 % v/v de corolas de la planta, los autores de dicha investigación indican el aislamiento de impatienolato sódico y balsaminolato sódico como las moléculas capaces de ejercer el efecto inhibitorio sobre COX-2 (47), sin embargo los mismos no señalan haber utilizado algún agente alcalino que tuviese sodio como catión en los procesos de aislamiento y purificación por lo tanto no es claro si estos compuestos originalmente se encuentran en su forma molecular o bien como sal (sal básica) en el tejido vegetal del cual se obtuvo.

En los párrafos anteriores se han resumido resultados de investigaciones que señalan la utilidad potencial de IB y algunos de sus metabolitos para el tratamiento de cuadros anafilácticos, pruriginosos y nociceptivos, sin embargo IB se caracteriza por tener metabolitos con otras actividades biológicas en partes anatómicas distintas a la flor, un ejemplo claro de ello es el aislamiento de 2-metoxi-1,4-naftoquinona a partir del extracto clorofórmico obtenido mediante el reflujo de las hojas con dicho disolvente orgánico, lo cual se logró mediante el fraccionamiento de dicho extracto guiado por ensayo biológico así como por cromatografía de

capa fina, en este caso el ensayo biológico consistió en la prueba de determinación de viabilidad celular monitorizada por la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán por parte de las células de la línea HepG2 de hepatocarcinoma humano, con lo cual se determinó la capacidad del extracto y sus fracciones para ejercer citotoxicidad sobre células cancerosas específicas así como del compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona como principal responsable de dicha actividad (48).

Por otro lado el extracto metanólico de IB ha demostrado tener la capacidad de inducir la apoptosis de células de cáncer oral HSC-2 mediante la activación de la ruta de transducción de señales asociada a la proteína quinasa activada por AMP (AMPK siglas en inglés de *AMP-activated protein kinase*) así como por promover la expresión de proteínas mitocondriales tales como t- Bid, Bak y Bad lo que contribuye a la pérdida de estabilidad del potencial de membrana mitocondrial y por ende a la liberación de citocromo C y la activación de la caspasa 9, esto se estableció al hacer una integración de los resultados de diversos ensayos que incluyen la determinación de la viabilidad celular por monitoreo de la reducción de metanotiosulfonato (MTS) a formazan, la determinación de los niveles de fosforilación de quinasa (*Human phospho-kinase proteome profiling*), western blotting para cuantificación de proteínas específicas, determinación de cambios morfológicos nucleares (fragmentación del núcleo apoptótico) así como determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante la detección de cambios en la intensidad de la señal fluorescente proveniente del medio con células HSC-2 y el reactivo JC-1 (111).

El extracto metanólico de IB demuestra también actividad citotóxica contra células humanas de cáncer oral de las líneas HSC-4 y OSC-20 de manera dependiente la dosis, esto según los resultados del ensayo de determinación de la viabilidad celular por medio de la prueba de exclusión con azul de tripano, por otra parte la determinación de los niveles de caspasa 3 y proteína PARP en lisados de células HSC-4 tratadas con el extracto indican que la citotoxicidad se presenta predominantemente por apoptosis, además posee la capacidad de reducir la expresión Akt (112), la cual está vinculada a procesos de crecimiento y proliferación celular, así como a la resistencia a la apoptosis, contribuyendo por lo tanto a la supervivencia celular (113).

El compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona aislado de IB posee además actividad citotóxica contra células de adenocarcinoma gástrico de la línea MKN45, lo cual se definió tomando en consideración los resultados de la prueba de viabilidad celular por reducción de MTT que

indican una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis de 2-metoxi-1,4-naftoquinona, el uso de técnicas de citometría de flujo ha permitido establecer que 2-metoxi-1,4-naftoquinona es capaz de inducir la apoptosis y la suspensión del ciclo celular entre las fases S y G₂/M, sin embargo el uso de técnicas citometría de flujo que incluyen el empleo del reactivo YO-PRO-1/PI, el cual permite diferenciar las células necróticas de las apoptóticas, ha permitido concluir que la muerte de las células de la línea MKN45 inducida por 2-metoxi-1,4-naftoquinona se debe en mayor grado por necrosis que por apoptosis, el predominante proceso necrótico se explica por la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno favorecida al tratar las células con 2-metoxi-1,4-naftoquinona, por otro lado, el proceso apoptótico observado en parte de las células tratadas con 2-metoxi-1,4-naftoquinona está mediado por la reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial así como por un aumento de los niveles de caspasa 9 y de la liberación de citocromo C (49). Estos resultados, aunado al demostrado efecto antimicrobiano sobre *Helicobacter pylori* exhibido por 2-metoxi-1,4-naftoquinona, han permitido a los autores del estudio generador de los resultados ya mencionados concluir que esta molécula constituye un candidato potencial para el tratamiento las enfermedades relacionadas con *Helicobacter pylori* (49).

El compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona ha demostrado ser efectivo como agente citotóxico contra células humanas de adenocarcinoma de mama de la línea MDA-MB-231, esto de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de viabilidad celular conocida como ensayo de exclusión de azul de tripano, los cuales señalan una reducción de la viabilidad celular que es dependiente de la dosis de 2-metoxi-1,4-naftoquinona, por otra parte este compuesto tiene la capacidad de inhibir la migración e invasión de las células de carcinoma de mama humano *in vitro* lo que indica que 2-metoxi-1,4-naftoquinona puede oponerse de manera potencial a la metástasis de las células de adenocarcinoma utilizadas en los ensayo de invasión en Matrigel y de migración de la cicatrización (*wound-healing migration assay*), además mediante zimografía en gelatina se ha determinado que 2-metoxi-1,4-naftoquinona induce una reducción de actividad proteolítica de la proteasa MMP-9, una de las responsables de favorecer la migración de las células tumorales mediante la inducción de la rotura la capa basal de las membranas que circunscriben a las células tumorales (114).

Por otra parte, la 2-metoxi-1,4-naftoquinona aislada a partir del extracto metanólico de partes aéreas de IB, ha demostrado la capacidad de inhibir la actividad transcripcional del complejo proteico TCF/ β -catenina (TOP) *in vitro* a través del ensayo de luciferasa diseñado para este

fin (115), proceso que constituye el punto de convergencia de la transducción de la señal activadora del receptor Wnt y que juega un papel trascendente en los procesos de cambio morfológico, proliferación, diferenciación y motilidad celular, lo que ha permitido proponer que las moléculas capaces de inhibir dicha ruta de transducción de señales pueden constituir potenciales agentes supresores del crecimiento de células cancerosas (115-116). Otro constituyente citotóxico de IB es la balsaminona C, compuesto derivado del dinafofuran-7,12-diona, esta sustancia posee efecto citotóxico sobre las líneas celulares A549, Bel-7402 y HeLa, de cáncer humano de pulmón, hepatoma humano y cáncer cervical humano respectivamente (117).

La extracción mediante reflujo con etanol al 75 % v/v a 78 °C de las flores de IB y el posterior fraccionamiento de este extracto mediante cromatografía de columna ha permitido el aislamiento y elucidación estructural de 18 compuestos, de los cuales butoxi-2-*O*-(4-hidroxibenzoil)-4,6-dihidroxifenilacetato, (6-*O*-*p*-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-2-*O*-(4-hidroxibenzoil)-4-*O*- β -D-glucopiranosil-6-hidroxifenilacetato, ácido 4-*O*- β -D-glucopiranosil-2,6-dihidroxifenilacetico, kaempferol-3-*O*-rutinósido, rutina, kaempferol 3-*O*- α -ramnósido-7,4-di-*O*- β -galactósido, 6-metoxikaempferol-3-*O*- β -D-glucosil(1'' \rightarrow 2'')- β -D-glucopiranosil-(6'''-(*E*)-cafeoil)-7-*O*- β -D-glucopiranosido, dihidromiricetina y miricetina, demuestran una clara actividad inhibitoria sobre células estrelladas hepáticas de origen murino (t-HSC/Cl-6) por medio del ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT, esto permite considerar a dichas sustancias como potenciales agentes contra la fibrosis hepática (50). Del extracto anterior se aislaron los compuestos ácido 1,2-*O*-(4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxifenilacetico, metil-2-*O*-(4-hidroxibenzoil)-4-*O*- β -D-glucopiranosil-6-hidroxifenilacetato, butoxi-2-*O*-(4-hidroxibenzoil)-4,6-dihidroxifenilacetato, (6-*O*-*p*-coumaroil)- β -D-glucopiranosil-2-*O*-(4-hidroxibenzoil)-4-*O*- β -D-glucopiranosil-6-hidroxifenilacetato, ácido 4-*O*- β -D-glucopiranosil-2,6-dihidroxifenilacetico, kaempferol, quercetina, kaempferol-3-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-rutinósido, rutina, dihidromiricetina y miricetina, los cuales muestran actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima α -glucosidasa, siendo el segundo, tercero y cuarto de los compuestos enlistados anteriormente los que mayor actividad de demuestran, lo que implica que estos compuestos pueden constituir potenciales agentes para el tratamiento de la diabetes (50).

A partir del extracto etanólico al 35% v/v de partes aéreas de IB ha sido posible aislar a la bisnaftoquinona conocida como impatiénol, tanto este compuesto como la fracción obtenida

por la extracción con acetato de etilo aplicada al residuo seco del extracto etanólico demuestran la capacidad de inhibir la actividad de la enzima 5 α -reductasa *in vitro* (118). La enzima 5 α -reductasa cataliza la conversión de la testosterona al andrógeno intracelular dihidrotestosterona (DHT) de mayor potencia (118), por lo tanto es válido considerar al impatienol como potencial agente terapéutico contra problemas de salud asociados a un alta tasa de producción de DHT como la seborrea, el acné, hirsutismo, alopecia androgénica (118-119) así como la hipertrofia prostática benigna (118,120).

Los extractos liofilizados obtenidos a partir de la maceración con etanol al 70% v/v de hojas y tallos de IB, han demostrado tener actividad antioxidante que varía de manera importante según la época del año en que se lleva a cabo la recolección del material vegetal, siendo los extractos de hojas los que mayor capacidad captadora de radicales posee en comparación con los de tallo inclusive superando al butildihidroxianisol (BHA) empleado como control positivo en el método basado en la disminución de la absorbancia de las disoluciones del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (51).

Tendencias similares se obtienen para los resultados de la prueba de inhibición del crecimiento microbiana en disco o difusión en agar en lo que respecta a su variación según la época anual en la que se lleva a cabo la recolección del material vegetal, estos resultados demuestran que el liofilizado obtenido a partir de las hojas de IB posee mayor potencia antimicrobiana así como efecto sobre un mayor número de microorganismos patógenos en comparación con el liofilizado obtenido con tallos, los microorganismos de prueba correspondieron a *Staphylococcus aureus* ATCC12692, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802, *Bacillus cereus* KFRI 181, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Escherichia coli* KFRI 836, *Candida albicans* 00116 KCTC 7007, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, sin embargo los resultados de la investigación a la que se hace referencia señalan que solo sobre *Escherichia coli* KFRI 836 es posible observar mayor potencia antimicrobiana por parte del liofilizado obtenido con tallos en comparación al obtenido con hojas de IB, los investigadores atribuyen la tendencia observada en los resultados, la cual señala al liofilizado obtenido con hojas como el de mayor actividad antioxidante así como el de mayor actividad antimicrobiana sobre la mayoría de microorganismos de prueba, a la mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales determinada en este liofilizado en comparación a la concentración de dichas sustancias presentada por el liofilizado del extracto de tallos (51).

Por otra parte, las fracciones obtenidas con éter de petróleo, éter dietílico, cloroformo, metanol a partir del extracto producido a partir del polvo de tallos secos de IB usando éter de petróleo (60-90 °C) como disolvente extractor así como ultrasonido como facilitador mecánico del proceso de extracción, demuestran tener actividad antimicrobiana contra *Penicillium italicum* ATCC 30399, *Penicillium digitatum* ATCC 30389, *Escherichia coli* ATCC 01630, *Shigella boydii* ATCC 04121, *Bacillus subtilis* ATCC 10618, *Staphylococcus aureus* Rosenbach ATCC 01338, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen ATCC 21135, *Candida utilis* (ATCC 20059), *Aspergillus niger* ATCC 30391, *Aspergillus oryzae* ATCC 30789 de acuerdo al método cilindro-placa para observación de actividad antimicrobiana (52). Sin embargo, cabe hacer la aclaración de que los resultados de la investigación a la que se hace referencia demuestran que la fracción obtenida con éter de petróleo es capaz de ejercer efecto antimicrobiano sobre todos los microorganismos anteriormente mencionados exceptuando a *Escherichia coli* ATCC 01630, en el caso de la fracción obtenida con cloroformo se tiene que esta no tiene actividad antimicrobiana únicamente sobre *Escherichia coli* ATCC 01630, *Staphylococcus aureus* Rosenbach ATCC 01338, mientras que la fracción metanólica solo demostró efecto antimicrobiano sobre *Bacillus subtilis* ATCC 10618 y *Shigella boydii* ATCC 04121, adicionalmente a esas fracciones los investigadores obtuvieron una con agua, sin embargo esta mostró nulo efecto antimicrobiano (52).

Los resultados anteriores relacionados con la actividad antimicrobiana exhibida por extractos de material vegetal de IB, son consistentes con los de otras investigaciones en las cuales se ha logrado identificar el componente activo responsable del evidenciado efecto antibiótico sobre microorganismos específicos que tienen los extractos de IB. Desde el año de 1948 existe el reporte del aislamiento y elucidación estructural del compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona a partir de IB mediante la extracción por agitación de sus flores secas con éter y la posterior purificación de 2-metoxi-1,4-naftoquinona mediante cromatografía de columna y recristalización, la actividad antifúngica de este compuesto fue demostrada sobre el microorganismo *Rhodotorula glutinis*, destaca además el hecho de que los autores de este mismo estudio también reportan actividad antimicrobiana para el extracto alcohólico de flores de IB sobre los microorganismos *Monilinia fructicola* ATCC 9962, *Colletotrichum lindemuthianum* Vt-2, *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Penicillium notatum* ATCC 9178, *Pythium debaryanum* ATCC 9998, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Staphylococcus aureus* cepa Florey (121).

El fraccionamiento mediante cromatografía de columna del extracto de partes aéreas de IB, obtenido por reflujo del material vegetal seco con etanol al 95% v/v, guiado por el ensayo de determinación de letalidad en camarón (*Artemia salina*) y con cromatografía en capa fina, ha permitido aislar al compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona, este demostró ejercer actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* 236, *Staphylococcus aureus* Cowan, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* 168, *Aeromonas salmonicida* A449, *Aquaspirillum serpens* VHL, a una concentración mínima inhibitoria (CMI) superior a la del cloranfenicol utilizado como control positivo en el ensayo de dilución en caldo, únicamente sobre *A. salmonicida* A449, un patógeno de peces, se observa una menor CMI en comparación con el cloranfenicol, sin embargo en el caso de las bacterias *Enterobacter aerogenes* 62-1, *Escherichia coli* B, *Proteus mirabilis*, *Burkholderia cepacia* y *Salmonella typhimurium* se tiene que 2-metoxi-1,4-naftoquinona es incapaz de ejercer efecto inhibitorio sobre su crecimiento a dosis de 30 μ g de acuerdo a los resultados del ensayo de difusión en disco (53).

También se ha procedido a la determinación de la capacidad antifúngica de 2-metoxi-1,4-naftoquinona por el método de difusión en disco sobre los patógenos humanos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* CN1A, *Candida albicans* D10 (ambas cepas son resistentes al fluconazol y a la anfotericina B), *Candida albicans* al-1 y *Candida albicans* al-2, ante todas ellas la 2-metoxi-1,4-naftoquinona demostró tener eficacia como antifúngico inclusive a una concentración mínima letal (CML) inferior a la de la anfotericina B, excepto sobre *C. albicans* al-2 para la cual la CML determinada es superior que la de la anfotericina B (53). Los autores responsables de la investigación que provee estos resultados, señalan que es evidente que la 2-metoxi-1,4-naftoquinona es el principal responsable de la actividad antimicrobiana demostrado por los extractos de partes aéreas de IB (53).

A partir de las raíces generadas por el cultivo de tejido de hoja de IB en medio B5 y la extracción de este material vegetal previamente secado mediante reflujo con acetato de etilo y metanol, ha sido posible el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos 2-metoxi-1,4-naftoquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, espinasterol (fitoesterol), diftiocol (dinaftoquinona), escopoletina (cumarina) e isofraxidina (cumarina) (122). La escopoletina ha evidenciado tener la capacidad de inhibir la liberación de citoquinas a través del bloqueo de la transducción de la señalización mediada por I- κ B/NF- κ B en la línea celular de mastocitos humanos HMC-1, lo que sugiere su potencial utilidad como agente regulador de los procesos

inflamatorios mediados por mastocitos (123), este mismo compuesto ha demostrado tener actividad antibacteriana frente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* MIP 96016, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a través de método de microdilución (124), la literatura también reporta que la escopoletina puede tener actividad antibiótica frente *Mycobacterium tuberculosis* así como efecto hipotensor tanto *in vitro* como *in vivo* (125). El espinasterol por su parte puede ser un modulador de los receptores nucleares X hepáticos (LXR α y LXR β) los cuales inducen la expresión de los genes BCA1 y ABCDG1, procesos relacionados con la homeostasis del colesterol, esto sugiere que este fitoesterol podría ejercer un papel protector mediante la modulación del metabolismo del colesterol (126).

La actividad antimicrobiana de las naftoquinonas diftiocol, lawsona y 2-metoxi-1,4-naftoquinona, compuestos que se encuentran en las hojas de IB, ha sido comparada bajo el método de dilución en agar, los resultados señalan a 2-metoxi-1,4-naftoquinona como el compuesto con mayor potencia antimicrobiana frente a dermatofitos fúngicos y *C. albicans* teniendo una menor potencia frente a bacterias anaeróbicas, aeróbicas y anaeróbicas facultativas; por otra parte la lawsona solo tiene actividad moderada y baja frente a dermatofitos fúngicos y bacterias aeróbicas respectivamente, este compuesto no fue capaz de demostrar actividad frente a *C. albicans* ni contra bacterias anaeróbicas facultativas (127). La bisnaftoquinona derivada de la lawsona conocida como diftiocol o metilen-3,3'-bilawsona, únicamente fue capaz de ejercer efecto antimicrobiano significativo sobre *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* (127).

Los antecedentes que demuestran la relevante actividad antifúngica de 2-metoxi-1,4-naftoquinona han dado pie a investigar su papel como terapia en seres humanos, un ejemplo claro de ello es el estudio clínico de diseño cruzado llevado a cabo para la comparación del efecto profiláctico contra la candidiasis oral entre un enjuague bucal al 0,025% de 2-metoxi-1,4-naftoquinona contra otro al 0,12 % de clorhexidina, los resultados de dicho estudio llevado a cabo en 22 individuos portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) así como en 32 individuos portadores de prótesis dentales señalan que el enjuague bucal con 2-metoxi-1,4-naftoquinona tiene una potente acción reductora del número de microorganismos del género *Candida* presentes en la cavidad oral en términos de unidades formadoras de colonias por mL, las muestras fueron tomadas mediante la técnica del enjuague oral para la recolección de muestras microbianas de la cavidad bucal de los sujetos experimentales, sin

embargo el efecto antifúngico sobre *Candida spp.* es menor en comparación al observado enjuague al 0,12% con clorhexidina, por otra parte destaca que para los individuos experimentales el enjuague con 0,025% de 2-metoxi-1,4-naftoquinona presenta mejores propiedades organolépticas (128). Los autores de dicha investigación concluyen que el enjuague bucal con 2-metoxi-1,4-naftoquinona representa un buen candidato como terapia para el tratamiento profiláctico de la candidiasis oral en pacientes portadores de prótesis dentales, VIH o inmunosupresos, sin embargo se debe investigar cual es la dosis más adecuada para obtener mejores resultados con respecto a la clorhexidina (128).

Los compuestos 2-metoxi-1,4-naftoquinona, aislado a partir del fruto de IB, y espinasterol, aislado a partir de las hojas, raíz y tallos de esta misma planta, han demostrado tener actividad antibiótica contra *Helicobacter pylori*, sin embargo la CMI así como la concentración mínima bactericida (CMB) para el espinasterol resulta excesivamente elevada en comparación con la CMI y CMB determinada para 2-metoxi-1,4-naftoquinona y la amoxicilina empleada como control positivo, estos parámetros fueron determinados con las cepas ATCC 700824, ATCC 43504, y ATCC 43526 las cuales son resistentes al metronidazol, así como en las cepas KMUH 4917, KMUH 4952, KMUH 4967 obtenidas de muestras clínicas las cuales muestran resistencia cruzada ante el metronidazol, claritromicina y levofloxacino, las seis cepas utilizadas en la investigación en cuestión son sensibles a la amoxicilina (129). Los resultados del estudio al cual se hace referencia demuestran que únicamente sobre la cepa KMUH 4952 se logra obtener valores de CMI y CMB inferiores para 2-metoxi-1,4-naftoquinona en comparación a los obtenidos con la amoxicilina, sin embargo son inferiores a los determinados con todas las cepas tratadas metronidazol, destaca el hecho de que el efecto antibacterial y bactericida de 2-metoxi-1,4-naftoquinona no es influenciado significativamente por cambios en el pH del medio en el que se encuentra *H. pylori* a diferencia de lo que sucede con la amoxicilina y la claritromicina (129). En este estudio también se determinó cuantitativamente el nivel de 2-metoxi-1,4-naftoquinona en extractos de las diversas partes anatómicas de IB (fruto, hojas, tallo, flor, semilla y raíz) por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), dicho análisis indica al fruto como porción anatómica en la que se presenta mayores niveles de 2-metoxi-1,4-naftoquinona (129). Por otra parte, los autores proponen que 2-metoxi-1,4-naftoquinona actúa sobre *H. pylori* mediante la inducción de la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de inutilizar las macromoléculas elementales para la sobrevivencia de la bacteria, los mismos concluyen que la 2-metoxi-1,4-

naftoquinona es un fuerte candidato como potencial tratamiento de las infecciones provocadas por *H. pylori* (129).

Análogamente a lo descrito en el párrafo anterior, se han determinado los valores de CMI y CMB para los extractos obtenidos con diversas secciones anatómicas de IB, así como con diferentes disolventes de extracción, sobre las mismas cepas de *H. pylori* mencionadas en el párrafo anterior más KMUH 4897, KMUH 4942, KMUH 4962 y KMUH 4972 (106). Los extractos de diversas partes anatómicas de IB obtenido con etanol al 95% señalan que en general el extracto de frutos es el de menores valores de CMI y CMB, mientras el de la combinación de hojas, tallo y raíz es el que mayor valor tiene para estos parámetros, en el caso de los extractos de semillas y de planta entera, los valores de CMI son solo inferiores para el extracto de semillas sobre las cepas ATCC 700824 y ATCC 43526 con respecto al de planta entera mientras que para el resto de cepas los valores de CMI son iguales; los valores de CMB son menores para el extracto de semillas en comparación con el de planta entera cuando se hace la determinación sobre las cepas ATCC 43526, KMUH 4917 y KMUH 4962, lo contrario se reporta para las cepas ATCC 43504, KMUH 4897 y KMUH 4967, para el resto de cepas el valor de CMB es el mismo (106). Para los extractos de fruto obtenidos con diferentes disolventes, se procedió a la determinación de CMI y CMB solo con las cepas ATCC 700824, ATCC 43504 ATCC 43526, KMUH 4917, KMUH 4952 y KMUH 4967, a partir de ello se reporta que el disolvente con mayor CMI para todas las cepas es el agua, seguido por el n-hexano, en el caso de la acetona se tiene que este valor solo difiere con respecto al obtenido con acetato de etilo en dos cepas, sobre ATCC 43504, con un menor CMB, y sobre KMUH 4967, con un mayor valor de CMB (106). Los investigadores de este estudio también determinaron que los valores de CMI y CMB no son afectados significativamente por cambios en el pH del medio de cultivo de las cepas de *H. pylori* lo que coincide con los resultados de la investigación citada en el párrafo anterior (106).

Las naftoquinonas no son los únicos metabolitos antimicrobianos sintetizados por IB, a partir de las semillas de esta planta se han aislado los péptidos Ib-AMP1, Ib-AMP2, Ib-AMP3 y Ib-AMP4, los cuales se encuentran constituidos por secuencias de 20 aminoácidos y provienen de un transcripto en común, estos han demostrado actividad antimicrobiana sobre bacterias y microorganismos fúngicos, específicamente Ib-AMP1 ha evidenciado actividad antibacteriana frente a las gram positivas *Bacillus subtilis* (JHCC 55331), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), también lo ha

demostrado contra las gram negativas *Escherichia coli* (HB101), *Proteus vulgaris* (JHCC 558711) y *Pseudomonas solanacearum* (R48/a) pero a concentraciones inhibitorias 50 (IC50, por sus siglas en inglés) muy superiores en comparación a las observadas sobre las bacterias gram positivas (130). El péptido Ib-AMP4 muestra la mayor potencia antibacteriana ante las bacterias gram positivas mencionadas anteriormente y sobre las bacterias gram negativas puestas a prueba correspondientes a *Escherichia coli* (HB101), *Proteus vulgaris* (JHCC 558711), *Pseudomonas solanacearum* (R48/a), *Xanthomonas campestris* patovar *pelargonii* (INRA 10342) y *Xanthomonas oryzae* (ETH 698), sobre todas ellas Ib-AMP4 presenta una LD50 determinada, sin embargo solo sobre las dos últimas se obtienen valores de dicho parámetro tan bajos como los obtenidos con las bacterias gram positivas mientras que para el resto el valor de LD50 es muy elevado al tomar los obtenidos con las bacterias gram positivas como referencia (130). Ib-AMP4 es además un péptido que se ha logrado obtener por tecnología de ADN recombinante, este inclusive ha demostrado actividad antimicrobiana en clara sinergia con el monoterpeno timol sobre *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos (KPC) ATCC700603 y con vancomicina o oxacilina sobre *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC51299 (131); una de los métodos reportado para la producción de Ib-AMP4 por tecnología de ADN recombinante es la introducción del vector plasmídico pET32a-Trx-Ib-AMP4 en *E. coli* que logra traducirse en forma exitosa en el péptido antimicrobiano, que demuestra actividad frente *S. aureus* meticilina resistente y *E. coli* resistente a antibióticos β -lactámicos (132).

En lo correspondiente a la actividad antifúngica de los péptidos Ib-AMP1, Ib-AMP2, Ib-AMP3 e Ib-AMP4 se reporta la determinación de sus valores de IC50 sobre microorganismo fúngicos reconocidos como fitopatógenos de interés para la agricultura, destaca que Ib-AMP4 corresponde al péptido que demostró tener eficacia sobre un mayor número de microorganismos fúngicos, por otra parte, Ib-AMP1, Ib-AMP2 e Ib-AMP3 presenta valores de IC50 determinados sobre *Alternaria longipes* (CBS62083), *Botrytis cinerea* (K1147), *Cladosporium sphaerospermum* (K0791), *Fusarium culmorum* (K0311), *Penicillium digitatum* (K0879), *Trichoderma viride* (K1127) y *Verticillium alboatrum* (K0937) que varían ampliamente de acuerdo a la fuerza iónica del medio de cultivo de los microorganismos, inclusive en mayor grado que los demostrados por Ib-AMP4 (130). Los péptidos Ib-AMP4 e Ib-AMP2 poseen la ventaja de no demostrar efecto alguno sobre la integridad de fibroblastos de piel humano ni sobre eritrocitos humanos, para los otros dos péptidos, en la investigación en cuestión no se reporta la determinación de estas propiedades (130). Por otra parte Ib-AMP1

ha demostrado tener capacidad antibacteriana sobre patógenos que pueden transmitirse por la ingesta de alimentos contaminados tales como *Staphylococcus aureus* ATCC 10832, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Salmonella enteric* serovar Newport, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Bacillus cereus* ATCC 9818 (133), así mismo se reporta que Ib-AMP1 y análogos lineales sintéticos de este péptido tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* KCTC 3068, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* meticilina resistente CCARM 3543 y *P. aeruginosa* multirresistente a antibióticos CCARM 2095 (134).

El descubrimiento de los péptidos anteriormente mencionados ha dado pie a la investigación del efecto antifúngico que pudiesen tener derivados sintéticos de los mismos, los péptidos sintéticos MCE01 y MCE02 se derivan de Ib-AMP1 e Ib-AMP4 respectivamente, estos consisten en el péptido obtenido al sustituir los residuos de cisteína de las posiciones 6,16, 17 y 20 por ácido L- α -aminobutírico, los péptidos MCD26 y MCD30 son los análogos sintéticos de Ib-AMP1 e Ib-AMP4 respectivamente para los cuales todos los L-aminoácidos han sido sustituidos con D-aminoácidos mientras los residuos de cisteína de las posiciones anteriormente mencionadas han sido sustituidos con ácido D- α -aminobutírico, también se sintetizó una amplia serie de péptidos derivados de Ib-AMP4 y de MCE02 en los cuales se sustituye sistemáticamente un aminoácido de posición por un residuo de arginina o uno de triptófano (135).

Los resultados de la determinación de la actividad antifúngica de Ib-AMP1, Ib-AMP4, MCE01 y MCE02 sobre *Botrytis cinerea* JHCC 8973, *Fusarium culmorum* IMI180420, *Neurospora crassa* FGSC 2489, *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 y *Pichia pastoris* GS115 a través de la medición de la densidad óptica de sus cultivos tratados con los péptido en placas de microtitulación demuestran que Ib-AMP4 es el péptido más activo, sobre todo ante *F. culmorum*, siendo el que menores cambios presenta en su actividad al elevar la fuerza iónica del medio de cultivo, sin embargo la sustitución de aminoácidos puntuales de Ib-AMP4 y MCE02 por residuos de arginina o triptófano no demuestra un incremento de la actividad antifúngica mayor al doble de la de Ib-AMP4 sobre *F. culmorum*, sin embargo permite la obtención de péptidos como MCC17 (obtenido sustituyendo la glicina de la posición 3 por triptófano en la secuencia de Ib-AMP4) capaces de mantener su actividad aún en incrementos bruscos de la fuerza iónica del medio de cultivo (135).

Las pruebas de toxicidad sobre células de mieloma de ratón por el ensayo de exclusión por azul de tripano así como la determinación de actividad hemolítica de los péptidos sobre eritrocitos de conejo demuestran una menor toxicidad celular y capacidad hemolítica para los péptidos Ib-AMP1 e Ib-AMP4, mientras estas son mayores para los derivados sintéticos, siendo MCC17 el que mayor toxicidad y capacidad hemolítica demuestra lo que constituye una limitante para su potencial uso con fines terapéuticos (135). El péptido Ib-AMP3 por su parte, ha demostrado una baja capacidad fungicida sobre conidias germinadas de *Aspergillus flavus* no así contra las no germinadas, esta actividad es mayor tanto sobre las conidias germinadas y no germinadas de *Fusarium moniliforme*, los resultados de ensayos para la determinación de capacidad de unión de este péptido sobre diversas biomoléculas de la pared de las conidias señalan que Ib-AMP3 puede unirse fuertemente a la quitina, no así sobre galactocerebrosidos, ergosterol y colesterol, para los cuales se tiene que la unión es débil (136)

El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos hallados en las semillas de IB ha sido sujeto de estudio, bajo esta línea de investigación se ha determinado que el efecto antibacteriano de Ib-AMP1 no se debe a su acción directa sobre la membrana citoplasmática bacteriana, existiendo una mayor posibilidad de que el blanco de dicho péptido sea un componente intracelular, sin embargo los péptidos sintéticos lineales (sin puentes disulfuro en su estructura) derivados de Ib-AMP1 pueden mostrar una actividad antibacteriana entre 3,7 a 4,8 veces mayor la mostrada por Ib-AMP1 sin alteraciones estructurales, lo cual ha demostrado que los puentes disulfuro no son un requisito indispensable para exhibir la actividad antibacteriana, el mecanismo de acción de estos análogos se relaciona con la formación de poros en la membrana citoplasmática bacteriana que permite el paso de iones hacia el interior de la célula bacteriana blanco lo que promueve la lisis de esta última por choque osmótico (134). Con respecto al mecanismo de acción de Ib-AMP1 sobre microorganismos fúngicos, en específico sobre *C. albicans*, se determinó que este péptido no actúa por formación de poros o canales en la membrana celular, por lo tanto Ib-AMP1 ejerce su efecto antifúngico mediante la inhibición de otro proceso celular cuya determinación es aún pendiente (137).

El kaempferol obtenido por extracción con metanol de flores secas de IB también ha demostrado efecto antibacteriano, específicamente sobre *Propionibacterium acnes*, lo mismo se reporta para la quercetina (138), otro producto natural encontrado en IB (41), el valor de CMI para ambos es menor o igual a 32 µg/ml sobre *P. acnes* sensible a clindamicina y menor

o igual a 64 µg/ml sobre la cepa CCARM 9010 resistente a clindamicina, ambos flavonoides tienen además un efecto sinérgico significativo con eritromicina y clindamicina sobre *P. acnes* CCARM 9010, sin embargo con eritromicina se requiere de altas concentraciones para ejercer el efecto sinérgico lo que hace a las combinaciones con kaempferol y quercetina no prácticas desde el punto de vista clínico por los riesgos de toxicidad por eritromicina, sin embargo las combinaciones con clindamicina tanto con kaempferol como con quercetina muestran sinergia a concentraciones de clindamicina que indican la posibilidad de que sea viable su uso clínico para el tratamiento del acné producido *P. acnes* (138).

Evidentemente muchas son las actividades farmacológicas científicamente atribuibles a IB, sin embargo esta no es la única planta de su género capaz de evidenciar la presencia de metabolitos con actividad biológica determinada. A partir del extracto metanólico de rizomas de *Impatiens pritzellii* Hook f. var. *hupehensis* Hook (54), utilizados tradicionalmente en China para el tratamiento del reumatismo, diarrea y dolor estomacal (139), fueron aisladas las saponinas triterpénicas impatiprin A, impatiprin B e impatiprin C cuya citotoxicidad fue sometida a prueba sobre las línea HeLa de carcinoma escamoso cervical humano, HepG2 de hepatoma humano y S-180 de sarcoma murino por medio del ensayo de reducción de MTT a formazán, los resultados demuestran citotoxicidad para impatiprin A y impatiprin B con valores de IC50 superiores a los observados para el 5-fluorouracilo empleado como control positivo, siendo impatiprin B la que menor IC50 demostró entre las dos saponinas mencionadas, impatiprin C por su parte no demostró citotoxicidad ante ninguna de las líneas celulares de prueba (54).

El extracto metanólico de los rizomas de *I. pritzellii* var. *hupehensis*, así como la fracción *n*-butanólica derivada de este, han evidenciado actividad inmunomoduladora *in vivo* a través del modelo de artritis inducida con colágeno en ratones BABL/c macho, la administración de 1,12 g/kg V.O de extracto metanólico así como de 0,53 g/kg V.O de fracción *n*-butanólica provoca una reducción significativa de la severidad de la artritis inducida en los animales, los ratones tratados con el extracto metanólico a dosis de 1,12 y 1,68 g/kg V.O y con la fracción *n*-butanólica a dosis de 0,40 y 0,53 g/kg V.O demuestran por su parte una reducción de los índices tímico y esplénico, una disminución de los niveles séricos de IgG, INF e IL-18, así como un incremento sérico de IL-10, estos resultados demuestran el potencial rol inmunomodulador que puede tener el uso de rizomas de *I. pritzellii* var. *hupehensis* en el tratamiento de la artritis reumatoide (140). A partir de la fracción *n*-butanólica ha sido aislado el compuesto ácido equinocístico y otras saponinas derivadas de este, los ácidos equinocístico, 3-*O*-β-D-

glucuronopiranosilequinocístico y 3-*O*-[(6-*O*-*n*-butil)- β -D-glucuronopiranosil]-28-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil]equinocístico han evidenciado la capacidad de inducir una reducción *in vitro* de la producción de IL-18 en monocitos humanos tratados con LPS, lo cual sugiere que estos podrían ser los principios activos responsables de la actividad antirreumatoidea demostrada por los rizomas de *I. pritzellii* var. *hupehensis*, los autores reportan que el último compuesto mencionado anteriormente es de alta potencia y baja toxicidad por lo que puede ser considerado como molécula de partida para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la artritis reumatoidea (141).

En otra investigación se han identificado los compuestos (8*E*)-soya cerebroside I y (8*Z*)-soya cerebroside II como parte de una mezcla isomérica extraída de los rizomas de *I. pritzellii* var. *hupehensis* (142). Esta combinación de cerebrósidos ha demostrado actividad inhibitoria *in vitro* sobre la liberación de IL-18 por parte de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con LPS, sin demostrar citotoxicidad sobre este tipo de células a concentraciones de 1 y 10 μ M, estos resultados han llevado a los autores de este estudio a la conclusión de que los cerebrósidos en cuestión corresponden a los principios activos de *I. pritzellii* var. *hupehensis* responsables de su actividad inmunomoduladora (142).

Las siete saponinas triterpénicas, denominadas impatienosido A, impatienosido B, impatienosido C, impatienosido D, impatienosido E, impatienosido F e impatienosido G, han sido aisladas a partir de la planta entera de *Impatiens sicutifera* (55), especie utilizada en China para el tratamiento del dolor reumatoide, parálisis, quemaduras, escoriaciones y fracturas (143). Estos compuestos fueron obtenidos junto con otras 12 saponinas conocidas previamente, la actividad citotóxica de estas diecinueve saponinas obtenidas a partir de *I. sicutifera* fue determinada sobre las líneas celulares HL-60 de leucemia mieloide humana, KATO-II de adenocarcinoma humano de estómago y A549 de adenocarcinoma pulmonar humano, los investigadores reportan que únicamente el impatienosido G fue capaz de evidenciar actividad citotóxica, haciéndolo de forma moderada sobre las tres líneas celulares sujetas a prueba pero con valores de IC50 inferiores al etopósido utilizado como control positivo (55).

El extracto metanólico de la planta entera de *Impatiens textori* Miq. obtenido por reflujo con aparato Soxhlet, demuestra tener capacidad antiinflamatoria *in vitro* a través de inhibición del complejo proteico conocido como inflammasoma NLRP3 en macrófagos murinos de médula espinal estimulados con lipopolisacáridos (LPS) lo que induce una reducción de la secreción de

interleucina-1 \square por parte de estas células (56). Por medio del modelo de daño pulmonar agudo inducido con LPS en ratones hembra C57BL/6, se determinó que el extracto metanólico de *I. textori* tiene la capacidad de reducir la expresión del inflammasoma NLRP3 en células pulmonares *in vivo* así como el reclutamiento celular a pesar del proceso inflamatorio inducido (56). Los autores de este estudio concluyen que los resultados de su investigación respaldan el uso tradicional de *I. textori*, para el tratamiento de trastornos inflamatorios relacionados con infecciones cutáneas y procesos alérgicos (56).

En el caso del extracto etanólico al 35 % v/v de flores de *I. textori* Miq, se tiene que este presenta dentro de su composición a los flavonoides apigenina, apigenina 7-glucósido, luteolina y luteolina 7-glucósido (144-145), los primeros tres muestran actividad antianafiláctica y antipruriginosa *in vivo*, la apigenina, apigenina 7-glucósido y luteolina tienen la capacidad de inhibir el descenso de la presión arterial inducida en ratones ddY macho por la inyección intravenosa del compuesto 48/80 cuando se administran por vía oral, la reacción que se obtiene por la inyección del compuesto 48/88 tiene características similares a una reacción anafiláctica generalizada, como el descenso significativo de la presión arterial, misma que se da sin mediación de anticuerpos IgE (144). Por su parte, los tres compuestos químicos anteriormente mencionados pueden inducir una inhibición sobre la caída de la presión arterial en ratones ddY macho previamente sensibilizados para la generación de anticuerpos IgE contra HEL, cuando son tratados con esta última sustancia (144). La apigenina, apigenina 7-glucósido, luteolina y luteolina 7-glucósido pueden prevenir además la caída del flujo sanguíneo que se provoca al inducir el mismo tipo de proceso anafiláctico con HEL que se mencionó anteriormente (144-145).

El extracto etanólico de flores de *I. textori* Miq administrado por vía intravenosa así como la apigenina administrada por vía oral, evidencian efectos antipruriginosos en ratones macho ddY en los cuales el comportamiento propio de una reacción pruriginosa fue inducida con compuesto 48/80, PAF o con serotonina, dicho extracto también es capaz de atenuar la respuesta pruriginosa inducida con proteasa (144). A partir de este extracto etanólico ha sido posible el aislamiento de otros compuesto distintos a los mencionados en el párrafo anterior, tales como crisoeriol, quercetina, quercetina-3-glucósido, kaempferol, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-ramnosildiglucósido (146). Por otro lado el extracto metanólico obtenido a partir de la planta entera de *I. textori* y sus fracciones ha exhibido una significativa actividad antioxidante *in vitro*, caracterizándose por un alto contenido de compuestos

fenólicos, además de evidenciar actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa y una alto potencial citotóxico sobre las líneas AGS (cáncer gástrico humano), HeLa (cáncer cervical), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y A549 (cáncer pulmonar humano) (60)

Las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de flores de *I. textori* con agua, acetato de etilo o *n*-butanol demuestran una significativa actividad inhibitoria sobre la reducción de la presión arterial mediada por la aplicación intravenosa de PAF en ratones ddY cuando se administran a dosis de 100 mg/kg V.O, resultados que son análogos a los obtenidos con los compuestos apigenina y luteolina aislados del extracto etanólico cuando se administran a dosis de 20 mg/kg V.O (146). Este conjunto de hallazgos permitieron a los autores de los estudios concluir que el extracto etanólico de flores de *I. textori* (planta empleada tradicionalmente en China para tratar intoxicaciones, el carbunco y contusiones (147)), puede ser potencialmente empleado para tratar cuadros pruriginosos así como para el tratamiento y prevención cuadros anafilácticos (144-146).

El extracto metanólico de *Impatiens bicolor* Royle, planta utilizada tradicionalmente en Pakistán como un agente tónico, refrescante y diurético (148), no ha evidenciado actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexenari*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella typh* (57), sin embargo exhibe actividad antifúngica contra *Microsporum canis* y *Fusarium solani* al igual que su fracción acuosa, las fracciones obtenidas con *n*-hexano y diclorometano demuestran esta actividad solo frente *M. canis*, mientras las obtenidas con acetato de etilo y *n*-butanol evidencian efecto antifúngico sobre *Aspergillus flavus* y *M. canis* (58). Este mismo tipo de extracto y sus fracciones obtenidas por partición con los disolventes anteriormente mencionados han demostrado actividad insecticida y fitotóxica *in vitro*, del mismo modo han demostrado citotoxicidad mediante el ensayo de letalidad sobre *A. salina* (58). La fracción obtenida con *n*-hexano a partir del extracto metanólico de *I. bicolor* ha evidenciado una importante capacidad antioxidante mediante el método DPPH, que en parte se debe a la presencia del compuesto 2-(1-naftil)acetofenona (149). Las hojas *I. bicolor* se caracterizan por tener dentro de sus componentes glicósidos de flavonoides derivados de la naringenina, kaempferol y quercetina (150), los extractos de partes aéreas de esta planta también se caracterizan por tener una significativa actividad antioxidante de acuerdo a resultados del ensayo de DPPH (59)

Por otra parte, la pasta formada por trituración de la planta entera de *Impatiens capensis*, especie nativa de Estados Unidos y Canadá empleada tradicionalmente para la prevención y tratamiento de salpullidos provocados por el contacto con las plantas *Toxicodendron radicans*, conocida como “hiedra venenosa”, y *Urtica dioica*, ha demostrado tener la capacidad de reducir la gravedad de la dermatitis inducida en individuos humanos por contacto con “hiedra venenosa”, resultados que respaldan el uso tradicional de la planta, sin embargo el grado de reducción de la dermatitis evidenciado es independiente a los niveles de lawsona presentes en *I. capensis*, con lo que los autores de la investigación concluyen que este efecto posiblemente se deba a la evidente presencia de saponinas en la planta (151), esta hipótesis fue confirmada por un estudio posterior en el que se demuestra la capacidad de la fracción *n*-butanolica rica en saponinas obtenida a partir del extracto metanólico de hojas de *I. capensis*, así como de jabones preparados con esta, para reducir la gravedad de la dermatitis inducida en seres humanos por contacto con “hiedra venenosa” de manera dependiente a los niveles de saponinas, además, la fracción rica en este tipo de compuesto demostró citotoxicidad *in vitro* frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama así como actividad citostática frente a la línea celular HT-29 de cáncer de colon, sin embargo no evidenció actividad antimicrobiana mediante el ensayo de Kirby-Bauer contra *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228), *Bacillus subtilis* (Wards 85V0228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25925), *Candida albicans* (cepa hospitalaria), por otra parte se determinó que la fracción rica en saponinas es capaz de provocar un incremento de hasta un 138 % del ritmo cardiaco en gusanos negros (*Lumbriculus variegatus*) lo cual demuestra el potencial desarrollo de un efecto cronotrópico positivo (61).

Los galactolípidos MGDG-1 y DGDG-1 han sido aislados de *Impatiens parviflora* DC, el extracto metanólico de las hojas de esta planta así como MGDG-1 demuestran la capacidad de inhibir la desnaturalización de la albúmina de suero bovino inducida por calor, esta observación plantea la posibilidad de que las hojas de *I. parviflora* sean útiles para el tratamiento de cuadros inflamatorios como la artritis reumatoidea vinculados con procesos de desnaturalización proteica (152). MGDG-1, DGDG-1 y los extractos de *I. parviflora* evidencian actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa lo que señala su potencial aplicación en cuadros patológicos relacionados con la pérdida del ácido hialurónico (152). Las hojas de *I. parviflora* también se caracterizan por la presencia de compuestos fenólicos tales como el ácido cafeico, ácido ferúlico, 1,2,4-trihidroxinaftaleno-1-*O*-glucósido así como derivados del kaempferol y la quercetina (153)

Los extractos acuosos y metanólicos de hojas de las especies *Impatiens noli-tangere*, *Impatiens glandulifera* e *I. parviflora*, han demostrado actividad alelopática o antigerminativa sobre semillas de *Leucosinapis alba* y *Brassica napus*, siendo los extractos de *I. glandulifera* los que mayor potencia demuestran (154). Esta actividad biológica ha sido confirmada por un estudio posterior en el que el compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona fue cuantificado en cotiledones, hojas, tallos y raíces de *I. glandulifera* así como en la tierra que circunscribe a la planta y en el agua de lluvia que incide sobre sus hojas, los resultados de dicho análisis así como el estudio de las actividades antigerminativas sobre semillas de *Hieracium murorum* y *Scrophularia nodosa* e inhibidora sobre el crecimiento de los organismos fúngicos ectomicorrícicos *Pisolithus tinctorius*, *Lactarius subdulci* y *Laccaria bicolor* por parte de 2-metoxi-1,4-naftoquinona, han permitido establecer que *I. glandulifera* es capaz de liberar a dicha sustancia por medio de sus hojas y raíces de modo que su papel como metabolito secundario podría ser la colaboración con la expansión de la planta mediante su actividad antigerminativa sobre semillas de otras especies así como por la inhibición del crecimiento de hongos ectomicorrícicos, por otra parte, en dicha investigación también se estableció la cuantificación de lawsona en diferentes porciones anatómicas de *I. noli-tangere* sin embargo las actividades biológicas anteriormente mencionadas solo se determinaron con 2-metoxi-1,4-naftoquinona (155).

El alcaloide hipaforina ha sido aislado de las semillas de *Impatiens niamniamensis*, este compuesto así como el extracto etanólico de las semillas, han evidenciado actividad antihiperlipémica *in vivo* mediante el modelo de diabetes inducida en ratas macho con estreptozotocina, el extracto etanólico demostró actividad moderada a dosis de 200 mg/kg mientras la hipaforina demuestra actividad significativa a dosis de 50 mg/kg cuando se compara con la metformina emplea a dosis de 100 mg/kg como control positivo, inclusive induciendo una reducción importante de los niveles séricos de glucosa, con base a estos resultados, los autores de la investigación a la que se hace referencia señalan que la hipaforina constituye un compuesto valiosos para el diseño de moléculas análogas más activas y seguras (156).

A lo largo del presente documento se ha hecho una revisión de las actividades biológicas científicamente atribuibles a diferentes especies del género *Impatiens*, también es clara la multiplicidad de tipos de metabolitos con actividades farmacológicas igualmente diversas que han podido ser aislados de varias especies de este género, lo cual se registra desde 1948 con

el aislamiento de 2-metoxi-1,4-naftoquinona (121) así como de la lawsona en 1965 (157) a partir de IB. Sin embargo existen reportes del aislamiento de nuevos componentes a partir de plantas del género *Impatiens* sin que los autores de dichos descubrimientos reporten la determinación de algún tipo de actividad farmacológica en concreto, lo que puede constituir un espacio para la investigación de nuevos efectos farmacológicos atribuibles a las plantas del género en cuestión, un ejemplo de esto es la obtención de una proteína de alto peso molecular a partir del pericarpio de IB, cuyo nombre no es indicado por los autores de la investigación que reporta su descubrimiento, esta proteína está constituida por entre tres a cuatro subunidades y la única actividad biológica determinada por parte de los investigadores que la aislaron por primera vez es su capacidad de interactuar con los filamentos de actina de células musculares de conejo y de embrión de frijol Mungo, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el proceso de polimerización de G-actina para dar F-actina (158).

Así mismo se reporta el aislamiento de una serie de saponinas glicósidos del bacarano conocidas como hosenkosidos (desde el hosenkosido A hasta el hosenkosido O) a partir de las semillas de IB, sin embargo los investigadores que lograron su obtención y elucidación estructural no reportan la determinación de alguna actividad biológica para dichos compuestos (159-161). El compuesto biscumarínico 4,4'-biisofraxidina ha sido aislado de cultivos de raíz de IB, sin embargo los autores responsables de este descubrimiento no indican la determinación de algún efecto biológico para esta sustancia (162). Además se registra la obtención de los compuestos 1,2,4-triol-4-etoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y 1,2,4-triol-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, pero al igual que para los compuestos mencionados anteriormente, no hay indicación del establecimiento de una actividad biológica (163). También se reporta la obtención de nuevos glicósidos de flavona a partir de las semillas de IB, tales como quercetina-3-O-[α -L-ramnosa-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-5-O- β -D-glucopiranosido y la quercetina-3-O-[(6'''-O-cafeoil)- α -L-ramnosa-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-5-O- β -D-glucopiranosido, sin embargo los autores de estos aislamientos no reportan los efectos que pueda tener el patrón de glicosilación sobre las actividades biológicas reportadas para la aglicona (quercetina) (16). El compuesto 1,2,4-trihidroxinaftaleno-1-O-glucósido ha sido identificado como un componente de la raíz de *I. glandulifera* (165) y de las hojas de *I. parviflora* (153), sin embargo las investigaciones en las que esto se establece no indican la determinación de una actividad biológica para esta sustancia (153,165).

El descubrimiento de metabolitos farmacológicamente activos en diversas especies del género *Impatiens* ha servido como antecedente para el desarrollo de métodos eficaces para su determinación analítica y obtención. El desarrollo de un método analítico mediante HPLC en fase reversa para la determinación de naftoquinonas de partes aéreas de *I. glandulifera* ha permitido establecer que la producción de este metabolito por las plantas puede variar significativamente entre las partes anatómicas de la planta así como entre las épocas de recolección (166), también ha permitido comparar el contenido de este tipo de metabolito entre diferentes especies, un ejemplo de esto es el descubrimiento de que *I. glandulifera* puede tener un contenido de naftoquinonas, expresadas en términos de lawsona, entre 2,5 y 37 mayor que el de las especies *I. capensis*, *I. noli-tangere* e *I. parviflora* (166). También se reporta el desarrollo y validación de un método HPLC en fase reversa para la determinación analítica e independiente de las naftoquinonas lawsona, 2-metoxi-1,4-naftoquinona y metilen-3,3'-bilawsona en hojas de IB, que ha permitido determinar que el contenido de estos metabolitos puede variar de forma significativa según el color de flor de IB, siendo las hojas de las plantas con flor de color rosado las que mayor producción de naftoquinonas presentan (167).

También se reporta el desarrollo de métodos HPLC con detección mediante espectrometría de masas y detector evaporativo de dispersión de luz para la determinación cuantitativa de los hosenkosidos A, B, C, F, G, K, L y M en semillas de IB (168), un producto fitoterapéutico tradicionalmente utilizado para el tratamiento de la amenorrea, apareamiento de masas abdominales, atragantamiento y dolores óseos recopilado como tal dentro la Farmacopea China (169), este método se estableció considerando que es limitado el número de plantas capaces de sintetizar este tipo de metabolito por lo que la determinación analítica de estas sustancia puede ofrecer una herramienta útil para el control de calidad de productos fitoterapéuticos que indican contener semillas de IB (168).

Por otra parte, se reporta el desarrollo de un método eficaz para la obtención de flavonoides a partir de las flores de *I. glandulifera* a través de cromatografía contracorriente de alta resolución, lo cual permitió el estudio de la composición flavonoica del extracto obtenido por la maceración de las flores con etanol absoluto (170). Los compuestos kaempferol, kaempferol-3-glucósido, kaempferol-3-glucosilramnósido y kaempferol-3-(*p*-coumaroil)-glucósido han sido detectados y aislados mediante electroforesis capilar (171). El interés por aislar el kaempferol puede estar fundamentado considerando el hecho de que esta sustancia destaca por su actividad contra la resistencia a la insulina, la cual ha sido evidenciada sobre

ratas a las que se les indujo hiperglicemia con estreptozotocina, efecto que a su vez puede estar relacionado con una regulación a la baja de la I κ B quinasa y el subsecuente bloqueo de la ruta de señalización mediada por el factor nuclear κ (NF- κ), lo cual se relaciona con una reducción de la inflamación del tejido hepático que contribuye al desarrollo de resistencia contra la insulina (172). Además de la actividad antidiabética, destaca el hecho de que al kaempferol y a parte del cuantioso número de sus derivados glicosilados, se les atribuyen otros efectos biológicos tales como las actividades antioxidante, antiinflamatoria, anticancerosa, antimicrobiana, cardioprotectora, neuroprotectora, antiosteoporótica, estrogénica y antiestrogénica, ansiolítica y antialérgica, mismas que eventualmente podrían ser potenciadas mediante el aumento de la biodisponibilidad y estabilidad del kaempferol que se genera al conjugar esta molécula con ciclodextrinas (173)

Cabe destacar el registro de investigaciones para determinación de métodos que permitan una mayor producción de metabolitos de interés farmacológico procedentes de especies del género *Impatiens*; a través de cultivos de células de hojas de IB en medio B5 se ha logrado la producción de lawsona, escopoletina e isofraxidina y una naftoquinona de identidad no establecida por los responsables del estudio, sin embargo, el compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona no ha sido detectado en este tipo de cultivos (174). Sin embargo, en un estudio posterior se reporta la inducción exitosa de la producción de lawsona, 2-metoxi-1,4-naftoquinona y metilen-3,3'-bislawsona por parte de las raíces obtenidas por el cultivo de tejido de hojas de IB en medio B5 a través de su tratamiento con metil jasmonato, la generación de estas naftoquinonas a través de este método alcanza niveles óptimos para su potencial producción comercial (175). Resultados similares se obtienen al usar metionina como inductor del incremento de la producción de naftoquinonas por parte de raíces de IB generadas en cultivos de tejido de hoja en medio B5, en este caso se ha determinado un aumento significativo de la producción de 2-metoxi-1,4-naftoquinona y metilen-3,3'-bislawsona, además del aislamiento por primera vez a partir de IB de los compuestos 2,3-dihidroxi-1,4-naftoquinona, luteolina y ácido equinocístico (176).

Por otro lado, cabe hacer mención de que la producción de naftoquinonas por IB constituye un elemento de estudio de interés para otras áreas de investigación distintas a la determinación de sus propiedades como compuestos biológicamente activos. La biosíntesis de la lawsona ha podido ser investigada en IB, pudiéndose demostrar que constituye un compuesto derivado del ácido shikímico, siendo los ácidos *p*-hidroxibenzoico y 4-(2'-carboxifenil)-4-oxobutírico

reconocidos intermediarios de su proceso de biosíntesis (177-180). La síntesis de triglicéridos asimétricos en las semillas de *Impatiens edgeworthii* Hook F. cuya especificidad con respecto al arreglo tridimensional de sus átomos, convierten a las semillas de *I. edgeworthii* en un sistema útil para el estudio de la biosíntesis de triglicéridos para parte de organismos del reino plantae (181).

La recopilación de información llevada a cabo en el presente documento, demuestra que las 1,4-naftoquinonas constituyen una clase de metabolito presente de las plantas del género *Impatiens* relevante en lo que respecta a la variedad de sus actividades biológicas, incluyendo sus efectos antimicrobianos y citotóxicos. Es importante mencionar que existen múltiples reportes en los que se investiga el efecto *in vitro* de diferentes 1,4-naftoquinonas de origen sintético que pueden generarse por modificación estructural de moléculas de origen natural, ejemplos de ello lo constituyen la síntesis de derivados del lapachol y α -lapachona con el objetivo de investigar su actividad contra *Plasmodium falciparum*, uno de los parásitos responsables de la malaria (182); también existe el reporte del desarrollo de derivados de α -lapachona con la finalidad de estudiar su actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* (183); en el caso de la lawsona así como de sus derivados sintéticos, se tiene que estos son capaces de demostrar efectos antioxidantes (184), antibacterianos (185-187), antifúngicos, antivirales (185-186), antitumorales (186) y antiparasitarios (186,188), por otro lado destaca la investigación del efecto de diferentes moléculas derivadas de la juglona contra células de glioma (189). Otros ejemplos lo constituyen la síntesis de la zeilanona (molécula citotóxica, antifúngica y antibacteriana (190)) y de zeilanona epóxido, 1,4-naftoquinonas de origen natural, a partir de la menadiona (191).

Por otra parte, se reporta la síntesis de 1,4-naftoquinonas con la finalidad de desarrollar agentes antiparasitarios capaces de actuar sobre organismo tales como *Schistosoma mansoni* (192), *Trypanosoma cruzi* (193), *Trypanosoma brucei* (194) y filarias (195). Además se han sintetizado 1,4-naftoquinonas para el estudio de sus propiedades antibacterianas (196), antitumorales en modelos animales (197) y citotóxica *in vitro* sobre fibroblastos murinos (198) y líneas celulares de cáncer prostático (199-200), glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer broncoalveolar (200), leucemia (200-201) carcinoma epidermoide, cáncer cervical y carcinoma hepatocelular (202). Otras actividades biológicas determinadas para moléculas sintéticas específicas del tipo 1,4-naftoquinonas incluyen la inhibición de la agregación plaquetaria (203) así como el efecto inhibitorio sobre HIV-1

transcriptasa reversa (204). Cabe destacar que las 1,4-naftoquinonas también han sido estudiadas con mira en su aplicación en áreas no farmacológicas, esto incluye la investigación para su uso como insecticidas (incluyendo a 2-metoxi-1,4-naftoquinona) (205-206), acaricidas (206), bactericidas frente fitopatógenos como *Erwinia carotovora* (207) y como agentes útiles en la detección de biomarcadores de cáncer de mama (208)..

Es importante mencionar que en la literatura existen reportes de investigaciones en las que se estudian aspectos toxicológicos de las 1,4-naftoquinonas, en el caso de la lawsona destaca la determinación de su toxicidad aguda oral en ratas la cual permitió la determinación de dosis letal 50 (LD50) de 570 mg/kg para ratas hembra y entre 500 y 2000 mg/kg en ratas macho, siendo signos de toxicidad aguda la hipoactividad, piloerección, hipersalivación y dificultad respiratoria (209), mientras que para el estudio de toxicidad subcrónica por la misma vía de administración se reporta la definición un valor 2 mg/kg/día para el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, por sus sigla en inglés) para un periodo de observación de 13 días siendo observables alteraciones toxicológicas sobre el sistema hematopoyético, riñones, preestómago e hígado (210-211), por otra parte el estudio de teratogenicidad de la lawsona en ratas ha permitido definir un valor de NOAEL de 7 mg/kg/día para la incidencia de signos de toxicidad maternos, sin embargo los resultados no indican signos de toxicidad fetal o teratogenicidad (212). Por otra parte la revisión realizada por el Comité Científico en Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios Destinados a los Consumidores (SCCNFP, por sus siglas en Inglés) de estudios de genotoxicidad y mutagenicidad para la lawsona tanto *in vivo* como *in vitro* ha permitido establecer que este compuesto corresponde a un potencial agente mutagénico y genotóxico, sin embargo esta organización científica adscrita a la Comisión Europea destaca que es preciso el diseño de estudios más robustos para definir con claridad dicho tipo de toxicidad para la lawsona (213).

La toxicidad de las 1,4-naftoquinonas menadiona y la plumbagina ha sido investigada *in vitro*, con lo que se ha establecido que la primera genera toxicidad mediante la generación de especies reactivas de oxígeno durante su metabolismo (214-215), mientras que la segunda lo hace al actuar como un electrófilo sujeto al ataque nucleofílico por parte del glutatión, sin embargo, por ambos mecanismos el resultado es la generación de estrés oxidativo (214). En otro estudio se determinó que la plumbagina también puede demostrar toxicidad *in vitro* al inducir daño en el ADN de células L5178Y de linfoma de murino, sin evidenciar compromiso de la viabilidad celular (216). El compuesto 1,4-naftoquinona ha demostrado la capacidad de inhibir *in vitro* la

actividad de las enzimas glutatión-S-transferasas de hígado de rata de manera dependiente a la dosis, lo que señala que este tipo de enzima brinda protección contra las quinonas (217). En el caso de 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona, esta produce toxicidad mediante la inhibición del metabolismo oxidativo (191). La juglona, por su parte, demuestra toxicidad *in vitro* sobre fibroblastos humanos mediante el daño de su ADN, inhibición de la transcripción, reducción de los niveles de proteína p53 y la inducción de la muerte celular por apoptosis y necrosis (218). Por otro lado, el mecanismo de citotoxicidad de las espermidina-1,4-naftoquinonas se debe a su intercalación en el ADN lo cual genera la inhibición de la enzima topoisomerasa, sin embargo este mecanismo hace que estas moléculas sean consideradas como potenciales agentes anticancerígenos (219).

La relación estructura-actividad con respecto a la actividad hemolítica y nefrotoxicidad de las 1,4-naftoquinonas indica que estas son capaces de producir hemólisis *in vivo* mientras que sus derivados con grupos hidroxilo o amina en las posiciones 2 y 3 son capaces de producir nefrotoxicidad en ratas, sin embargo la severidad de la hemólisis así como la nefrotoxicidad pueden ser disminuidas en 2-amino-1,4-naftoquinonas por medio de la sustitución de la posición 3, lo contrario se observa en caso de metilar el grupo amina del compuesto 2-amino-1,4-naftoquinona, mientras la metilación del grupo hidroxilo de la lawsona para producir 2-metoxi-1,4-naftoquinona induce una reducción de la actividad hemolítica y nefrotóxica evidenciada por el compuesto de partida (220)

Finalmente, es importante mencionar que para especies como *I. walleriana*, *I. hawkeri* e *I. turrialbana* presentes en Costa Rica, aún no hay reportes de efectos farmacológicos determinados mediante algún tipo de ensayo biológico en lo que respecta a la revisión de bibliografía sobre las actividades biológicas atribuibles a las plantas del género *Impatiens* o sus metabolitos realizada con artículos de revistas indexadas en la base datos PubMed desarrollada por *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los Estados Unidos hasta la fecha 21 de enero de 2016. Sin embargo, *I. walleriana* es considerada una planta comestible (68) para la cual se reporta su uso tradicional en África como abortifaciente (221), mientras en Costa Rica esta planta recibe el nombre de China y ha sido empleada como un agente anestésico para el alivio de la comezón inducida por los piquetes de insectos (107); en el caso de *I. hawkeri*, se reporta que dicha especie es reconocida como una planta tóxica por pobladores del bosque de Diadema en Brasil (222).

5.3. Clasificación taxonómica y características botánicas de las especies del género *Impatiens* propuestas para el estudio.

5.3.1. Clasificación taxonómica del género *Impatiens*.

El género *Impatiens* corresponde a uno de los más amplios de las angiospermas, comprendiendo más de 1000 especies (223-224) se caracteriza además porque cada año son descubiertas y descritas nuevas especies (224). El género *Impatiens* se encuentra agrupado junto con el género *Hydrocera* dentro de la familia Balsaminaceae, misma que forma parte del orden Geraniales (62-63,225). El género *Impatiens* se caracteriza por tener una distribución subcosmopolita, sin embargo gran parte de su origen evolutivo es desconocido, a pesar de ello se ha podido determinar que su origen radica en el suroeste de China, empezando a diversificarse a partir de la época del Mioceno, siendo los significativos cambios climáticos dados durante las épocas del Plioceno y Pleistoceno, incluida la era glacial, los responsables de la enorme diversificación de las especies del género *Impatiens* al punto de ser uno de los géneros más amplios de plantas con flor (226). La observación comparativa del desarrollo floral de la única especie del género *Hydrocera* (*H. triflora*) y de *Impatiens omeiana* mediante microscopía electrónica y de luz, además de la consideración de información reportada en la literatura sobre la morfología de plantas del género *Impatiens*, ha permitido concluir (bajo el supuesto de que las flores zigomorfas de las especies del género *Impatiens* derivan de un ancestro putativo con flor actinomorfa de la familia Balsaminaceae) que la especie *H. triflora* puede ser considerada como un ancestro actinomorfo de la familia Balsaminaceae (225).

En el siguiente cuadro se resumen los niveles de clasificación taxonómica desde el reino hasta el género *Impatiens* según el Servicio de Conservación de los Recursos Naturales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA, por sus siglas en inglés (227):

Cuadro I. Niveles taxonómicos desde reino hasta género para las plantas del género *Impatiens*.

Nivel taxonómico	Nombre científico (Nombre común)
Reino	Plantae (plantas)
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Espermatofita (planta con semillas)
División	Magnólidas (plantas con flor)

Clase	Magnoliopsida (dicotiledonias)
Subclase	Rosidae
Orden	Geraniales
Familia	Balsaminaceae
Género	<i>Impatiens</i> L

Fuente: PLANTS Database [Internet]. Estados Unidos de America: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture [Actualizado 8 May 2015; Consultado 5 Ago 2015]. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/>

A diferencia de la clasificación taxonómica brindada en el cuadro I, destaca el hecho de que en la literatura existe el reporte de la ubicación de la familia Balsaminaceae dentro del orden Ericales perteneciente a la subclase Asteridae, lo cual se basa en la observación de las características morfológicas de flores de especies de la familia Balsaminaceae y su comparación con la de otras familias agrupadas dentro del orden Ericales (228).

En lo correspondiente a la clasificación filogenética de las especies del género *Impatiens*, nueva evidencia molecular (comparación del ADN plastidial además y de secuencias espaciadoras ribosomales conocidas como *Internal Transcribed Spacer*) así como la integración de dichos resultados con los de comparaciones de las características morfológicas de la flor de 150 especies mediante la aplicación inferencia estadística de tipo Bayesiana, ha permitido definir una división del género *Impatiens* en dos clados, clado I y clado II, este último se encuentra a su vez dividido en siete subclados identificados con letras desde la A hasta la G, el subclado G se caracteriza por ser el que más especies integra de las 150 analizadas, incluyendo entre ellas a plantas identificadas como de interés farmacológico y ornamental tales como *Impatiens balsamina* e *Impatiens walleriana* respectivamente (229). Los autores de la investigación que aporta los resultados anteriormente mencionados concluyen que con base a la evidencia molecular y morfológica es posible establecer la división del género *Impatiens* en dos subgéneros, *Clavicarpa* (clado I) e *Impatiens* propiamente dicho (clado II) (229).

En general, en cuanto a las características morfológicas, la forma y tamaño de la flor varía de forma considerable dentro del género *Impatiens*, sin embargo existen características morfológicas en común entre las especies del género en cuestión; las flores de las plantas del

género *Impatiens* siempre son zigomorfas, sus estambres se encuentran fusionados y las anteras se proyectan inferiormente de modo que el polinizador entra en contacto con estas como si tratase de un cepillo, la antera con forma de cono bloquea el acceso al estigma (las anteras se disponen como una sola unidad antes de que el estigma sea receptivo), el polen de la misma flor generalmente no entra en contacto con esta, el crecimiento ovárico tiende a empujar el cono anterior externamente (63).

La autopolinización puede presentarse en algunas especies del género *Impatiens*, incluyendo a *Impatiens walleriana*, ciertas son cleistógamas, dentro las especies estas características pueden ser específicas para determinados genotipos; el polinizador accede al espolón y obtiene el néctar de la parte inferior de las anteras. Las flores del género *Impatiens* se caracterizan por ser protándricas de modo que las anteras generalmente maduran de uno a tres días antes de que el estigma sea receptivo (63,230-231).

5.3.2 Descripción botánica de las especies propuestas para su estudio:

5.3.2.1 *Impatiens walleriana* Hook. f:

Impatiens walleriana (IW) también conocida como *Impatiens wallerana*, *Impatiens sultani* Hook.f., *Impatiens episcopi* H.J. Veitch, *Impatiens giorgii* De Wild, *Impatiens holstii* Engl. & Warb., *Impatiens lujai* De Wild, corresponde a una de las especies ornamentales más conocidas en el ámbito de la horticultura, es nativa de regiones tropicales de África, incluyendo países como Kenia, Malawi, Mozambique, Tanzania, Rodesia, Zimbabwe y las islas de Zanzíbar y Pemba, es reconocida como una especie invasora capaz de reproducirse en diversas regiones sin mediación de la actividad agrícola, se encuentra distribuida ampliamente en regiones que incluyen Norte y Sur América, islas del Océano Pacífico, Australia y Nueva Zelanda (62-63,68). Esta especie ha sido cultivada a nivel mundial durante más de un siglo, constituyendo la planta ornamental de cultivo más vendida en los Estados Unidos de América de acuerdo al censo agrícola de 1997 llevado a cabo en dicho país (62,232-239), inclusive a nivel mundial, IW se encuentra dentro de las tres plantas para explotación ornamental más importantes en el mundo (63).

Sin embargo, es amplia la explotación comercial de otras especies del género *Impatiens* que incluyen a *Impatiens balsamina* y *Impatiens hawkeri* (63). IW se inició a cultivar en invernaderos en la década de 1940, en Costa Rica se tiene un registro de un trabajo de cultivo

de esta planta en el año de 1961 (63,238), sin embargo se reporta la presencia de plantas creciendo fuera de las condiciones de cultivo debido al proceso de naturalización en la década de 1950, mismo al cual se debe la existencia de plantas de IW con coloración ruborizada y las conocidas como variedad enana (63,239).

En el caso de países que incluyen a Costa Rica, Argentina, Australia, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Puerto Rico, Estados Unidos de América (Estado de Florida) y a Venezuela, IW ha sido reconocida como una especie naturalizada (62). La característica de ser invasiva es un rasgo que comparte IW con otras plantas de su género que incluyen a *I. glandulifera* y a *I. parviflora*, reconocidas como especies invasoras en Europa (240-241).

Además de las características morfológicas generales de las flores de las especies pertenecientes al género *Impatiens* mencionadas anteriormente, las de IW consisten en cinco anteras fusionadas que rodea un estigma conformado por cinco lóbulos en la madurez, de modo que existe la posibilidad de autopolinización, una vez que se da la polinización, la cual puede darse tanto natural como artificialmente, la semilla madura entre 14 a 21 días dependiendo de la temperatura (63). La inflorescencia de IW se presenta como un pedúnculo que presenta generalmente entre una y cinco flores, la corola consiste en un pétalo erecto y cuatro pétalos laterales dispuestos en parejas, estos pares de pétalos se encuentran unidos en su base y suelen tener las mismas dimensiones (231)

En cuanto a la coloración de los pétalos, existe una amplia gama siendo el patrón de coloración inestable con las variaciones ambientales, la literatura indica que virtualmente podrían existir de todos los colores exceptuando el amarillo y el azul, los colores más conocidos son el blanco, el rojo y el rosado, los pigmentos incluyen flavonoides como leucocianidina, leucodelphinidina, cianidina, malvidina, peonidina, kaempferol y quercetina, siendo la cianidina el pigmento básico sin embargo sus niveles disminuyen cuando se presenta un incremento en los niveles de otros, mientras la malvidina es el segundo pigmento más común tendiendo a ser el más abundante cuando este está presente (63,230).

Respecto a las dimensiones de la flor, normalmente suele ser de 4 cm de diámetro, sin embargo la manipulación de las variables ambientales y de la fertilidad del medio de cultivo, sobre todo en lo que respecta al desarrollo en condiciones de invernadero ha permitido modificar el

tamaño de la flor obteniéndose plantas con tamaño de flor superior o inferior al observado normalmente, como el caso de plantas enanas con un tamaño de flor reducido a un diámetro de 2 cm o menos (63). La planta puede alcanzar una altura que oscila entre los 30 cm y los 90 cm, presenta un tallo suculento y glabro a veces translúcido que puede ser simple o ramificado, sus hojas simples suelen acumularse al final del tallo, presentan forma ovoide u elíptica y borde denticulado, crecen con un patrón alternante, pueden presentar una longitud de entre 4 cm y 12 cm y poseen una coloración verde oscura, presentan pecíolos con entre una y dos glándulas; retomando las características de la flor de IW, se tiene que los colores más comunes para la misma son el rosado, púrpura, blanco y rojo, uno de los sépalos presenta el espolón nectarífero característico de las especies de *Impatiens* el cual puede alcanzar una longitud de entre 3 cm y 5 cm, la floración de IW en Costa Rica se presenta durante todo el año, los frutos son capsulares fusiformes, son glabros y dehiscentes con dimensiones de 2 cm de largo por 0,7 cm de ancho (242-244). IW es policárpica y puede reproducirse sexualmente mediante la generación de semillas o bien de manera vegetativa por medio de esquejes (245).

La dispersión en las plantas del género *Impatiens* se presenta por medio de la diseminación balística de las semillas gracias al desarrollo de frutos dehiscentes, estas semillas pueden ser sujetas a una mayor distribución gracias al movimiento de la escorrentía de aguas superficiales o por la acción de animales (62). IW muestra predilección por el crecimiento en zonas con sombra, inclusive se reporta como la planta de cultivo en invernaderos que mejor tolera esta condición de crecimiento (63). Con respecto a la distribución territorial en Costa Rica, se tiene que IW se puede localizar en regiones con humedad constante con una altitud desde los cero hasta los dos mil metros sobre el nivel del mar, esta planta, como ya se indicó, crece con predilección en zonas con sombra, sin embargo puede encontrarse en sitios soleados con suelos muy húmedos; a nivel de áreas protegidas, se reporta la presencia de IW en las zonas de conservación Arenal, La Amistad Pacífico, Pacífico Central y Cordillera Volcánica Central (242). Destaca el hecho de que en Costa Rica, además de IW, también se reporta el crecimiento en forma silvestre de las plantas *I. balsamina* (planta originaria de India) e *I. turrialbana* (planta endémica de Costa Rica) los cuales son miembros del mismo género (242).

Debe tomarse en cuenta que comercialmente existen plantas producidas por hibridación interespecífica de *I. walleriana*, dentro de las cuales se pueden mencionar híbridos entre esta especie con otras que incluyen *I. usambrensis*, *I. gordonii*, *I. auricoma*, *I. hawkeri*, *I. niamniamensis*, *I. epiphytica*; en el caso del híbrido generado con la primera de las especies

mencionadas, cabe destacar que en este caso el proceso de hibridación se ha presentado de forma natural sin mediación del hombre (63,231,246-248). Una de las aplicaciones distinta a la explotación comercial como planta ornamental que se le ha dado a IW es la remoción de cadmio y mercurio de terrenos contaminados con dichos metales pesados (249-252).

IW puede sufrir el efecto de enfermedades como el daño producido por el insecto *Frankliniella occidentalis* que además es vector del Virus de la Mancha Necrótica de *Impatiens*, INSV por sus siglas en inglés (*Impatiens Necrotic Spot Virus*) (63). Considerando estos antecedentes no es extraño que la literatura reporte el desarrollo de variedades transgénicas IW con la finalidad de dotarlas de resistencia a las enfermedades como la Mancha Necrótica o darle características comercialmente más atractivas, tales como variaciones en la coloración de la flor, lo que se ha llevado a cabo tomando en cuenta la importancia económica que tiene esta especie dado a su cultivo con fines ornamentales (253).

5.3.2.2 *Impatiens balsamina* L.:

Impatiens balsamina L. (IB), conocida también bajo con *Balsamina angustifolia* Blume, *Balsamina balsamina* (L.) Huth (inval.), *Balsamina coccinea* DC., *Balsamina cornuta* DC., *Balsamina foeminea* Gaertn., *Balsamina hortensis* Desp., *Balsamina lacca* Medik., *Balsamina minutiflora* Span., *Balsamina mollis* G.Don, *Balsamina odorata* Buch.-Ham. ex D.Don, *Balsamina racemosa* Buch.-Ham. ex D.Don, *Impatiens arcuata* Benth., *Impatiens cornuta* L., *Impatiens eriocarpa* Launert, *Impatiens lobbiana* Turcz., *Impatiens longifolia* Wight, *Impatiens malayensis* Griff., *Impatiens rosea* Lindl. o como *Impatiens stapfiana* Gilg, es una planta originaria de la India y el sureste asiático, es ampliamente utilizada como planta ornamental sin embargo se ha dispersado más allá de las áreas de cultivo en zonas tropicales y subtropicales, se localiza en regiones de clima cálido con una altitud desde los cero hasta los 1250 metros sobre el nivel del mar, puede hallarse de forma silvestre en zonas abiertas o bien como maleza del bosque, IB se caracteriza por adaptarse fácilmente a diversos tipos de suelo que incluye aquellos arcillosos, sin embargo crece preferiblemente en regiones con suelo rico en humus, húmedo y con buen drenaje de agua, puede crecer en zonas con alta exposición solar o con sombra parcial (68).

IB corresponde a una planta herbácea anual, erecta que puede crecer de entre los 20 cm hasta los 90 cm de altura, el tallo es glabro pero puede ser pubescente cuando es joven, es suculento y presenta ramificaciones con nudos protuberantes; las hojas verdes suelen ser alternas, sin

embargo las que se ubican en los niveles inferiores pueden seguir un patrón opuesto, pueden ser sésiles o bien presentar un peciolo corto de entre 1 cm y 2 cm, la lámina es lanceolada, estrechamente elíptica u oblanceolada con dimensiones de entre los 4 cm y 12 cm de largo y de 1,5 cm a 3 cm de ancho, ambas superficies suelen ser glabras o levemente pubescentes, con entre 4 y 7 pares de nervaduras laterales, la base de la hoja es cuneada de margen serrulado y ápice acuminado (68).

Las flores de IB se presentan de forma solitaria o agrupadas en fascículos de dos a tres miembros, nacen de manera inmediatamente inferior a la unión sésil o mediante peciolo de la hojas con el tallo, la inflorescencia se encuentra unida a un pedículo pubescente de entre 1 cm y 2 cm de largo, el mismo presenta brácteas lineares; las flores pueden tener pétalos simples o dobles de color blanco, rosadas, púrpura, rojas o de color variado, además presentan 3 sépalos laterales con forma ovada a ovolanceolada ligeramente ciliados, el sépalo es cónico pubescente se estrecha abruptamente para formar un espolón de entre 10 mm a 20 mm de longitud (35). La flor está compuesta por 5 pétalos, el superior es orbicular con ápice retuso y forma macronulada a lo largo, los pétalos laterales se disponen en parejas cuyos miembros se encuentran connados; los estambres presentan un filamento lineal, anteras ovoides y apex obtuso, el ovario densamente pubescente se dispone superiormente, con respecto al fruto, este último corresponde a una cápsula con dehiscencia explosiva formada entre cuatro a cinco valvas fusiformes, posee una longitud de entre 1 cm y 2 cm, la superficie exterior del fruto es de textura tomentosa, la cápsula fructífera se estrecha a los extremos, las semillas tuberculadas del interior se caracterizan por su coloración marrón oscuro, son subglobosas con un diámetro que oscila entre los 1,5 mm y los 3 mm (68).

En el caso específico de Costa Rica, se reporta IB como una especie cultivada que ha podido diseminarse más allá de las áreas de cultivo en diversas zonas del país en regiones con una altitud de entre los 500 m y 1500 m sobre el nivel del mar (254).

5.3.2.3 *Impatiens hawkeri* Bull:

Impatiens hawkeri Bull (IH) e IW corresponden a las dos especies del género *Impatiens* más cultivadas para su comercialización como plantas ornamentales (63), IH corresponde a una hierba perenne anual originaria de Nueva Guinea de tallos suculentos decumbentes o erectos, las hojas se agrupan en verticilos mientras las flores crecen de manera solitaria, el fruto corresponde a una cápsula fusiforme (255). Bull (256) describió por primera vez a IH como

una planta de hojas de borde serrulado con forma elíptica acuminata, con flores amplias que suelen mostrar un intenso color carmín brillante que puede contrastar con una coloración azulada brillante que rodea el centro blanco de la flor, el sépalo dorsal es redondeado, los pétalos laterales son oblongados y bilobados, la flor presenta un espolón rojizo con un largo cercano a las dos pulgadas. Es importante aclarar que la flor de IH puede ser de diversos colores incluyendo el color rojo, naranja, violeta, blanco, rosado entre otros, los verticilos suelen estar compuestos por entre 3 a 5 hojas de coloración verde oscura a bronce abigarrado, mientras las flores se encuentran compuestas por 5 pétalos (257). IH puede crecer en zonas con clima montano o somontana, con suelos húmedos (255), IH crece preferiblemente en zonas con sombra, no suele ser resistente a la exposición directa a la radiación solar intensa, la altura alcanzada por la planta suele oscilar las 16 y 18 pulgadas (257).

En Costa Rica se da la explotación comercial de IH como planta ornamental, lo cual se evidencia por la existencia de patentes asignadas a métodos para la obtención de plantas con flores de colores específicos así como para la generación de nuevos híbridos con otras especies de *Impatiens* para su explotación comercial en las cuales es explícito que el programa de cultivo de dichas plantas es llevado a cabo en Costa Rica (64-66). A pesar de que las plantas conocidas como *impatiens* de Nueva Guinea constituyen un grupo heterógeno en cuanto a las características de su flor, follaje, tamaño y forma de las hojas, esto se considera como variabilidad dentro de una sola especie correspondiente IH (258). Anteriormente, existían distintas especies consideradas como *impatiens* de Nueva Guinea, tales como *I. schlechteri* e *I. mooreana* y los híbridos entre ellas, sin embargo estas especies ya no son reconocidas de manera independiente por lo que se agrupan dentro de IH (258).

METODOLOGIA

6. Metodología:

6.1 Recolección del material vegetal:

Las plantas por recolectar corresponden a *Impatiens walleriana* (IW), *Impatiens hawkeri* (IH) e *Impatiens balsamina* (IB), con respecto al lugar de recolección solo para *Impatiens walleriana* se descarta la recolección de su forma ornamental considerando la amplia variedad de híbridos entre esta especie y otras de su género que son empleadas como ornamento (63,231,246-248), lo que puede entorpecer la labor de reconocimiento botánico y la asignación de las actividades biológicas a una especie particular.

No se descarta la recolección de las plantas enteras de las especies a estudiar en jardines domésticos considerando que en la literatura inclusive hay reportes de investigaciones en las que la planta utilizada para un estudio de actividad farmacológica *in vivo* es adquirida de un jardín sin especificar el tipo de este último (botánico, doméstico, entre otros), un ejemplo de ello es la determinación de actividades farmacológicas en ratas tratadas con el aceite esencial y el extracto acuoso de partes aéreas de *Satureja viminea* en la cual los autores solo refieren que la planta fue adquirida de un jardín dentro de los límites de San Pedro de Montes de Oca y que posteriormente fue llevada a un herbario para su reconocimiento y asignación del código respectivo, este estudio fue publicado en 2003 en la Revista de Biología Tropical bajo el nombre “*Pharmacological activity of the essential oil of Satureja viminea (Lamiaceae)*” (259). En otra investigación publicada en la revista *Phytotherapy Research* en 2001, la cual reporta el aislamiento de 2-metoxi-1,4-naftoquinona a partir de partes aéreas de IB, se indica incluso que el material vegetal fue comprado en un mercado local de provincia de Henan en China (53), por lo tanto no se observa una limitante válida que impida que el material vegetal se obtenga de un jardín doméstico.

Sin embargo, los lugares de recolección deberán cumplir con los requerimientos señalados por la Organización Mundial de la Salud en el manual *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants* publicado en 2003, el cual indica que este no puede ser una zona con altos niveles de pesticidas u otro tipo de contaminantes, orillas de carreteras, cercanías de drenajes, minas, botaderos o plantas industriales, ni a orillas de ríos cuando el sitio donde se encuentra la planta se localiza a un nivel inferior de zonas de pastoreo

de animales, esto con la finalidad de evitar la contaminación química o microbiana del material vegetal (260).

Los lugares de recolección se identificarán como zonas puntuales para cada planta (un solo punto de recolecta), estos serán identificados mediante sus coordenadas USNG disponibles sin necesidad de conectividad a internet para cualquier dispositivo de teléfono móvil con localizador GPS mediante la dirección web usngapp.org desarrollada por *U.S National Grid Information Center*, ente adscrito a *Federal Geographic Data Committee* del gobierno de los Estados Unidos, el código de las coordenadas USNG puede ser transformada al formato de coordenadas grados, minutos y segundos del sistema geodésico estándar mediante la aplicación web *Geographic Translator* disponible en la dirección electrónica http://egeoint.nrlssc.navy.mil/web_geographic_translator/ desarrollada por *National Geospatial-Intelligence Agency*, organización gubernamental de los Estados Unidos. La altitud para el sitio de recolección con las coordenadas previamente determinadas se establecerá mediante la aplicación Visor Cartográfico desarrollada por el Sistema Nacional de Información Territorial de Costa Rica disponible en la dirección web <http://www.snitcr.go.cr/visor/>.

En el caso de IB esta corresponde normalmente a una especie cultivada con fines ornamentales, por lo que toma fuerza la posibilidad de su recolección en un jardín que se encuentre entre los 500 y 1500 m sobre el nivel del mar que corresponde a la altitud en la cual habita normalmente esta planta (254). El lugar de recolección de IH forzosamente deberá ser en un jardín o vivero considerando que no se reporta su diseminación fuera de las áreas de cultivo, se recolectaron plantas de esta especie con las características originales descritas en el marco teórico.

IW se caracteriza por ser una especie invasora ampliamente distribuida en Costa Rica, en zonas con humedad constante de entre los cero y dos mil metros de altitud sobre el nivel del mar manteniendo floración todo el año (242), por lo tanto se procederá a su búsqueda en zonas con esas características, no se descarta su búsqueda dentro de parques nacionales del Área de la Cordillera Volcánica Central y el parque nacional Tapantí para lo cual se procederá a la

solicitud de los permisos respectivos ante la oficina regional del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) correspondiente posterior a la obtención de permiso de la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica.

En cuanto a la época de recolección, al menos en la revisión hecha en artículos indexados en la base de datos PubMed hasta el 21 de enero de 2016 sobre actividades farmacológicas de extractos de plantas del género *Impatiens* o sus metabolitos no se indica el estudio de IW o IH y por lo tanto se desconoce la época del año más apropiada para su recolección con la finalidad de observar sus posibles valores máximos para los niveles de compuestos fenólicos o de actividad antimicrobiana y citotóxica, en el caso de IB, hay un antecedente del estudio de la determinación de la actividad antimicrobiana y niveles de compuestos fenólicos en función de la época de recolección señalando a Julio como el mes en que más producción de compuestos fenólicos se presenta así como una mayor actividad antimicrobiana, sin embargo dicha investigación fue llevada a cabo en Corea (51), un país de clima no tropical a diferencia de Costa Rica, por lo que se desconoce si lo anterior es aplicable para las plantas de IB presentes en este último país. Por lo tanto la época de recolección óptima para las especies tres plantas se desconoce, sin embargo será un requisito indispensable que las plantas tengan flor para su correspondiente reconocimiento botánico.

El proceso de recolección de las plantas y su preparación para su depósito en el herbario se llevará a cabo con base a la “Guía para recolectar y preparar muestras botánicas” publicada en 2008 por el Herbario Nacional de Costa Rica (261). Preliminarmente se pretende preparar muestras por triplicado para cada planta para su transporte el día inmediatamente posterior al de la recolección, las muestras serán llevadas al Herbario Nacional de Costa Rica o bien al Herbario de la Universidad de Costa Rica Dr. Luis A. Fournier Origgí (USJ) para su reconocimiento botánico y asignación de código de herbario. Se tomaron anotaciones de campo relacionadas con la dirección de los lugares de recolección, fecha y hora de la recolección, el tipo de ecosistema que rodea a las plantas y de sus características botánicas (dimensiones de sus hojas, flores y frutos (si los presentan), altura de la planta, características de la flor y hojas).

En la presente propuesta de investigación se plantea el estudio de tres especies del género *Impatiens* de alta difusión, sin embargo existe la posibilidad de extender el proyecto a cuatro especies, en caso de poder lograr recolectar una cantidad suficiente de la especie *Impatiens turrialbana* (IT) (descripción botánica en Anexo). De los 36 especímenes preservados con los cuales el Instituto Nacional de Biodiversidad indica disponer, 10 se han recolectado en el cantón de Paraíso (en cinco diferentes puntos de recolecta de acuerdo a las coordenadas geográficas del sitio de recolección), 9 en el cantón de Alvarado (mismo punto de recolecta de acuerdo a las coordenadas geográficas del sitio de recolección) y 17 en el cantón de Talamanca (en ocho diferentes puntos de recolecta de acuerdo a las coordenadas geográficas del sitio de recolección. Los puntos de recolecta en el sector de Paraíso se localizan entre los $9,6375^{\circ}$ y $9,7555556^{\circ}$ latitud norte y entre los $83,77917^{\circ}$ y $83,84444^{\circ}$ longitud oeste, en zonas pertenecientes o cercanas al sector Tapantí del Parque Nacional Tapantí-Macizo de la Muerte el cual forma parte del Área de Conservación La Amistad-Pacífico; por otra parte los especímenes hallados en el cantón de Talamanca en zonas del Área de Conservación La Amistad-Caribe se han localizado en una área de mayor extensión (especímenes recolectados en puntos más dispersos) en comparación a los recolectados en el cantón de Paraíso, dicha área se circunscribe entre los $9,1166667^{\circ}$ y $9,422222^{\circ}$ latitud norte y entre los $82,96111^{\circ}$ y $83,325^{\circ}$ longitud oeste (262).

Considerando el número de puntos de recolecta en el cantón de Paraíso así como su menor dispersión en comparación con los de cantón de Talamanca, se procederá a la búsqueda con fines de recolecta en el sector Tapantí del Parque Nacional Tapantí-Macizo tomando como referencia las coordenadas geográficas indicadas anteriormente. Para ello se procederá a solicitar el permiso de recolecta al Área de Conservación La Amistad-Pacífico previa aprobación por parte de la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica; el proceso de recolección sería llevado a cabo mediante el mismo procedimiento descrito para las otras tres especies de *Impatiens* anteriormente mencionadas.

6.2 Preparación de los extractos:

El proceso de secado se llevará a cabo siguiendo la metodología descrita por Wang et al. (106,129), de modo que las plantas enteras serán sujetas a secado a una temperatura menor a los 60 °C sustituyendo la corriente de aire caliente descrita originalmente por el uso de una estufa de calentamiento, Wang et al. (106,129) no define la duración del proceso de secado, por lo que se dará el tiempo suficiente para permitir el molido adecuado del material vegetal seco, de ser necesario una duración superior a un día para el secado, el mismo se interrumpirá por la noche y se proseguirá el día siguiente por motivos de seguridad. Con respecto al proceso de molienda, este se llevará a cabo con molino o procesador de alimentos, Wang et al. (106,129) reporta la reducción a polvo de tamaño de partícula de 0,25 mm, lo que sugiere el uso de un tamiz de tamaño lineal de apertura de 250 μ m (tamiz número 60 según la farmacopea de los Estados Unidos (263)) para el calibrado final del tamaño de partícula del polvo.

El método de extracción empleado será el descrito por Kang et al. (51) con modificaciones en la concentración de la disolución hidroalcohólica (95 % v/v) así como la introducción de aplicación de agitación con ultrasonido durante 30 minutos a las dos semanas después de iniciado el proceso de maceración del material vegetal pulverizado, se emplearán 10 mL de disolvente por cada gramo del extracto. Otra modificación es la filtración con manta antes de la filtración con papel Whatman No. 2, posterior al proceso de filtración se procederá la evaporación al vacío del disolvente de extracción mediante el uso de evaporador rotatorio con una temperatura de baño maria no superior a los 40 °C hasta la remoción completa del etanol, el residuo será secado completamente mediante liofilización. Los extractos secos serán almacenados para su posterior análisis a una temperatura inferior a los 4 °C de forma similar a lo descrito por Su et al. (52).

6.3 Cuantificación de compuestos fenólicos:

6.3.1 Determinación de compuestos fenólicos totales por el método colorimétrico de Folin–Ciocalteu:

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se llevará a cabo mediante el método de determinación colorimétrica de Folin–Ciocalteu, el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) es una disolución de los ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico los cuales consisten en complejos metálicos hexavalentes y cuya coloración es amarilla (264-265), la reacción de reducción-oxidación consiste en la reducción de los iones metálicos Mo^{+6} y W^{+6} mediante la captación de uno o dos electrones para formar complejos metálicos con los compuesto fenólicos los cuales son las especies sujetas a oxidación, permitiendo la obtención de complejos de coloración azul los cuales pueden ser determinados espectrofotométricamente a una longitud de onda cercana a los 760 nm, siendo la intensidad de dicha solución proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el medio (265). Debe aclararse que si bien este método es ampliamente aplicado para la determinación colorimétrica de compuestos fenólicos totales en productos herbarios, puede tener limitaciones en cuanto especificidad considerando que el RFC puede reaccionar con otros agentes reductores presentes en medio en que tiene lugar la reacción, como aminoácidos, tioles, proteínas, carbohidratos ácidos grasos insaturados (266), de hecho no es extraño que en la literatura se haga uso de este método para la determinación del poder reductor de antioxidantes sintéticos (267). Para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos se debe utilizar una patrón de referencia que suele ser catequina, ácido gálico, ácido tánico o pirogalol con base al cual se expresan la cantidad de compuestos fenólicos (268).

Para el siguiente estudio el patrón de referencia a utilizar será ácido gálico (AG) tomando como antecedente la cuantificación de compuestos fenólicos totales de los tallos de IB determinada por Su et al. (52). Se desconoce el intervalo de concentraciones de las soluciones estándar de ácido gálico para fijar la curva de calibración, ante este problema se procederá a un estudio preliminar mediante la preparación de una solución madre de 1 mg/mL de cada extracto en

etanol al 95 % v/v a partir de estas se procederá a preparar disoluciones de 0,5 mg/mL y 0,25 mg/mL en agua destilada de cada uno de los extractos, de estas tres disoluciones se tomará una alícuota de 1 mL con las que se procederá preparar tres muestras independientes (una por alícuota de cada disolución) siguiendo la metodología descrita por Ghosh et al. (descrita en detalle más adelante) (269), luego se determinará la absorbancia por triplicado a 760 nm (pico de absorción máxima se determinará mediante espectro de absorción entre 730 nm y 780 nm) después de someter a las alícuotas a reacción con RFC en un matraz volumétrico de 25,00 mL.

Dependiendo de la intensidad de la lectura de absorbancia obtenida con las disoluciones de los tres extractos se tomará la decisión de reducir, aumentar o fijar la concentración de estos en las disoluciones que servirán para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, además con estos se procederá a definir el intervalo de concentraciones de las disoluciones estándar, para la cual puede ser de utilidad tomar como una guía de referencia al cuadro II en el cual se presenta el intervalo de absorbancia en función del intervalo de la concentración de AG reportado en varias fuentes. Todo este procedimiento se hace con la finalidad de establecer una sola curva o recta de calibración estándar con soluciones patrón de ácido gálico para la determinación de la cantidad de compuestos fenólicos de los tres extractos de modo que se ahorren los recursos y tiempo que implicaría la preparación de tres rectas de calibración independientes para cada extracto (optimización de concentración de extractos y soluciones estándar de AG para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos).

Cuadro II. Intervalo de absorbancia en función del intervalo de concentración de las disoluciones estándar de AG empleadas para la cuantificación de compuestos fenólicos totales según literatura consultada.

Intervalo de concentraciones de las soluciones estándar de AG (□g/mL)	Volumen de alícuota de solución estándar de AG por mililitro de muestra preparada para la lectura de absorbancia (mL)	Intervalo de absorbancia media a (UA) [□ (nm)]	Número de referencia*
0,1-0,5	0,25 mL	0,3253-0,5858 [750]	270

0,8-25	0,1 mL	0,0456-0,1935 [760]	271
10-75	0,1 mL	0,170-1,150 ⁺ [760]	272
20-100	0,1 mL	0,170-1,200 ⁺ [750]	273
25-700	0,04 mL	0,100-0,900 ⁺ [750]	269

⁺Aproximado mediante inspección visual de la curva estándar presentada por los autores. [#] Calculado como el cociente del volumen de la alícuota entre el volumen final de la muestra empleada para la determinación de la absorbancia. Absorbancia determinada después de dos horas de incubación de la muestra. *Número de referencia coincide con la lista final de referencias.

Fuente: Recopilación de varias referencias.

Una vez determinado el intervalo de concentraciones para la elaboración de la curva de calibración se procederá al análisis de los extractos para ello se toman como guías de referencia los procedimientos descritos por Ghosh et al. (269) y Lee (274). Se prepararán 25,00 mL de disolución madre de AG 4 mg/mL a partir de la cual se procederá a preparar 5 o 7 disoluciones estándar en matraces volumétricos de 25,00 mL, dependiendo de la amplitud necesaria del intervalo concentración de las disoluciones estándar para fijar la curva de calibración, la disolución de concentración media servirá para fijar el espectro de absorción desde los 730 nm hasta los 780 nm y el pico de máxima densidad óptica. Las muestras para la determinación de la absorbancia (soluciones estándar y solución de extracto) se pueden preparar tomando una alícuota de 1,00 mL de cada disolución para posteriormente transferirla a un balón aforado de 25,00 mL que contiene 9 mL de agua destilada, al mismo se añade 1 mL de RFC 2 N, se procede a agitar levemente y dejará en reposo el contenido del balón por espacio de 5 minutos, posteriormente se añade 10 mL de una disolución de carbonato de sodio anhidro al 7 % p/v y se lleva el balón a aforo con agua destilada para dejar reposar el contenido del mismo por 2 horas a temperatura ambiente (periodo de incubación). Conociendo el pico de absorción máxima, se procederá a la lectura de absorbancia de las muestras por triplicado a esa longitud de onda empleando como blanco una muestra preparada sustituyendo la alícuota de solución de extracto o de patrón de AG por agua destilada.

El solvente de las diluciones del extracto corresponderá etanol al 95 % v/v para garantizar la disolución completa de sus componentes de igual forma aplica para la disolución madre de

ácido gálico, lo cual no debería representar una interferencia considerando que el ensayo en cuestión puede llevarse a cabo con un disolvente que sea completamente miscible con el agua (265). Por otra, parte es recomendado llevar a cabo los procedimientos bajo protección de la luz (268).

Para el cálculo de los compuestos fenólicos totales se utilizará la fórmula:

$$CFT = [(Abs-b) \cdot V \cdot FD] / [m \cdot M \cdot 1000]$$

Donde CFT es la cantidad compuestos fenólicos totales en mg por g (mg/g) del extracto en términos de AG, Abs es la absorbancia de la muestra con disolución del extracto en unidades de absorbancia (UA), b es el intercepto de curva de calibración estándar en UA, V es el volumen en mL de la disolución del extracto a partir de la cual se toma la alícuota para preparar la muestra que servirá para la determinación de la absorbancia, m es la pendiente de la recta de mejor ajuste en unidades de mL por μ g (mL/ μ g), FD es el factor de dilución (si aplica), M es la masa en gramos del extracto para la preparación de la disolución de partida y 1000 es el factor de conversión de μ g a mg. La curva estándar será gráfica empleado el software GraphPad Prism 5.0 o alternativamente Excel, en la respectiva figura se colocaran los valores del coeficiente de determinación (r^2), los parámetros de la recta de mejor ajuste (ecuación de la recta) así como el error típico asociado a cada uno de ellos, además se establecerá un análisis de significancia estadística mediante la prueba t de student para cada parámetro de la recta. Los valores de CFT se reportarán con su respectivo valor de error estándar.

Para el establecimiento de diferencias entre las medias de los valores de CFT para los extractos se llevará a cabo un ANOVA de una vía siguiendo lo descrito por Kang et al. (51) y Su et al. (52), mientras que para la comparación de las medias entre grupos se llevará a cabo una prueba o test de Duncan de acuerdo a lo descrito por Su et al. (52), el valor de significancia para dichas pruebas estadísticas corresponderá a $\alpha = 0,05$. Las pruebas estadísticas se llevarán a cabo mediante el software GraphPad Prism 5.0.

6.3.2 Cuantificación colorimétrica de flavonoides:

La cuantificación de flavonoides totales se llevará por medio del método colorimétrico de formación de complejos de este tipo de compuesto con cloruro de aluminio, el método está basado en la formación de complejos de transferencia de carga entre el ión Al^{3+} y los electrones deslocalizados de los flavonoides los cuales son estables en disolución acuosa con pH básico dotando a las mismas de una coloración rosácea cuya intensidad puede determinarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de aproximadamente 410 nm en el caso de que se emplee quercetina como estándar (51,275).

Mediante el método de determinación colorimétrica de flavonoides totales es posible cuantificar la cantidad de dichos metabolitos en términos de un flavonoide de referencia, entre ellos se puede mencionar a la rutina, catequina y la quercetina, sin embargo en un reciente estudio se ha comprobado que este método, ampliamente utilizado para la determinación de compuestos fenólicos totales en producto herbales es en realidad útil para cuantificar únicamente flavonoles y luteolina (flavona) cuando se usa el pico de absorbancia máxima a 410-430 nm mientras el uso de una longitud de onda 510 nm es útil para la cuantificación de luteolina, rutina, catequinas y ácidos fenólicos, por lo tanto puede resultar incorrecto indicar que este método permite cuantificar de manera absoluta a todos flavonoides (276).

Al igual que para la determinación de compuestos fenólicos, se tiene incertidumbre sobre el intervalo adecuado de concentraciones para las disoluciones estándar, ante esta situación se preparan disoluciones de 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL de los extractos (las dos últimas concentraciones corresponden a la de las mismas disoluciones que serán empleadas en la optimización de concentraciones para la determinación de compuestos fenólicos totales), seguidamente se procederá a la preparación de la muestra para la lectura de absorbancia siguiendo el procedimiento que integra lo descrito por Kang et al. (51), con modificaciones, se tomará una alícuota de 1,00 mL de las diluciones del extracto transferirá a un tubo de ensayo de 20 mL (preferiblemente un balón aforado de 10 mL para mayor reproducibilidad) que

contiene 4 mL de agua destilada se procederá a la adición de 0,3 mL nitrito de sodio (NaNO_2) al 5 % p/v a los 5 minutos se añadirán 0,3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10 % p/v a los 6 minutos se procederá a la adición de 2 mL de hidróxido de sodio 1 M, la disolución será posteriormente llevada a un volumen de 10 mL (adicionar 1,4 mL de agua con pipeta graduada) con agua destilada y se procede a la lectura de la absorbancia a 410 nm por triplicado (previo establecimiento del espectro de absorción entre 380 y 440 nm para determinación del pico de absorción máxima). El blanco a utilizar corresponde a una muestra preparada sustituyendo el volumen de disolución del extracto o de las disoluciones patrón por agua destilada (277). Algunos autores han procedido a la medición de la absorbancia a los 30 minutos después de preparar la muestra (269,278-279).

Dependiendo de la intensidad de la lectura de absorbancia obtenida con las disoluciones de los tres extractos se tomará la decisión de reducir, aumentar o fijar la concentración de estos en las disoluciones que servirán para la determinación cuantitativa de flavonoides totales, además con estos se procederá a definir el intervalo de concentraciones de las disoluciones estándar para lo cual puede ser de utilidad tomar como guía de referencia al cuadro III en el cual se presenta el intervalo de absorbancia en función del intervalo de la concentración de quercetina reportado en varias fuentes. Todo este procedimiento se hace con la finalidad de establecer una sola curva o recta de calibración estándar con disoluciones patrón de quercetina para la determinación de la cantidad de flavonoides de los tres extractos de modo que se ahorren los recursos y tiempo que implicaría la preparación de tres rectas de calibración independientes para cada extracto (optimización de concentración de extractos y soluciones estándar de quercetina para la determinación cuantitativa de flavonoides totales).

Cuadro III. Intervalo de absorbancia en función del intervalo de concentraciones de disoluciones estándar de quercetina empleadas para la cuantificación de compuestos fenólicos totales según literatura consultada

Intervalo de concentraciones de las soluciones estándar de quercetina (\square g/mL)	Volumen de alícuota de solución estándar de quercetina por mililitro de muestra preparada para la lectura de absorbancia (mL) [#]	Intervalo de absorbancia media a (UA) [\square (nm)]	Número de referencia*
---	--	---	-----------------------

2,5 - 40	0,1	0,0365-0,117 [415]	279
10-100	0,1	0,05-0,33 ⁺ [415]	269
100-1000	0,1	0,10-0,75 ⁺ [415]	278

⁺Aproximado mediante inspección visual de la curva estándar presentada por los autores. [#] Calculado como el cociente del volumen de la alícuota entre el volumen final de la muestra empleada para medición de la absorbancia. *Número de referencia coincide con la lista final de referencias.

Fuente: Recopilación de varias referencias.

Una vez determinado el intervalo de concentraciones para la elaboración de la curva de calibración se procederá al análisis de los extractos para ello se procederá a preparar 25 mL de una disolución madre de quercetina de concentración 1 mg/mL a partir de la cual se procederá a preparar 5 o 7 disoluciones estándar en matraces volumétricos de 25,00 mL dependiendo de la amplitud necesaria del intervalo concentración de las disoluciones estándar para fijar la curva de calibración, la disolución de concentración media servirá para fijar el espectro de absorción desde los 380 nm hasta los 440 nm y el pico de mayor densidad óptica. Las muestras se preparan del mismo modo que se describió anteriormente, las disoluciones estándar de quercetina así como las de extracto serán preparadas con etanol al 90 % v/v con la finalidad de garantizar la solubilización completa de la quercetina y de los componentes del extracto, no se espera que el disolvente a utilizar genere problemas considerando que este tipo de análisis ya se ha llevado a cabo con concentraciones de etanol de entre el 90 % v/v y los 80 % v/v el mismo (278,280).

Para el cálculo de flavonoides totales se utilizará la fórmula:

$$FT = [(Abs-b) \cdot V \cdot FD] / [m \cdot M \cdot 1000]$$

Donde FT es la cantidad compuestos fenólicos totales en mg por g (mg/g) del extracto en términos de quercetina, Abs es la absorbancia de la muestra con disolución del extracto en unidades de absorbancia (UA), b es el intercepto de curva de calibración estándar en UA, V es el volumen en mL de la disolución del extracto a partir de la cual se toma la alícuota para preparar la muestra que servirá para la determinación de la absorbancia, m es la pendiente de

la recta de mejor ajuste en unidades de mL por μg ($\text{mL}/\mu\text{g}$), FD es el factor de dilución (si aplica), M es la masa en gramos del extracto para la preparación de la disolución de partida y 1000 es el factor de conversión de μg a mg. La curva estándar será gráfica empleado el software GraphPad Prism 5.0 o alternativamente Excel, en la respectiva figura se colocaran los valores del coeficiente de determinación (r^2), parámetros de la recta de mejor ajuste (ecuación de la recta) como el error típico asociado a cada uno de ellos, además se establecerá un análisis de significancia estadística mediante la prueba t de student para cada parámetro de la recta. Los valores de FT se reportaran con su respectivo valor de error estándar.

Para el establecimiento de diferencias entre las medias de los valores de FT para los extractos se llevará a cabo un ANOVA de una vía siguiendo lo descrito por Kang et al. (51) y Su et al. (52), mientras que para la comparación de las medias entre grupos se llevará a cabo una prueba o test de Duncan de acuerdo a lo descrito por Su et al. (51), el valor de significancia para dichas pruebas estadísticas corresponderá a $\alpha = 0,05$. Las pruebas estadísticas se llevarán a cabo mediante el software GraphPad Prism 5.0.

6.4 Determinación de actividad antioxidante *in vitro*:

6.4.1 Determinación de la actividad secuestrante o captadora de radicales libres por medio del ensayo de reducción difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Como parte de la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*, será determinada la capacidad secuestrante o captadora de radicales libres por medio del ensayo de difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), este método se basa en el hecho de que el radical libre DPPH puede ser reducido por los compuestos antioxidantes mediante la donación de un átomo de hidrógeno (radical hidrógeno) de modo que se genera una especie no radicalaria (la respectiva hidrazina de DPPH), mientras el agente antioxidante se convierte en un radical más estable que el DPPH, éste proceso de estabilización es lo que se conoce como capacidad secuestrante de radicales libres (51,281-283), el radical DPPH se caracteriza por ser estable en el sentido de que la alta

deslocalización de su electrón desapareado no favorece la dimerización de DPPH, algo que suele suceder entre los radicales libres (283), mientras los compuestos fenólicos corresponden a uno de los antioxidantes susceptibles a la donación del átomo de hidrógeno para la estabilización del radical DPPH (284).

Las disoluciones metanólicas y etanólicas del radical de DPPH se caracterizan por presentar un pico de absorbancia cercana a los 515 nm y 520 nm de longitud de onda respectivamente (281,283), además exhiben una coloración violeta intensa que se reduce estequiométricamente con la cantidad de electrones transferidos a los radicales DPPH del medio, lo cual es proporcional a la cantidad de antioxidantes presente en el medio de reacción (283), lo que permite la estimación de la capacidad secuestrante de radicales del agente antioxidante evaluado por medio de espectrofotometría UV-vis usando además un estándar de referencia como el hidroxibutilanisol (BHA), ácido ascórbico o Trolox cuya actividad antioxidante será comparada con la sustancia antioxidante sujeta a prueba (51,281,283).

El método DPPH ha sido extensamente utilizado para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de sustancias con dicho efecto, sin embargo la revisión de las condiciones experimentales ha planteado serias dudas de sus alcances para la determinación de la actividad antioxidante considerando que el tiempo que se da para la lectura espectrofotométrica después de preparar la muestra puede ser inadecuado considerando que hay moléculas antioxidantes que reaccionan muy rápidamente mientras otras lo hacen de forma lenta o son inertes debido al impedimento estérico presentado por DPPH, además es posible que dada la estabilidad presentada por DPPH, este no demuestre la misma reactividad ni la misma relación estequiométrica que poseen los radicales libres responsables del daño oxidativo en los sistemas biológicos (284,285)

La selección de este método para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos se lleva a cabo considerando su amplio uso y que ha sido empleado por Kang et al. (51) y Su et al. (52) para la determinación de la actividad antioxidante de extractos de hojas y tallos de

IB, estos autores también reportan el uso de otros métodos, sin embargo solo el ensayo de DPPH es común entre sus investigaciones, además existen estudios recientes en los cuales se ha empleado este método para la determinación de la actividad antioxidante, dentro de ellos se pueden mencionar al estudio de la actividad antioxidante de protocatecuatos mediante el ensayo DPPH adaptado a la lectura espectrofotométrica de microplacas (286), la comparación de la actividad antioxidante y poder reductor de moléculas antioxidantes de origen sintético y natural mediante el uso de distintos métodos que incluyen al ensayo DPPH (287) y la determinación de la actividad antioxidante de jugos preparados a partir del fruto de *Ficus carica* (288).

Para la determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH se seguirá el procedimiento descrito por Su et al. (52), el cual permitió la comparación de la actividad antioxidante de distintos tipos extractos de tallos de IB, se procederá a preparar disoluciones etanólicas de los extractos con concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL en balones aforados de 10 mL, se introducirá una modificación en la preparación de la muestra para la lectura espectrofotométrica considerando aspectos del procedimiento descrito por Berger et al. (289), para lo cual se añadirán 2,5 mL de cada disolución en tubos de ensayo de 10 mL que contiene 2,5 mL de disolución de radical DPPH a una concentración de 0,01 mg/mL, posteriormente la muestra será agitada levemente y colocada en lugar oscuro por 30 minutos a temperatura ambiente (incubación de la muestra).

Adicionalmente, siguiendo el procedimiento descrito por Su et al. (52), se procederá a preparar disoluciones estándar de ácido ascórbico con concentraciones de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 y 0,1 mg/mL, que servirán como patrón de comparación de la actividad antioxidante, siendo por lo tanto la muestra para la determinación de absorbancia preparada siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, el blanco para determinación espectrofotométrica será etanol de calidad adecuada para espectroscopía UV-vis, como control se utilizará una muestra preparada sustituyendo la alícuota de los agentes antioxidantes de prueba por etanol, por lo tanto el uso de etanol en lugar de metanol como disolvente será otra modificación introducida

con respecto a los procedimientos descritos por Berger et al. (289) y Su et al. (52). El espectro de absorción para la determinación de la longitud de onda óptima para el ensayo será llevado a cabo entre 480 y 540 nm con la disolución al 0,01 mg/mL de radical DPPH.

Para cada disolución de los extractos y de ácido cítrico se determinará por triplicado el valor del porcentaje de inhibición o de actividad captadora del radical libre DPPH el cual corresponde al porcentaje de reducción de la absorbancia de la muestra con el agente de prueba con respecto al control (52,289), para ello se hará uso de la siguiente expresión matemática:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [(Ac-Am)/Ac] \cdot 100$$

Donde Ac es la absorbancia del control y Am es la absorbancia de la muestra con extracto o ácido ascórbico.

Con los resultados se establecerá un gráfico del porcentaje de inhibición en función de la concentración de las sustancias a prueba (extractos y ácido ascórbico) indicando el intervalo de desviación estándar para cada concentración de forma similar. Posteriormente se establecerá una regresión no lineal entre el porcentaje de inhibición en función de la concentración para cada sustancia de prueba con la finalidad de obtener por extrapolación el valor de IC50 (concentración del agente antioxidante necesaria para reducir la absorbancia de la disolución del radical DPPH a la mitad con respecto al control). Los gráficos de el porcentaje de inhibición en función de la concentración así como las curvas para la determinación del valor de IC50 serán construidos mediante el software GraphPad Prism 5.0 o alternativamente Excel.

6.4.2 Determinación del potencial reductor:

La determinación de la actividad reductora de los extractos se llevará a cabo mediante el ensayo de determinación del potencial reductor, la cual permite establecer la capacidad de una sustancia de donar electrones, lo que a su vez se asocia con su actividad antioxidante (290). El poder reductor puede ser determinado *in vitro* mediante la reducción del ferricianuro potásico a ferrocianuro potásico, este último entra en coordinación con el ión Fe⁺³ libre para formar un

complejo que produce disoluciones de color azul con un pico de absorbancia a los 700 nm (292), la magnitud de la densidad óptica de las soluciones del complejo formado es proporcional a la actividad reductora de la sustancia evaluada (52).

El procedimiento convencional para este ensayo comprende la preparación de la muestra para la medición de su absorbancia tomando una alícuota de la disolución de prueba la cual se mezcla con 2,5 mL de buffer de fosfatos 0,2 M pH 6,6 y 2,5 mL de ferricianuro potásico 1 % p/v, la muestra es transferida en un baño maría a 50 °C por 20 minutos para luego ser tratada con 2,5 mL de ácido tricloroacético al 10 % p/v, 2,5 mL del sobrenadante de la mezcla resultante se combina con 0,5 mL de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 0,1 % p/v para proceder a la lectura de su densidad óptica a 700 nm utilizando como blanco una muestra preparada del mismo modo sustituyendo la alícuota de la disolución de extracto o ácido ascórbico por 1 mL de etanol (292). Sin embargo este procedimiento tiene como inconveniente que el pH de 6,6 fijado para la reacción de reducción no es necesariamente el adecuado para todos los tipos de compuestos; además existe el riesgo de la formación de precipitados de ferrocianuro férrico en la muestra preparada para la determinación de la respectiva absorbancia, lo cual depende del tiempo transcurrido para la medición de la densidad óptica desde la adición de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, por lo que generalmente la determinación de la absorbancia debe realizarse de forma abrupta luego de la adición de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (292).

Ante los inconvenientes del método convencional, se procederá a realizar el análisis de la capacidad reductora mediante el procedimiento optimizado descrito por Berker et al. (292), el cual permite evadir el riesgo de formación de precipitados en la muestra para la medición de absorbancia, así como el establecimiento de un pH óptimo para evitar la hidrólisis del ión férrico, además de establecer un tiempo de incubación óptimo con la finalidad de lograr que el proceso de reducción del ferricianuro sea más completo; dicho método ha sido validado para la determinación del potencial reductor de moléculas antioxidantes así como extractos de plantas de manera tal que es posible que se de la reacción con antioxidantes con el grupo

funcional tiol en su estructura lo cual no aplica para el resto de ensayos basados en la reducción del ión Fe^{3+} .

Para este ensayo se utilizará un procedimiento que integra lo descrito por Su et al. (52) y Berker et al. (292), se preparan disoluciones etanólicas (96% v/v) de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL de los extractos en balones aforados de 10 mL y disoluciones de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 y 0,1 mg/mL de ácido ascórbico que servirán como control positivo, para la preparación de la muestra se tomará una alícuota de 1 mL de la disolución sujeta a prueba, esta será transferida a un tubo de ensayo de 20 mL que contiene 6,3 mL de agua destilada, a esta mezcla se añadirán 0,2 mL de ácido clorhídrico 1 M posteriormente se adicionará 1,5 mL de ferricianuro potásico al 1% p/v y 0,5 mL de dodecilsulfato sódico al 1% p/v, finalmente se añadirán 0,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,2 % p/v. Una vez preparada la muestra, esta será incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hará la medición de su absorbancia utilizando como blanco una muestra preparada de la misma forma descrita anteriormente sustituyen la alícuota de la disolución de prueba por etanol (96% v/v) (292), la longitud de onda a utilizar para la medición de la densidad óptica corresponde a 750 nm que difiere a los 700 nm utilizados en el ensayo convencional debido al desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de máxima absorción que se produce por el cambio de las características del medio en que se da la reacción de reducción-oxidación (D33,D34), el ensayo se repetirá por triplicado para cada disolución.

Los resultados obtenidos serán representados de manera similar a la empleada por Su et al (52), se construirán gráficos de la absorbancia a 750 nm en función de la concentración de las disoluciones de prueba indicando para cada punto su respectivo intervalo de desviación estándar, para ello se utilizará el software GraphPad Prism 5.0 o alternativamente Excel. Adicionalmente se establecerá el valor de EC50 (concentración de la sustancia de prueba necesaria para alcanzar una densidad óptica de 0,5 U.A (52,294)) ya sea gráficamente (294), o bien mediante el uso de regresión lineal en caso de existir correlación estadísticamente significativamente entre la absorbancia y la concentración de las disoluciones de prueba que

permita el cálculo de EC50 por interpolación (295) o por extrapolación (296) para lo cual se usarán los software anteriormente mencionados indicando los respectivos valores de error estándar para los parámetros de las rectas de mejor ajuste.

6.5 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* mediante el método de difusión en agar cilindro-placa:

Para la de evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* se utilizara el método de difusión en agar cilindro-placa el cual se basa en la difusión del agente antibiótico sujeto a prueba a través de un medio de cultivo sólido inoculado con el microorganismo sobre cual se quiere determinar actividad antimicrobiana, en este ensayo se establece una comparación de la actividad antimicrobiana de la sustancia de prueba con respecto a un agente antimicrobiano de referencia específico para cada microorganismo empleado en el ensayo, la actividad antimicrobiana es evaluada a través de la medición del diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano que rodean los cilindros colocados encima del medio de cultivo dentro de los cuales se aplica un volumen exacto ya sea de disoluciones de la sustancia sujeta de prueba o bien del estándar de referencia (297-299).

Se propone la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de las especies del género *Impatiens* sujetas a estudio utilizando cuatro microorganismos *Candida albicans*, *Aspergillus spp.* (*A. fumigatis*, *A. flavus* o *A. niger*), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de modo que se pruebe la actividad antimicrobiana sobre una levadura, un moho, una bacteria gram positiva y una bacteria gram negativa respectivamente. No se emplearán cepas clínicas o resistentes a antimicrobianos considerando la recomendación de Cos et al. (300) de empezar las pruebas de actividad antimicrobiana primero con cepas susceptibles a antibióticos con la finalidad de determinar si es posible una actividad antimicrobiana significativa que permita escalar posteriormente el ensayo sobre cepas clínicas o con resistencia a antibióticos.

La metodología que se propone constituye a una adaptación para el estudio cualitativo de actividad antimicrobiana del ensayo de difusión en agar cilindro placa, usado comúnmente para la determinación de la potencia de agentes antibióticos de forma similar a lo descrito por Su et al. (52), autores que siguieron una metodología modificada basada en un ensayo de difusión en agar validado para la determinación de la potencia de formulaciones farmacéuticas con gatifloxacina (301).

Los procedimientos a utilizar para la preparación de la disolución estándar de antibiótico que servirá como control positivo será la misma que se indica en el capítulo 81 de la Farmacopea de los Estados Unidos de América en su versión número 36 (USP 36) (299). Las condiciones de cultivo óptimas para los cuatro microorganismos propuestos para la evaluación antimicrobiana se resumen en el cuadro IV indicando las respectivas referencias consultadas.

Cuadro IV. Condiciones de cultivo recomendadas para los microorganismos sobre los cuales se determinara la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de las plantas del género *Impatiens* sujetas a estudio.

Microorganismo	Medios de cultivo recomendados	Temperatura y tiempo de incubación	Referencias*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Soya tripticasa, Mueller Hinton	32-35 °C; 24 horas	299, 300
<i>Escherichia coli</i>	Soya tripticasa, Mueller Hinton	32-35 °C; 24 horas	299,300
<i>Candida albicans</i>	Dextrosa Sabouraud, Dextrosa papa	20-25 °C; 44-52 horas	299,300,302
<i>Aspergillus spp</i>	Dextrosa Sabouraud, Dextrosa papa	20-25 °C; de 6 a 10 días (para <i>A. niger</i>)	299,300,302

* Número coincide con el de la lista de referencias.

Fuente: Recopilación de varias fuentes

Los medios de cultivo serán preparados acatando las instrucciones del fabricante de su forma deshidratada en polvo. Los disolventes y concentraciones recomendados de la solución madre y solución de prueba del antimicrobiano que funcionará como control positivo se presentan en el cuadro V, en el mismo se proponen varios agentes antimicrobianos de referencia por microorganismo, sin embargo se utilizará solo uno, dicha escogencia estará sujeta a la disponibilidad de la sustancia antimicrobiana. La preparación de cada uno de estos disolventes y diluyentes se llevará a cabo siguiendo las instrucciones del capítulo 81 de la USP 36 (299).

Cuadro V. Concentraciones y disolventes recomendados para la preparación de las disoluciones patrón de los agentes antimicrobianos a utilizar como control positivo.

Microorganismo	Antimicrobianos de referencia	Concentración de la disolución madre (disolvente)	Estabilidad de la disolución madre	Concentración de la disolución de prueba (diluyente)	Referencias*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G	1000 U/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	4 días	1 U/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	299
	Cloxacilina	1 mg/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	7 días	5,0 μ g/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	
	Nafcilina	1 mg/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	2 días	2,0 μ g/mL (buffer de fosfatos pH 6.0 al 1% p/v ó B1 según USP 36)	
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	1 mg/mL (Producto de la dilución una alícuota de una disolución concentración 10 mg/mL de cloranfenicol en alcohol USP en agua destilada)	30 días	0,40 μ g/mL (agua)	299, 303
	Tetraciclina	1 mg/mL (ácido clorhídrico 0,1 N)	1 día	0,15 μ g/mL (agua) ⁺	299, 304

<i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus spp.</i>	Anfotericina B	1 mg/mL (dimetilsulfóxido)	Usar el mismo día de la preparación	1,0 □g/mL (buffer de fosfatos pH 10,5 0,2 M ó B10 según USP 36) 20 U/mL(buffer de fosfatos pH 6.0 al 10% ó B6 según USP 36)	299
	Nistatina	1000 U (dimetilformamida)	Usar el mismo día de la preparación		

* Número coincide con el de la lista de referencias. + Concentración para aplicar 30 □g de antibiótico por cilindro mediante una alícuotas de 200 □L, tomado como referencia el uso de esta cantidad de antibiótico en ensayos susceptibilidad a antibióticos mediante el ensayo de difusión en agar (304)

Fuente: Recopilación de varias fuentes.

Para la preparación de las placas de agar con los microorganismos de prueba debe partirse de un cultivo primario a partir del cual se obtiene el inóculo que servirá para la producción de los cultivos de trabajo, es importante mencionar que no deben existir más de cinco pasajes o repliques desde los viales que contienen originalmente al microorganismo hasta los cultivos de trabajo (299,305). En caso de partir desde el vial original que contiene el microorganismo, éste será reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener un cultivo madre o “stock”, a partir del cual se obtendrá un cultivo primario mismo que puede ser conservado por un máximo de tres semanas bajo temperaturas de 2 a 8 °C, dicho cultivo primario no deberá usarse por más de siete días para la preparación de los cultivos de trabajo (299,305). Para la obtención del cultivo primario se procederá a rozar levemente, con un asa de inoculación estéril, la superficie del cultivo obtenido a partir del vial original con el microorganismo, posteriormente una placa de agar con el medio adecuado (ver cuadro IV) será rayado levemente con un movimiento de zig-zag con la punta del asa y la placa será incubada adecuadamente para obtener el cultivo que servirá para preparar los cultivos de trabajo.

De acuerdo a la metodología descrita por Su et al. (52) los cultivos de trabajo son preparados sobre una capa base de 10 mL en placas petri de 90 mm de diámetro, sin embargo la USP 36 (299) establece como recomendación el uso de una capa base de 21 mL cuando se emplean placas petri de 100 mm de diámetro por 20 mm de ancho para la prueba de potencia de los antibacterianos del cuadro V excepto para el cloranfenicol (prueba de potencia farmacopeica se basa en el método turbidimétrico); en el caso de los antifúngicos del mismo cuadro no se

recomienda el uso de una capa base, sin embargo el ensayo farmacopeico se lleva a cabo con *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo fúngico de prueba (299). A pesar de las observaciones anteriores, en la presente propuesta de investigación se plantea el uso de una capa base para todos los agentes antimicrobianos de 20 mL de forma similar a lo descrito por Coelho de Souza et al. (303), con el fin de que haya mayor uniformidad en los procedimientos, además la metodología empleada por dichos autores contempla el uso de cloranfenicol y nistatina como controles positivos para la determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica respectivamente con el método cilindro-placa.

Con respecto a la preparación del inóculo a partir del cual obtendrán los cultivos de trabajo, es importante indicar que cada laboratorio que emplea el ajuste espectrofotométrico de la concentración del inóculo debe validar que esta corresponda a un determinado valor unidades formadoras de colonia por mililitro (306), a pesar de ello debe hacerse la aclaración que esto no es indispensable en el presente estudio considerando que lo que realmente se desea determinar es si los extractos de las especies de *Impatiens* sujetos a estudio tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano a una sola concentración de forma similar a la metodología descrita por Kang et al. (51) y Su et al.(52) para el estudio de la actividad antimicrobiana de extractos de diversas secciones anatómicas de IB, además se desea determinar si dicha inhibición es estadísticamente significativa con respecto a un control negativo (disolvente de la disolución del extracto) y al antibiótico empleado como control positivo cuando el extracto de prueba y los controles son probados bajo las mismas condiciones experimentales relacionadas con la elaboración del medio de cultivo, por lo tanto el alcance de los resultados del ensayo propuesto es cualitativo en el sentido de que el único objetivo de la prueba planteada para la presente propuesta de investigación es establecer si los extractos pueden producir una inhibición significativa del crecimiento microbiano, por ende no debe confundirse con una prueba de potencia de la actividad antimicrobiana cuyo alcance es cuantitativo (cuantificación de antibióticos).

Para la preparación del inóculo de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* se procederá a la adición de 3 mL de solución salina estéril sobre el cultivo primario fresco, se agitará levemente la placa para distribuir uniformemente la solución salina, posteriormente se tomará una alícuota de volumen adecuado (preliminarmente se hará con 1 mL) con una pipeta estéril de la suspensión que se encuentra sobre el cultivo, esta será transferida a un tubo de ensayo estéril, se procederá a la adición progresiva de solución salina estéril y agitación adecuada de la suspensión hasta obtener una transmitancia del 25 ± 2 % para la suspensión del microorganismo usando como blanco solución salina y una longitud de onda de 580 nm (299,307), en caso de que la suspensión esté muy por debajo de dicho nivel de transmitancia el mismo se puede ajustar añadiendo más solución salina estéril (308), en caso de que la transmitancia de la suspensión del inóculo esté por encima de la transmitancia deseada, se empleará un factor de normalización para el cálculo del volumen necesario de la misma para la inoculación de la capa de siembra, dicho factor consiste en la multiplicación por el volumen idealmente requerido de la suspensión salina por el cociente que se obtiene de dividir la transmitancia obtenida entre 25 (299).

Una suspensión de *E. coli* o *S. aureus* con una transmitancia de 25% a 580 nm contiene aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), lo cual satisface las condiciones del inóculo empleado en estudios de la actividad antibacteriana de distintos extractos de plantas que incluyen a *Lotus* spp. (Fabaceae) (309) y *Commiphora myrra* (310). Del inóculo ya preparado, se tomará una alícuota de 1 mL, misma que será mezclada con 100 mL del medio de cultivo fundido con una temperatura entre 45-50 °C, este medio de cultivo inoculado constituye a la capa de siembra que será posteriormente depositada sobre la capa base de cada cultivo de trabajo (299,307).

En el caso de *C. albicans*, el inóculo se preparará de forma similar a la descrita para las bacterias, sin embargo la turbidez del mismo se ajustará visualmente mediante la comparación con el estándar 0,5 de McFarland, el cual permite obtener una concentración del orden de entre $1,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ UFC/mL (311,312), posteriormente, a cada 25 ± 2 mL del medio de cultivo

fundido que servirá para la elaboración de la capa de siembra se le añadirá 1 mL de inóculo tomando como referencia la metodología empleada por Kosalec et al. (312).

Para la preparación del inóculo de *Aspergillus* spp. se procederá de forma similar lo descrito para el resto de microorganismos, sin embargo se sustituye la solución salina por 5 mL de agua destilada estéril al 5 % v/v de Tween 20 y se requiere de rozar levemente la superficie del cultivo primario con un asa estéril, la densidad óptica del inóculo se ajustará a 530 nm de acuerdo a la especie en particular a emplear en el ensayo (ver cuadro VII), idealmente la absorbancia del inóculo debe ser equivalente a entre $1,0 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, en el proceso de preparación del inóculo la suspensión que se encuentra sobre el cultivo primario deberá ser sometida a filtración con un filtro de membrana con tamaño de poro de 11 μ m acoplado a una jeringa (ambos estériles) con la finalidad de obtener un inóculo libre de la mayoría de hifas pero con las esporas que permiten replicar al microorganismo (313), una vez preparado el inóculo, un mililitro del mismo se aplicará sobre 100 mL del medio de cultivo fundido que servirá para la capa de siembra, esto con la finalidad de que el medio de cultivo cuente con aproximadamente 10^4 CFU/mL que corresponde a una concentración viable para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngicos cuando un inóculo de dicha concentración se esparce (“raya”) sobre la superficie del medio de cultivo, lo cual es válido para *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. glaucus* (314).

Cuadro VI. Intervalo de Densidad óptica del inóculo de *Aspergillus* spp. en función del intervalo del número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) contabilizadas con hemocitómetro.

Especie	Intervalo de UFC/mL [10^6]	Intervalo de densidad óptica a 530 nm
---------	--------------------------------	---------------------------------------

<i>A. fumigatus</i>	1,40–4,40	0,03–0,13
<i>A. flavus</i>	1,85–3,92	0,07–0,27
<i>A. terreus</i>	1,81–4,48	0,01–0,15
<i>A. niger</i>	1,31–4,46	0,20–0,50

Fuente: Petrikkou E, Rodríguez-Tudela M, Cuenca-Estrella A, Molleja A, Mellado E. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. J Clin Microbiol. Abril 2001; 39(4): 1345–1347.

Alternativamente al procedimiento descrito anteriormente para la preparación del inóculo de *Aspergillus* spp., se puede proceder según lo descrito por Cardoso & Schapoval (315), dichos autores proponen una metodología en la que se procede a filtrar el caldo de cultivo con el microorganismo que servirá para el establecimiento del inóculo con la finalidad de obtener las esporas, posteriormente se da la preparación del inóculo estableciendo una transmitancia de $25 \pm 2\%$ a 580 nm, de dicho inóculo se transfiere una alícuota de 1,5 mL a 100 mL medio de cultivo fundido que servirá para la elaboración de la capa de siembra, sin embargo debe aclararse que dicho procedimiento se ha utilizado en la preparación de cultivos de trabajo de *A. flavus* específicamente y no se establece el equivalente en UFC/mL para el inóculo. Cabe mencionar que es necesario que el inóculo se emplee dentro de los 15 minutos posteriores a su estandarización (299,311).

Una vez que los medios de cultivo para la preparación de las capas de siembra hayan sido inoculados, se procederá a su colocación sobre la capa de base, específicamente se adicionaron 5 mL de medio de cultivo fundido inoculado por cada placa de petri, una vez solidificada la capa de siembra se procederá a la colocación de 6 cilindros de acero inoxidable de 10 mm de altura, 6 mm de diámetro interno y 8 mm de diámetro externo por cada cultivo de trabajo (299). En dos cilindros se colocarán 200 μ L de disolución de extracto a una concentración de 10 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) considerando los procedimientos de Kang et al. (51) y Su et al. (52), en otros dos cilindros se colocará el mismo volumen del control positivo

correspondiente (ver cuadro IV), mientras que en los últimos dos cilindros se colocará 200 μ L de dos controles negativos, DMSO y el diluyente final del control positivo de acuerdo a lo descrito por Coelho de Souza et al. (303), el patrón propuesto para la colocación de las disoluciones en los cilindros se muestra en la figura 1, el análisis de cada extracto se llevará a cabo al menos por triplicado por microorganismo de prueba de conformidad con la metodología empleada por Su et al. (52).

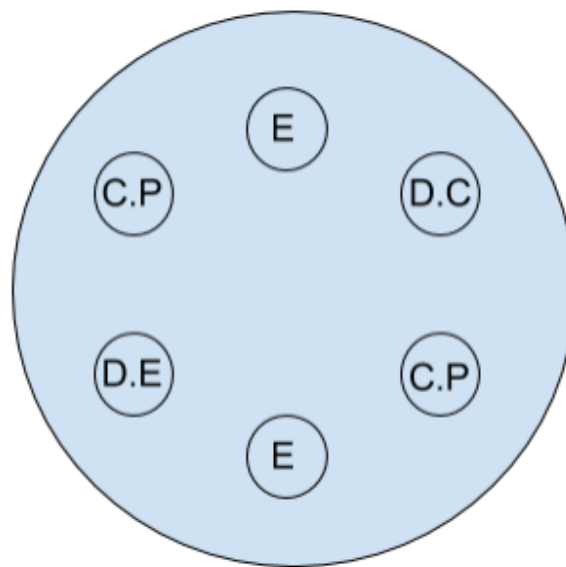


Figura 1. Patrón propuesto para la colocación de las disoluciones de prueba en las placas con cultivo de trabajo en la prueba de difusión en agar cilindro-placa. Los círculos pequeños representan los cilindros de acero inoxidable; E: disolución del extracto, C.P: disolución del antibiótico empleado como control positivo, D.E (control negativo): disolvente del extracto (DMSO), D.C (control negativo): disolvente del antibiótico empleado como control positivo.

Las placas preparadas serán posteriormente incubadas a 37 °C por 24 horas en el caso de los cultivos bacterianos, en el caso de los cultivos fúngicos estos serán incubados a 28 °C por 48 h (52). Posterior al proceso de incubación se procederá a la medición y registro del diámetro de los halos inhibición asociados a cada disolución o control siguiendo la metodología descrita por Cavalieri et al. (308). Los datos serán tabulados con su respectivo valor de desviación estándar y serán sometidos al análisis ANOVA de una vía para determinar la existencia

significativa entre los resultados obtenidos con las sustancias de prueba, adicionalmente se aplicará una prueba de Duncan para la determinación de diferencias entre las medias del diámetro del halo de inhibición del crecimiento microbiano obtenido para los extractos y los controles de manera similar al análisis de resultados establecido por Su et al (52). El análisis estadístico se llevará a cabo con un valor de significancia de $\alpha = 0,05$, para el mismo se utilizará el software GraphPad Prism versión 5.0.

6.6 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* mediante el ensayo de reducción de MTT:

Para la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos en cuestión se plantea el uso del ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)) adaptado para la lectura de microplacas con 96 pozos, este método se fundamenta en la conversión del MTT (soluciones de coloración amarillo) a formazán a través de la reducción de la primer especie química debido al metabolismo de las células viables presentes en el medio en que tienen lugar la reacción, el formazan tiene la capacidad de teñir sus soluciones de color púrpura con un pico de absorbancia máxima cercana a los 570 nm, misma que es proporcional a la cantidad de formazán y al número de células viables presentes en el medio de reacción (316,317).

Con respecto a las células sobre las cuales se quiere determinar actividad citotóxica para los extractos, se plantea el uso de al menos una línea celular humana ya sea de cáncer gástrico, cáncer pulmonar o cáncer colorrectal, los cuales son los tipos de cáncer que mayor mortalidad producen a nivel mundial de manera indistinta entre hombres y mujeres, sin embargo eventualmente pueden emplearse líneas celulares humanas de cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer hepático o cáncer esofágico los cuales junto con los otros tipos de cáncer mencionados anteriormente constituyen los siete tipos de cáncer de mayor mortalidad (16), esto dependerá de la disponibilidad de líneas celulares de cáncer humano que se encuentren en replicación y mantenimiento periódico.

Con relación a las condiciones recomendadas para los cultivos celulares, estas pueden variar entre las diferentes líneas, por lo tanto para las líneas celulares con las que se llevará a cabo el procedimiento se puede proceder a su mantenimiento y subcultivo de acuerdo a las guías específicas de “*American Type Culture Collection*”, sin embargo cabe mencionar que en términos generales existen dos tipos de cultivos celulares, los adheridos en la superficie de frascos de cultivo tisular (“*T flask*”) formando una monocapa y los que se mantienen en suspensión (317).

Los procedimientos de mantenimiento de los cultivos celulares en monocapas para los cuales no se quiere establecer replicación debería darse idealmente de forma diaria, sin embargo en términos generales se recomienda llevarlos a cabo al menos de entre 2 a 3 veces por semana (317), esto implica la revisión macroscópica así como con microscopio (recomendablemente con microscopios invertidos con un aumento de 40X) del cultivo con la finalidad de descartar cambios significativos en la morfología celular, la contaminación con otros microorganismos (hongos o bacterias), cambios en la turbidez del cultivo, cambios de coloración del medio de cultivo vinculados a cambios de su pH (coloración amarilla o morada en medios con rojo fenol) (317-318). El procedimiento de mantenimiento de cultivos en monocapa sin proceder a su subcultivo consiste en la extracción aséptica del medio cultivo antiguo y la adición del mismo volumen de medio de cultivo fresco, dicho medio de cultivo contiene además los suplementos necesarios para el mantenimiento de la viabilidad celular y prevención de la contaminación microbiana (antibióticos, suero bovino, entre otros), posteriormente se procede a devolver el cultivo en monocapa en el frasco original a una incubadora a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO₂ (318).

En el caso de los cultivos celulares conservados como suspensión, el proceso de inspección también debe llevarse a cabo, en este caso el procedimiento de mantenimiento consiste en centrifugar a la suspensión en un contenedor para centrífuga estéril adecuado a 600 g por 5 minutos, el sobrenadante es retirado y el pellet o precipitado con las células es resuspendido con medio de cultivo fresco generalmente basta con dividir el cultivo de la suspensión en

razones de entre 1/5 y 1/10 en un recipiente con medio de cultivo fresco, el cultivo es devuelto a sus condiciones usuales de incubación (318).

Con respecto al procedimiento de subcultivo es importante indicar que debe ser registrado el número de pasajes desde la línea celular obtenida del cultivo primario, en el caso de las células conservadas como monocapa, el subcultivo debe darse cuando dicha capa cubre entre el 80 y el 90 % de la superficie del frasco para cultivo tisular lo cual indica que las células se encuentra en la fase logarítmica tardía o temprana de meseta del proceso de su replicación, además debe ser sometido a la misma inspección de su calidad descrita anteriormente (318), inicialmente debe retirarse el medio de cultivo y la monocapa con las células posteriormente son lavadas dos veces con buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) libre de iones magnesio y calcio, en caso de usar frascos para cultivo tisular de 25 cm² de superficie se recomienda hacer los lavados con entre 1 y 2 mL de PBS mismos que posteriormente son descartados (319), luego debe añadirse de entre 1 mL a 2 mL de solución de tripsina con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (0,25% Tripsina/0,53 mM EDTA en solución salina balanceada de Hank (318)) asegurándose de cubrir toda la superficie ocupada por las células, el frasco con el cultivo se devuelve a la incubadora original de entre 5 a 10 minutos, el cultivo puede ser revisado por intervalos de tiempo definidos hasta observar el desprendimiento efectivo de las células individuales de la pared del frasco con el cultivo para lo cual se recomienda la confirmación por medio de la visualización del cultivo con un microscopio invertido así como golpear levemente el frasco para facilitar el desprendimiento de las células (318).

Una vez separada la monocapa en sus células individuales, se procede a llenar el frasco de cultivo tisular original con un volumen pequeño de medio de cultivo fresco con suero bovino para inactivar la tripsina adicionada, en caso de usar un medio de cultivo libre de suero bovino, se debe emplear una solución adecuada de inhibidor de tripsina de frijol de soya (1 mL de una solución a 2,5 mg/mL es capaz de inhibir 1 mL de una disolución al 0,25% de tripsina (320)), se recomienda pipetear o succionar varias veces el medio de cultivo para facilitar el

desprendimiento completo de las células, esta suspensión puede ser sometida al conteo de su densidad celular para definir el tamaño de la alícuota necesario para el nuevo cultivo o bien puede ser diluida en razones adecuadas de entre 1/5 a 1/10; una vez que se ha preparado el volumen necesario de cultivo en el nuevo frasco de cultivo tisular estéril, este debe ser transferido a la incubadora a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO₂, el mismo debe ser revisado a las 24 horas con el propósito de confirmar la formación de la nueva monocapa de células (317,319).

El procedimiento de subcultivo a partir de cultivos de células en suspensión consiste en la inspección del cultivo para su control de calidad como se explicó anteriormente, el cultivo es visualizado bajo un microscopio de contraste para evaluar si este se encuentra en en la fase logarítmica tardía o temprana de meseta del proceso de su replicación de modo que las células viables se observan brillantes bajo el contraste (las células en fase de replicación exponencial se observan brillantes, redondas y refractiles (319)) , esta suspensión puede ser sometida al conteo de su densidad celular para definir el tamaño de la alícuota necesario para el nuevo cultivo o bien puede ser diluida en razones adecuadas de entre 1/5 a 1/10, una vez que se ha preparado el volumen necesario de cultivo en el nuevo frasco de cultivo tisular estéril, este es transferido a la incubadora a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO₂, el mismo debe ser revisado a las 24 horas con el propósito de confirmar que el pH del medio es de aproximante 7,4 (317).

El conteo de la densidad de células viables en una determinada suspensión obtenida de un cultivo celular específico puede llevarse a cabo mediante equipos electrónicos automatizados los cuales pueden brindar información directamente del número de células viables por mililitro de suspensión, o bien puede llevarse a cabo mediante el uso de un hemocitómetro con cámara de Neubauer, para ello tanto el cubre objetos del hemocitómetro como su superficie pulida deben ser limpiadas con etanol al 70 % v/v, posteriormente el cubreobjetos humedecido con agua (se deben observar los anillos de refracción de Newton sobre la superficie del

cubreobjetos) se coloca sobre la zona pulida del hemocitómetro, luego 0,5 mL de la suspensión con células individuales (posterior a desintegración de la monocapa por la adición de la solución de tripsina para la cual se confirmó una buena dispersión de las células mediante microscopía) es combinada con 0,5 mL de una solución de azul de tripano al 0,4%, la mezcla se deja incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, con la ayuda de una micropipeta se procede a llenar ambas cámaras del hemocitómetro por medio de efecto capilar (generalmente se requiere solo entre 5-10 μ L para llenar cada cámara (319)) , luego se procede a la visualización de las células del interior de cada cámara del hemocitómetro, en cada una ellas se contabiliza y registra el número de células viables y dañadas (teñidas de azul) presentes en los cuatro cuadrantes principales de cada esquina, la cantidad total de células (suma de cada uno de los tipos de célula ya sean viables o dañadas) presentes en los cuatro cuadrantes se promedia entre las dos cámaras y el resultado es multiplicado por 2500 para obtener el número total de células por mililitro de suspensión de prueba, este resultado debe ser multiplicado por el correspondiente factor de dilución para estimar la densidad celular en la suspensión original, con el conteo de cada uno de los tipos de células es posible definir el porcentaje de células viables presentes en la suspensión del cultivo (317). Otra estrategia para el conteo de las células es establecer el número presente de células por cada cuadrante grande que se encuentra en cada una de las cuatro esquinas de la cámara, calcular el número promedio de células por cuadrante y multiplicar el resultado por 10000 para obtener la cantidad de células totales por mililitro (318).

Diversos son los medios de cultivos empleados para el cultivo celular, de Oliveira et al (321) reportan el uso de una mezcla 1:1 del medio nutritivo de Ham F10 con medio esencial de Eagle modificado (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) o de solo este último medio (en ambos casos con 10% de suero fetal bovino, 0,01 mg/mL de estreptomicina, 0,005 mg/mL de penicilina y 2,38 mg/mL de HEPES) para el cultivo de las líneas B16F10 (células murinas de melanoma), HT29 (adenocarcinoma de colon), MO59J, U343 y U251 (glioblastoma humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano),

HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) y V79 (fibroblastos pulmonares de hámster chino). De Mesquita et al (322) reporta el uso del medio RPMI-1640 al 10% de suero fetal bovino con 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y 2mM glutamina para el cultivo de las células HL-60 (leucemia), HCT-8 (carcinoma humano de colón), SF-295 (cáncer cerebral) y MDA-MB-435 (melanoma). Por otra parte líneas celulares HeLa se han cultivado en medio RPMI-1640 al 10 % de suero fetal bovino suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (323), mientras líneas que para HepG2 se emplea RPMI-1640 al 10 % de suero fetal bovino suplementado con 100 U/mL de penicilina y 50 μ g/mL de estreptomicina (48).

La preparación de un litro de medio de cultivo completo (con 10% de suero fetal bovino), puede llevarse a cabo mediante la adición de 100 mL de suero fetal bovino a 900 ml del medio líquido sin suplementos (324), posteriormente el medio es filtrado asépticamente al vacío con un filtro de 0,22 μ m de tamaño de poro (325), una vez listo el medio de cultivo completo se procede a la adición de 0,5-1 mL de una disolución adecuada para cultivo celular de penicilina y estreptomicina de modo que el medio de cultivo tenga una concentración de 50-100 U/mL de penicilina y 50-100 μ g/mL de estreptomicina que permita prevenir la contaminación bacteriana del cultivo celular, si se desea puede emplearse también anfotericina B a una concentración final en el medio de cultivo completo de 2,5 μ g/mL para prevenir la contaminación con microorganismos fúngicos (318). Muchos medios de cultivo sin suplementos se encuentran disponibles comercialmente en su forma líquida ya preparada, sin embargo también se pueden encontrar como polvo para su disolución en agua estéril libre de iones y pirógenos adecuada para cultivo celular siguiendo las instrucciones del fabricante, en tal caso una vez disuelto el polvo bajo condiciones asépticas debe procederse a su ajuste de pH y filtración (con soluciones de NaOH, KOH o HCl) (319,326).

En lo correspondiente propiamente al ensayo de MTT para la determinación de células viables, cada uno de los 96 pocillos de la microplaca deberá contar con un número adecuado de células para que la prueba sea viable (317), de Mesquita et al. (322) reporta el empleo de 10^5 y $0,3 \times 10^6$

células por pocillo para las líneas celulares cultivadas como monocapa y suspensión respectivamente, las mismas se adicionaron en alícuotas de 100 μ L a los pocillos. Es recomendable establecer el número de células óptimo mediante un ensayo preliminar en el cual se somete a prueba diluciones de la suspensión de células obtenido del cultivo en monocapa de entre 10^3 a 10^6 células por mililitro (327), los pocillos son llenados con 200 μ L de cada suspensión de modo que se coloque al menos entre 5×10^2 a 10^4 células por pocillo, además debe añadirse el mismo volumen de medio de cultivo, posteriormente las células son incubadas a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO₂ cambiando el medio de cultivo diariamente por el tiempo que durará el ensayo, posteriormente el medio de cultivo es sustituido por 200 μ L de medio fresco y se adicionan 50 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS, las placas de microtitulación son envueltas en papel aluminio y colocadas nuevamente en la incubadora por 4 horas, posterior a ello se retira el medio de cultivo y se añaden 200 μ L de DMSO y 25 μ L de buffer de glicina (0,1 M glicina, 0,1 M NaCl ajustado a pH 10,5 con NaOH 1 M), a continuación se debe proceder a la medición de la absorbancia de cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación con un lector de ELISA (D58). El ensayo debe hacerse por triplicado (con tres placas de microtitulación), la suspensión que permite obtener la cantidad ideal de células por pocillo corresponde aquella que genera una absorbancia entre 0,75 y 1,25 UA (327).

En el caso de los cultivos mantenidos como suspensión, el procedimiento de optimización del número de células por pocillo es esencialmente el mismo que el descrito para los cultivos monocapa, sin embargo la placa de microtitulación debe poseer pocillos de fondo redondeado a diferencia de los usados con las células adherentes de cultivos monocapa para los cuales el fondo es plano, cada vez que se va a cambiar el medio de cultivo debe haber centrifugación de previo a 200 g por 5 minutos, además la suspensión de células se añade en volúmenes de 100 μ L (317). Con respecto al patrón de colocación de las células en los pocillos de placa de microtitulación se propone llenar las columnas de la 3 a la 10 con las suspensiones de las células (dos columnas consecutivas por suspensión de distinta densidad celular, entre 10^3 y 10^6 células

por mililitro), los pocillos de las columnas 1, 2, 11 y 12 serán llenados con medio de cultivo (blanco), todas las columnas serán sujetas al cambio diario del medio de cultivo, las columnas de la 1 a la 11 serán sujetas al tratamiento con MTT, DMSO y buffer de glicina, la columna 12 no será sujeta a ningún tratamiento funcionando como control negativo para los cambios de absorbancia que deben ocurrir con el contenido del resto de pocillos.

Propiamente en lo que respecta al ensayo MTT para la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos alcohólicos de las especies de *Impatiens* sujetos a prueba, se procederá a llenar los pozos de las columnas de la 2 a la 11 con 200 μ L de la suspensión de densidad óptima de células y otros 200 μ L de medio de cultivo fresco tal y como se describió anteriormente, los pocillos de las columnas 1 y 12 serán llenados únicamente con 200 μ L de medio de cultivo, la placa de microtitulación de 96 pocillos posteriormente será incubada (por 24 horas siguiendo los procedimientos descritos por de Oliveira et al (321) y de Mesquita et al. (322), posteriormente se cambiará el medio de los pocillos de las columnas 3 y a la 10 (remoción del medio antiguo por 200 μ L de medio fresco) a los cuales se transferirán 200 μ L de soluciones del extracto a distintas concentraciones o del control positivo en medio de cultivo fresco con un nivel máximo de DMSO de 1% v/v, las células de los pocillos de la columna 11 serán tratados con 200 μ L de DMSO al 1% v/v como control negativo, las placas de microtitulación serán incubadas nuevamente (el tiempo de incubación será de 72 horas siguiendo el procedimiento descrito por de Mesquita et al. (322)), luego del periodo de tratamiento, el medio de cultivo debe volver a ser cambiado por 200 μ L frescos para todos los pocillos, a continuación los pocillos de las columnas de las columnas 1 a la 11 son tratados con 50 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS, la placa con los pocillos es envuelta en papel aluminio y colocada en la incubadora durante 4 horas, tiempo posterior al cual el medio de los pocillos de las columnas de la 1 a la 11 es retirado para proceder a la adición de 200 μ L de DMSO, posteriormente los mismos pocillos son tratados con 25 μ L de buffer de glicina y se procede a la lectura de la absorbancia en el lector de ELISA a 570 nm, el ensayo debe hacerse

por triplicado tanto para los diferentes extractos como para el control positivo para cada línea celular empleada (317).

Es recomendable el uso de al menos 8 disoluciones para el agente citotóxico de prueba, las cuales se colocan de mayor a menor concentración de la columna 3 a la 10 (317), preliminarmente se plantea el uso de los extractos a concentraciones de 1, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo fresco a una concentración máxima de DMSO al 1% v/v, el cual es seguro para la mayoría de líneas celulares (317), dicho intervalo de concentraciones se elige tomando en cuenta aspectos como el uso de un valor de IC_{50} menor a 30 $\mu\text{g/mL}$ en ensayos *in vitro* con al menos 72 horas de exposición de las células cancerosas un extracto crudo como criterio para designación del mismo como prometedor para procedimientos de aislamiento y purificación de principios activos citotóxicos de acuerdo a *American National Cancer Institute* (322,328), además se considera el hecho de que fracciones obtenidas a partir del extracto hidroalcohólico al 55 % v/v de hojas de IB así como el extracto clorofórmico de las mismas han demostrado tener valores de IC_{50} inferiores a los 50 $\mu\text{g/mL}$ (48). Dependiendo de los resultados se considerara la necesidad de repetir el ensayo a concentraciones del extracto inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$ con la finalidad de interpolar el valor de IC_{50} .

El control positivo corresponde a una sustancia de reconocida actividad citotóxica, algunos de ellos incluyen a la curcumina (48), doxorubicina, la camptotecina, el etopósido (321) y al 5-fluorouracilo (329). La curcumina ha sido empleada en el ensayo de MTT para determinar su actividad citotóxica sobre células de hepatoma SMMC-7721 a concentraciones entre los 10-90 μM en DMSO a menos del 1% v/v (330), la doxorubicina se ha empleado como control positivo en la determinación de actividad citotóxica de extractos de diversas plantas sobre células HL-60 (leucemia), HCT-8 (carcinoma humano de colón), SF-295 (cáncer cerebral) y MDA-MB-435 (melanoma) a concentraciones entre los 0,01-0,58 $\mu\text{g/mL}$ en DMSO al 1% v/v (322), mientras el 5-fluorouracilo se ha utilizado como control positivo en la determinación de la actividad citotóxica de extractos de plantas contra células CL-6 (colangiocarcinoma), Hep-2 (carcinoma humano laríngeo), HepG2 (hepatocarcinoma humano) y HRE (células epiteliales

humanas normales) en concentraciones entre los 78,13-10000 μ M usando una disolución madre en etanol al 50% v/v como disolvente (329). Las disoluciones madre de los extractos y los controles positivos pueden ser esterilizadas mediante el uso de filtros de membrana de 0,22 μ m (330), lo mismo aplica para la solución de MTT, la cual además puede presentar pequeñas partículas de formazan (317).

Con respecto al tratamiento de los resultados, el blanco para la lectura de la absorbancia lo constituirá la columna 1 la cual no contienen células y fue tratada de la misma forma que los pocillos de las columnas de la 2 a la 11, los pocillos de la columna 2 corresponden a controles con células que no recibieron ningún tipo tratamiento con soluciones de los extractos o del control positivo, conociendo esto puede calcularse el porcentaje de inhibición celular (% PIC) con la siguiente fórmula (323):

$$\% \text{ PIC} = 100 - [(A_t - A_b) / (A_c - A_b)] \cdot 100$$

Donde A_t es la absorbancia promedios del contenido de los pocillos tratados con los extractos o el control positivo, A_b es la absorbancia del blanco y A_c es la absorbancia promedio de las células no tratadas con extracto o control positivo (323). Posteriormente se procederá a la construcción de un gráfico de % PIC en función de la concentración de los extractos o control positivo, indicando para cada punto de concentración el intervalo de desviación estándar obtenido para el valor promedio de % PIC obtenido con las tres réplicas del ensayo, el valor de IC₅₀ (concentración a la cual la absorbancia de las células tratadas es la mitad de la de las células no tratadas) para cada sustancia de prueba será determinado mediante interpolación de las curvas de mejor ajuste obtenidas por regresión no lineal, se reportará el valor promedio de IC₅₀ para cada sustancia de prueba con la respectiva desviación estándar obtenido con cada una de las tres curvas de % PIC en función de la concentración obtenida en cada réplica del ensayo. La construcción de los gráficos y el análisis estadístico correspondiente se llevará a cabo con el software GraphPad Prism 5.0, alternativamente se puede emplear el software Excel.

Por último es importante indicar que los procedimientos de cultivo celular, así como del ensayo de MTT deben darse en condiciones estériles para lo cual se deben realizar los procedimientos dentro de una cámara de flujo laminar, es recomendable rociar con etanol o isopropanol al 70 % v/v los frascos con reactivos o medios de cultivo, las fundas con pipetas serológicas, los guantes usados por el experimentador y el resto de artículos antes de colocarlos dentro de la cámara o campana de flujo laminar (319), además las operaciones de subcultivo y del ensayo de MTT debe llevarse a cabo con medio de cultivo fresco precalentado a 37 °C (319).

BIBLIOGRAFIA

7. Referencias.

1. Hughes D, Karlén A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci.* 2014; 119: 162–169.
2. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 713687.
3. Grundmanna H, Klugmanc KP, Walshd T, Ramon-Pardoe P, Sigauquef B, Khanh W, Laxminarayani R, Heddinik A, Stelling J. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resist Updat.* 2011; 14: 79–87.
4. Oldfield E, Feng X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences.* Dec 2014; 35(12): 664–674.
5. Bassetti M, Righi E. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. *Langenbecks Arch Surg.* 2015; 400:153–165.
6. Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J Antibiot (Tokyo).* 2010; 63: 423–430.
7. O'Brien S. Meeting the societal need for new antibiotics: the challenges for the pharmaceutical industry. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 79(2): 168–172.
8. OConnell KMG, Hodgkinson JT, Sore HF, Welch M, Salmond GPC, Spring DR. Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials. *Angew Chem Int Ed.* 2013; 52: 10706 – 10733.

9. Kesselheim AS, Outterson K. Fighting Antibiotic Resistance: Marrying New Financial Incentives To Meeting Public Health Goals. *Health Aff (Millwood)*. 2010; 29(9): 1689–1696.
10. World Health Organization. World Health Day 2011 foster innovations and research and development for new tools [Monografía en Internet]. World Health Organization; 2011.[Citado 28 de enero 2016]. Disponible en: www.who.int/world.../whd2011_fs6_newtool.pdf
11. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: World Health Organization; 2014.
12. Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(Suppl. 6): 42–48.
13. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati MSG, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med*. Mar 2014; 370(13): 1198-1208.
14. Gravanis I, Vleminckx C, Jonsson B, Pignatti F. The changing world of cancer drug development: the regulatory bodies' perspective. *Chin Clin Oncol*. 2014; 3(2): 22.
15. Pratheeshkumar P, Sreekala C, Zhang Z, Budhraj A, Ding S, Son YO, Wang X, Hitron A, Hyun-Jung K, Wang L, Lee JC, Shi X. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anticancer Agents Med Chem*. Dic 2012; 12(10): 1159-1184.
16. World Health Organization. Fact file: 10 facts on cancer [monografía en internet]. World Health Organization; 2013. [Consultado 29 de enero 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/facts/en/>
17. Ali R, Mirza Z, Ashraf GM, Kamal MA, Ansari SA, Damanhour GA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Sheikh IA. New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy. *Anticancer Res*. Jul 2012; 32(7):2999-3005.
18. Wright GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol*. 2014; 60: 147–154.
19. Morrison KC, Hergenrother PJ. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. *Nat Prod Rep*. 2014; 31(1): 6–14.
20. Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C. Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12: 49-75.

21. Karikas GA. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J BUON*. 2010; 15: 627-638.
22. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*. 2007; 9: 767-776.
23. Golestani MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. *Life Sci*. 2015; 135: 22–26.
24. Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Bartlett J, Smith PT, de la Cruz M, Monteiro MC, Melguizo A, Jiménez E, Vicente F. *Asian Pac J Trop Med*. 2013; 6(9): 673-681.
25. Venkatesan D, Karrunakaran CM. Antimicrobial Activity of Selected Indian Medicinal Plantas. *Journal of Phytology*. 2010; 2(2): 44–48.
26. Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski PJ. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complement Altern Med*. 2009; 9: 7.
27. Nielsen TR, Kuete V, Jäger AK, Meyer JJ, Lall N. Antimicrobial activity of selected South African medicinal plants. *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12: 74.
28. Luciano-Montalvo C, Boulogne I, Gavillán-Suárez J. A screening for antimicrobial activities of Caribbean herbal remedies. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 126.
29. Djeussi DE, Noumedem JA, Seukep JA, Fankam AG, Voukeng IK, Tankeo SB, Nkuete AH, Kuete V. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 164.
30. Zuo GY, Zhang XJ, Yang CX, Han J, Wang GC, Bian ZQ. Evaluation of Traditional Chinese Medicinal Plants for Anti-MRSA Activity with Reference to the Treatment Record of Infectious Diseases. *Molecules*. 2012; 17: 2955-2967.
31. Carneiro AL, Teixeira MF, Oliveira VM, Fernandes OC, Cauper GS, Pohlit AM. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Feb 2008; 103(1): 31-38.
32. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100: 72-79.

33. Shu L, Cheung KL, Khor TO, Chen C, Kong AN. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 ;29: 483-502.
34. Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. Plant Phytochemicals as Epigenetic Modulators: Role in Cancer Chemoprevention. *AAPS J. Ene* 2014; 16(1): 151-163.
35. Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *J Oncol.* 2010; 2010: 214186.
36. Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, Wang YT. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 485042.
37. Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 2010; 15: 7313-7352.
38. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1993; 90(17): 7915-7922.
39. Fukumoto H, Yamaki M, Isoi K, Ishiuro K. Antianaphylactic Effects of the Principal Compounds from the White Petals of *Impatiens balsamina* L. *Phytother Res.* 1996; 10: 202-206.
40. Ishiguro K, Ohira Y, Oku H. Antipruritic Dinaphthofuran-7,12-dione Derivatives from the Pericarp of *Impatiens balsamina*. *J Nat Prod.* 1998; 61: 1126-1129.
41. Ishiguro K, Oku H. Antipruritic Effect of Flavonol and 1,4-Naphthoquinone Derivatives from *Impatiens balsamina* L. *Phytother Res.* 1997; 11: 343-347.
42. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 120 Suppl 1: 70-75.
43. Oku H, Ishiguro K. Antipruritic and Antidermatitic Effect of Extract and Compounds of *Impatiens balsamina* L. in Atopic Dermatitis Model NC Mice. *Phytother Res.* 2001; 15: 506–510.
44. Oku H, Ishiguro K. Screening Method for PAF Antagonist Substances: on the Phenolic Compounds from *Impatiens balsamina* L. *Phytother Res.* 1999; 13, 521–525.
45. Ishiguro K, Fukumoto H. A Practical and Speedy Screening Method for Murine Anaphylaxis: On the Antianaphylactic Effect of *Impatiens balsamina* L. *Phytother Res.* 1997; 11, 48–50.
46. Imam MZ, Nahar N, Akter S, Rana MS. Antinociceptive activity of methanol extract of flowers of *Impatiens balsamina*. *J Ethnopharmacol.* 2012; 142: 804–810.

47. Oku H, Ishiguro K. Cyclooxygenase-2 Inhibitory 1,4-Naphthoquinones from *Impatiens balsamina* L. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(5): 658-660.
48. Ding ZS, Jiang FS, Chen NP, Lv GY, Zhu CG. Isolation and Identification of an Anti-tumor Component from Leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules.* 2008; 13: 220-229.
49. Wang YC, Lin YH. Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone, an anti-*Helicobacter pylori* compound from *Impatiens balsamina* L. *Fitoterapia.* 2012; 83: 1336–1344.
50. Li Q, Zhang X, Cao J, Guo Z, Lou Y, Ding M, Zhao Y. Depside derivatives with anti-hepatic fibrosis and anti-diabetic activities from *Impatiens balsamina* L. flowers. *Fitoterapia.* 2015; 105: 234–239.
51. Kang SN, Goo YM, Yang MR, Ibrahim RI, Cho JH, Kim IS, Lee OH. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extract from the Stem and Leaf of *Impatiens balsamina* L. (Balsaminaceae) at Different Harvest Times. *Molecules.* 2013; 18: 6356-6365.
52. Su BL, Zeng R, Chen JY, Chen CY, Guo JH, Huang CG. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Various Solvent Extracts from *Impatiens balsamina* L. Stems. *J Food Sci.* 2012; 77(6): C614-C619.
53. Yang X, Summerhurst DK, Koval SF, Ficker C, Smith ML, Bernards MA. Isolation of an Antimicrobial Compound from *Impatiens balsamina* L. using Bioassay-Guided Fractionation. *Phytother Res.* 2001; 15, 676–68.
54. Zhou XF, Zhao XY, Tang L, Ruan HL, Zhang YH, Pi HF, Xiao WL, Sun HD, Wu JZ. Three new triterpenoid saponins from the rhizomes of *Impatiens pritzellii* var. *hupehensis*. *J Asian Nat Prod Res.* Jun 2007, 9(4): 379–385.
55. Li W, Bi X, Wang K, Li D, Satou T, Koike K. Triterpenoid saponins from *Impatiens siculifer*. *Phytochemistry.* 2009; 70: 816–821.
56. Sun X, Shim DW, Han JW, Shin WY, Sim EJ, Kim MK, Heo KH, Kim YK, Koppula S, Kim TJ, Kang TB, Lee KH. Anti-inflammatory effect of *Impatiens textori* Miq. extract via inhibition of NLRP3 inflammasome activation *in vitro* and *in vivo* experimental models. *J Ethnopharmacol.* 2015; 170: 81–87.
57. Nisar M, Qayum M, Shah MR, Kaleem WA, Ali I, Zia-ul-Haq M. Antimicrobial Screening of *Impatiens Bicolor* Royle. *Pak J Bot.* 2010; 42(1): 523-526.
58. Nisar M, Qayum M, Shah MR, Siddiqui HL, Kaleem WA, Zia-ul-Haq M. Biological Screening of *Impatiens bicolor* Royle. *Pak J Bot.* 2010; 42(3): 1903-1907.

59. Anwer N, Waqar MA, Iqbal M, Mushtaq M, Sobia A. Phytochemical analysis, free radical scavenging capacity and antimicrobial properties of *Impatiens bicolor* plant. IFRJ. 2013; 20(1): 99-103.
60. Yang J, Kim J, Kim M. Antioxidant, antiproliferative, and α -glucosidase inhibitory activities of extracts from *Impatiens textori* Miq. J Med Plant Res. Ene 2012; 6(3): 391-397.
61. Motz VA, Bowers CP, Kneubehl AR, Lendrum EC, Young LM, Kinder DH. Efficacy of the saponin component of *Impatiens capensis* Meerb. in preventing urushiol-induced contact dermatitis. J Ethnopharmacol. 2015; 162: 163–167.
62. Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.
63. Uchneat MS. *Impatiens*. In: Anderson NO, editor. Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21 st Century. Dordrecht, Holanda: Springer; 2007. p. 277–299.
64. Neeman L. New Guinea *Impatiens* plant named `Volcano Fuchsia Pink`. United States Patent Plant 10,227. 1998 Feb 3.
65. Guillen M. Trailing Interspecific *Impatiens* Plant Named `Balfafusia`. United States Patent US PP12,588 P2. 2002 Apr 30.
66. Kientzler L. New Guinea *Impatiens* Plant Named `Visinflavimp`. United States Patent US PP20,959 P2. 2010 Apr 27.
67. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Adv. 2015; 33:1582-1614.
68. Lim TK. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Volume 7 Flowers. Springer Science Business Media Dordrecht; 2014.
69. DiGiandomenico A, Sellman BR. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation?. Curr Opin Microbiol. 2015; 27: 78–85.
70. Piddock LJV. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward?. Lancet Infect Dis. 2012; 12: 249–253.
71. Pasberg-Gauhl C. A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. Drug Discov Today Technol. Mar 2014; 11:109-116.
72. Penesyanyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. Molecules. 2015; 20: 5286-5298.

73. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(10): 791-808.
74. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 528521.
75. Davies J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol.* 2011; 15: 5–10.
76. Harbarth S, Theuretzbacher U, Hackett J, DRIVE-AB consortium. Antibiotic research and development: business as usual?. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1604–1607.
77. White AR, BSAC Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery and Development. Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1948–1953.
78. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same?. *Br J Pharmacol.* 2011, 163: 184–194.
79. Ivarsson ME, Leroux JC, Castagner B. Investigational new treatments for *Clostridium difficile* infection. *Drug Discov Today.* May 2015; 20(5): 602-608.
80. Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester J, Miller AA. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* Ago 2015; 14: 529-542.
81. Lienhardt C, Raviglione M, Spigelman M, Hafner R, Jaramillo E, Hoelscher M, Zumla A, Gheuens J. New Drugs for the Treatment of Tuberculosis: Needs, Challenges, Promise, and Prospects for the Future. *J Infect Dis.* 2012; 205 (Suppl 2): S241-S249.
82. Zaidi SF, Yamada K, Kadowaki M, Usmanghani K, Sugiyama T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol.* 2009; 121: 286–291.
83. Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med. Ene* 2012; 125 (1 Suppl): S3-S13.
84. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol. Abr* 2011; 49(Suppl. 1): S90–S95.
85. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 2010; 98:15–25.
86. Loyd DH. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. *Vet Dermatol.* 2012; 23: 299–304.

87. Demain AL. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014; 41:185–201.
88. Mothana RA, Lindequist U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96: 177-181.
89. Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJ. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*. 2007; 78: 302–310.
90. Priya K, Yin WF, Chan KG. Anti-Quorum Sensing Activity of the Traditional Chinese Herb, *Phyllanthus amarus*. *Sensors (Basel)*. 2013; 13: 14558-14569.
91. Verma S, Sharma H, Garg M. *Phyllanthus Amarus*: A Review. *J Pharmacogn Phytochem*. 2014, 3(2): 18-22.
92. Yong AL, Ooh KF, Ong HC, Chai TT, Wong FC. Investigation of antibacterial mechanism and identification of bacterial protein targets mediated by antibacterial medicinal plant extracts. *Food Chem*. 2015; 186: 32–36.
93. Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. 2011; 82: 34–37.
94. Abreu AC, McBainb AJ, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep*. 2012; 29: 1007-1021.
95. Ohene-Agyei T, Mowla R, Rahman T, Venter H. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *MicrobiologyOpen*. 2014; 3(6): 885–896.
96. Alvin A, Miller KI, Neilan BA. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol Res (Pavia)*. 2014; 169: 483–495.
97. Phosrithong N, Ungwitayatorn J. Molecular docking study on anticancer activity of plant-derived natural products. *Med Chem Res*. 2010; 19:817–835.
98. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*. 1995, 22(4): 375-383.
99. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7): 933-956.
100. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 2001; 8(5): 401–409.
101. De Smet PA. Health risks of herbal remedies: an update. *Clin Pharmacol Ther*. Jul 2004; 76(1):1-17.

102. Huang KC. Antirheumatic herbs. In: Huang KC. The Pharmacology of Chinese Herbs. 2a ed. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC; 1999.
103. Li TSC. Chinese and Related North American Herbs Phytopharmacology and Therapeutic Values. 2a ed. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis Group, LLC; 2009. p. 80.
104. Cai Y. Zhong Yao Yao Ming Ci Dian. Beijing: Chinese Medicine Publisher; 1996. Citado por: Yang X, Summerhurst DK, Koval SF, Ficker C, Smith ML, Bernards MA. Isolation of an Antimicrobial Compound from *Impatiens balsamina* L. using Bioassay-Guided Fractionation. *Phytother Res.* 2001; 15: 676–680.
105. Jiang Su New Medical College. Dictionary of Chinese Crude Drugs. Shanghai: Shanghai Scientific Technological Publishers; 1997. Citado por: Oku H, Ishiguro K. Cyclooxygenase-2 Inhibitory 1,4-Naphthoquinones from *Impatiens balsamina* L. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(5): 658-660.
106. Wang YC, Wu DC, Liao JJ, Wu CH, Li WY, Weng BC. In vitro Activity of *Impatiens balsamina* L. Against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Am J Chin Med.* 2009; 37(4): 713-722.
107. González J. Plantas Útiles de La Selva [Monografía en Internet]. Costa Rica: Organización para Estudios Tropicales. Flora Digital de La Selva; 2013 [Consultado: 20 enero 2015]. Disponible en: http://sura.ots.ac.cr/florula4/docs/plantas_utiles_LS_etnobotanica_2013.pdf
108. Ishiguro K, Ohira Y, Oku H. Preventive Effects of *Impatiens balsamina* on the Hen Egg-White Lysozyme (HEL)-Induced Decrease in Blood Flow. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(4): 505—508.
109. Saeed SMG, Sayeed SA, Ashraf S, Naz S, Siddiqi R, Ali R, Mesaik MA. A new method for the isolation and purification of lawsone from *Lawsonia inermis* and its ROS inhibitory activity. *Pak J Bot.* 2013; 45(4): 1431-1436.
110. Padwal J, Lewis W, Moody CJ. Synthesis of Balsaminone A, a Naturally Occurring Pentacyclic Dinaphthofuran Quinone. *J Org Chem.* 2011; 76: 8082–8087.
111. Shin JA, Kwon KH, Cho SD. AMPK- activated protein kinase activation by *Impatiens balsamina* L. is related to apoptosis in HSC- 2 human oral cancer cells. *Pharmacogn Mag.* Ene-Mar 2015;11(41):136-142.
112. Shin JA, Ryu MH, Kwon KH, Choi B, Cho S. Down-regulation of Akt by methanol extracts of *Impatiens balsamina* L. promotes apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *J Oral Pathol Med.* 2015; 44: 420–428.

113. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. Mar 2004; 1697(1-2): 3-16.
114. Liew K, Yong PV, Lim YM, Navaratnam V, Ho AS. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicol In Vitro*. 2014; 28; 335–339.
115. Mori N, Toume K, Arai MA, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Impatiens balsamina* in a screening program for activity to inhibit Wnt signaling. *J Nat Med*. 2011; 65: 234–236.
116. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. Apr 2008; 4(2): 68-75.
117. Pei H, Lei J, Qian SH. A new cytotoxic dinaphthofuran-7,12-dione derivatives from the seeds of *Impatiens balsamina*. *Zhong Yao Cai*. Mar 2012; 35(3): 407-410.
118. Ishiguro K, Oku H, Kato T. Testosterone 5 α -Reductase Inhibitor Bisnaphthoquinone Derivative from *Impatiens balsamina*. *Phytother Res*. 2000; 14: 54–56.
119. Chen W, Zouboulis CC, Orfanos CE. The 5 α -Reductase System and Its Inhibitors Recent Development and Its Perspective in Treating Androgen-Dependent Skin Disorders. *Dermatology*. 1996;193:177–184.
120. Yasuda N, Fujino K, Shiraji T, Nambu F, Kondo K. Effects of steroid 5 α -reductase inhibitor ONO-9302 and anti-androgen allylestrenol on the prostatic growth, and plasma and prostatic hormone levels in rats. *Jpn J Pharmacol*. Jul 1997; 74(3): 243-52.
121. Little JE, Sproston TJ, Foote MW. Isolation and antifungal action of naturally occurring 2-methoxy-1,4-naphthoquinone. *J Biol Chem*. 1948; 174: 335-342.
122. Panichayupakaranant P, Noguchi H, De-Eknamkul W, Sankaw U. Naphthoquinones and Coumarins From *Impatiensbalsamina* Root Cultures. *Phytochemistry*, 1995; 40(4): 1141-1143.
123. Moon PD, Lee BH, Jeong HJ, An HJ, Park SJ, Kim HR, Ko SG, Um JY, Hong SH, Kim HM. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur J Pharmacol*. 2007; 555: 218–225.
124. De Souza SM, Delle Monache F, Smania AJr. Antibacterial Activity of Coumarins. *Z Naturforsch*. 2005; 60c: 693-700.

125. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Biomed Res Int.* 2013;2013:963248.
126. El Kharrassi Y, Samadi M, Lopez T, Nury T, El Kebbaj R, Andreoletti P, El Hajj HI, Vamecq J, Moustaid K, Latruffe N, El Kebbaj MS, Masson D, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M. Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 446: 798–804.
127. Pakunphueak A, Panichayupakaranant P. Comparison of antimicrobial activities of naphthoquinones from *Impatiens balsamina*. *Nat Prod Res.* 2012; 26(12): 1119-1124.
128. Sritairat N, Nukul N, Inthasame P, Sansuk A, Prasirt J, Leewatthanakorn T, Piamsawad U, Dejrudee A, Panichayupakaranant P, Pangsomboon K, Chanowanna N, Hintao J, Teanpaisan R, Chaethong W, Yongstar P, Pruphetkaew N, Chongsuvivatwong V, Nittayananta W. Antifungal activity of lawsone methyl ether in comparison with chlorhexidine. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40: 90–96.
129. Wang YC, Li WY, Wu DC, Wang JJ, Wu CH, Liao JJ, Lin CK. In Vitro Activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene-3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 704721.
130. Tailor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BP, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem.* Sep 1997; 26; 272(39): 24480-24487.
131. Fan X, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of the recombinant antimicrobial peptide Ib-AMP4 from *Impatiens balsamina* and its synergy with other antimicrobial agents against drug resistant bacteria. *Pharmazie.* Jul 2013; 68(7): 628-630
132. Fan X, Schäfer H, Reichling J, Wink M. Bactericidal properties of the antimicrobial peptide Ib-AMP4 from *Impatiens balsamina* produced as a recombinant fusion-protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol J.* 2013; 8: 1213–1220.
133. Wu WH, Di R, Matthews KR. Activity of the plant-derived peptide Ib-AMP1 and the control of enteric foodborne pathogens. *Food Control.* 2013; 33: 142-147.

134. Wang P, Bang JK, Kim HJ, Kim JK, Kim Y, Shin SY. Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. *Peptides*. 2009; 30: 2144–2149.
135. Thevissen K, François IE, Sijtsma L, van Amerongen A, Schaaper WM, Meloen R, Posthuma-Trumpie T, Broekaert WF, Cammue BP. Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*. 2005; 26: 1113–1119.
136. De Lucca AJ, Jacks TJ, Broekaert WJ. Fungicidal and binding properties of three plant peptides. *Mycopathologia*. 1999; 144: 87–91.
137. Lee DG, Shin SY, Kim D, Seo MY, Kang JY, Lee Y, Kim KL, Hahn K. Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnol Lett*. 1999; 21: 1047–1050.
138. Lim YH, Kim IH, Seo JJ. *In vitro* activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol*. Oct 2007; 45:473-477.
139. Wan DR, Feng HL. *J Chin Med Mater*. 1989; 12, 18. Citado por: Zhou XF, Zhao XY, Tang L, Ruan HL, Zhang YH, Pi HF, Xiao WL, Sun HD, Wu JZ. Three new triterpenoid saponins from the rhizomes of *Impatiens pritzellii* var. *hupehensis*. *J Asian Nat Prod Res*. Jun 2007, 9(4): 379–385.
140. Zhou X, Zhao X, Tang L, Zhang Y, Ruan H, Pi H, Qiu J, Wu J. Immunomodulatory activity of the rhizomes of *Impatiens pritzellii* var. *hupehensis* on collagen-induced arthritis mice. *J Ethnopharmacol*. 2007; 109: 505–509.
141. Zhou XF, Tang L, Zhang P, Zhaod XY, Pi HF, Zhang YH, Ruan HL, Liu Y, Wu JZ. The Interleukin-18 Inhibitory Activities of Echinocystic Acid and its Saponins from *Impatiens pritzellii* var. *hupehensis*. *Z Naturforsch*. 2009; 64c, 369 – 372.
142. Zhou X, Tang L, Liu Y. An isomeric mixture of novel cerebrosides isolated from *Impatiens pritzellii* reduces lipopolysaccharide-induced release of IL-18 from human peripheral blood mononuclear cells. *Lipids*. 2009; 44: 759–763.
143. State Administration of Traditional Chinese Medicine. *Chinese Materia Medica (Zhonghua Bencao)*, vol. 5. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 1999. p. 142. Citado por: Li W, Bi X, Wang K, Li D, Satou T, Koike K. Triterpenoid saponins from *Impatiens sicutifer*. *Phytochemistry*. 2009; 70: 816–821.

144. Ueda Y, Oku H, Iinuma M, Ishiguro K. Antianaphylactic and Antipruritic Effects of the Flowers of *Impatiens textori* MIQ. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(9): 1786—1790.
145. Ishiguro K, Ohira Y, Oku H. Preventive Effects of *Impatiens balsamina* on the Hen Egg-White Lysozyme (HEL)-Induced Decrease in Blood Flow. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25(4) 505—508.
146. Ueda Y, Oku H, Iinuma M, Ishiguro K. Effects on Blood Pressure Decrease in Response to PAF of *Impatiens textori* MIQ. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26(10) 1505—1507.
147. Chang Su New Medical College. Dictionary of Chinese Crude Drugs. Shanghai: Shanghai Scientific Technological Publishers; 1977. Citado por: Ueda Y, Oku H, Iinuma M, Ishiguro K. Antianaphylactic and Antipruritic Effects of the Flowers of *Impatiens textori* MIQ. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28(9): 1786—1790.
148. Gilani SA, Qureshi RA, Farooq U. Ethnobotanical Studies of Ayubia National Park District Abbotabad; Pakistan. *Online J Biol Sci.* 2001; 1(4): 284-286.
149. Nisar M, Qayum M, Cavar S, Shah MR, Zia-Ul-Haq M, Khan I, Ahmad KW, Qayum ZA. Chemical constituents and antioxidant activity of *n*-hexane extract of *Impatiens bicolor*. *Chemistry of Natural Compounds.* Mar 2012; 48(1): 143-146.
150. Hasan A, Tahir MN. Flavonoids from the Leaves of *Impatiens bicolor*. *Turk J Chem.* 2005; 29: 65-70.
151. Abrams M, Bowers CP, Mull Young L, Kinder DH. The effectiveness of jewelweed, *Impatiens capensis*, the related cultivar *I. balsamina* and the component, lawsone in preventing post poison ivy exposure contact dermatitis. *J Ethnopharmacol.* 2012; 143: 314—318.
152. Grabowska K, Podolak I, Galanty A, Załuski D, Makowska-Wąs J, Sobolewska D, Janeczko Z, Żmudzki P. *In vitro* anti-denaturation and anti-hyaluronidase activities of extracts and galactolipids from leaves of *Impatiens parviflora* DC. *Nat Prod Res.* Jul 2015; 16: 1-5.
153. Hromádková Z, Košťálová Z, Vrchotová N, Ebringerová A. Non-cellulosic polysaccharides from the leaves of small balsam (*Impatiens parviflora* DC.). *Carbohydr Res.* 2014; 389: 147—153.
154. Vrchotová N, Šerá B, Krejčová J. Allelopathic activity of extracts from *Impatiens species*. *Plant Soil Environ.* 2011; 57(2): 57—60.

155. Ruckli R, Hesse K, Glauser G, Rusterholz H, Baur B. Inhibitory Potential of Naphthoquinones Leached from Leaves and Exuded from Roots of the Invasive Plant *Impatiens glandulifera*. *J Chem Ecol*. 2014; 40:371–378.
156. Chand K, Akanksha, Rahuja N, Mishra DP, Srivastava AK, Maurya R. Major alkaloidal constituent from *Impatiens niamniamensis* seeds as antihyperglycemic agent. *Med Chem Res*. 2011; 20: 1505–1508.
157. Glennie CW, Bohm BA. The Isolation of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone From *Impatiens balsamina* L. (Balsaminaceae). *Can J Biochem*. 1965; 43(2): 293-295.
158. Pal M, Biswas S. A novel protein accumulated during maturation of the pods of the plant *Impatiens balsamina*. *Mol Cell Biochem*. 1994; 130: 111-120.
159. Shoji N, Umeyama A, Saitou N, Yoshikawa K, Kan Y, Arihara S. Hosenkosides A, B, C, D, and E, novel baccharane glycosides from the seeds of *Impatiens balsamina*. *Tetrahedron*. 1994; 50(17): 4973-4986.
160. Shoji N, Umeyama A, Saitou N, Yoshikawa K, Nagai M, Arihara S. Hosenkosides F, G, H, I, J, and K, novel baccharane glycosides from the seeds of *Impatiens balsamina*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. Jul 1994; 42(7):1422-1426.
161. Shoji N, Umeyama A, Yoshikawa K, Nagai M, Arihara S. Baccharane glycosides from the seeds of *Impatiens balsamina*. *Phytochemistry*. 1994; 37(5): 1437-1441.
162. Panichayupakaranant P, Noguchi H, De-Eknamkul W. A new biscoumarin from *Impatiens balsamina* root cultures. *Planta Med*. Dic 1998; 64(8): 774-775.
163. Chen XM, Qian SH, Feng F. Two new tetrahydronaphthalenes from the stem of *Impatiens balsamina* L. *Chinese Chemical Letters*. 2010; 21: 440–442.
164. Lei J, Qian SH, Jiang J. Two new flavone glycosides from the seeds of *Impatiens balsamina* L. *J Asian Nat Prod Res*. Dec 2010; 12(12): 1033–1037.
165. Tříska J, Vrchotová N, Sýkora J, Moos M. Separation and Identification of 1,2,4-Trihydroxynaphthalene-1-*O*-glucoside in *Impatiens glandulifera* Royle. *Molecules*. 2013; 18: 8429-8439.
166. Lobstein A, Brenne X, Feist E, Metz N, Weniger B, Anton R. Quantitative Determination of Naphthoquinones of *Impatiens* Species. *Phytochem Anal*. 2001; 12: 202–205.
167. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Simultaneous Determination of Three Naphthoquinones in the Leaves of *Impatiens Balsamina* L. by Reversed-phase High performance Liquid Chromatography. *Phytochem Anal*. 2010; 21: 444–450.

168. Li HJ, Yu JJ, Li P. Simultaneous qualification and quantification of baccharane glycosides in *Impatiens Semen* by HPLC–ESI-MSD and HPLC–ELSD. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 674–680.
169. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*, Vol. I. 2010 ed. Beijing: China Medical Scientific and Technological Press, 2010, p. 247. Citado por: Li HJ, Yu JJ, Li P. Simultaneous qualification and quantification of baccharane glycosides in *Impatiens Semen* by HPLC–ESI-MSD and HPLC–ELSD. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 674–680.
170. Vieira MN Winterhalter P, Jerz G. Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochem Anal.* 2016; 27:116-125.
171. Hua L, Peng Z, Chia LS, Goh NK, Tan SN. Separation of kaempferols in *Impatiens balsamina* flowers by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Chromatogr A.* 2001; 909: 297–303.
172. Luo C, Yang H, Tang C, Yao G, Kong L, He H, Zhou Y. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2015; 28: 744–750.
173. Mercader-Ros MT, Lucas-Abellán C, Fortea MI, Serrano-Martínez A, Gabaldón JA, Núñez-Delicado E. Biological Activities of Kaempferol: Effect of Cyclodextrins Complexation on the Properties of Kaempferol. *Chemical Physics Research Journal.* 2013; 6(3/4): 209-239.
174. Panichayupakaranant P. Naphthoquinone Formation in *Impatiens balsamina* Cell Cultures. *Pharm Biol.* 2001; 39(1): 1-4.
175. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 8777–8783.
176. Sakunphueak A, Tansakul P, Umehara K, Noguchi H, Panichayupakaranant P. Effect of methionine on production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures and detection of some secondary metabolites. *Pharm Biol.* 2013; 51(1): 36–41.
177. Bohm BA. Naphthoquinone biosynthesis in higher plants. II. p-Hydroxybenzoic acid as a precursor of 2-hydroxy 1,4-naphthoquinone in *Impatiens balsamina* L. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967; 26(5): 621-624.
178. Grotzinger E, Campbell IM. 4-(2'-Carboxyphenyl)-4-oxobutyrate: An obligatory intermediate in lawsone Biosynthesis. *Phytochemistry.* 1974; 13; 923-926

179. Campbell IM. The roles of alanine, aspartate and glutamate in lawsone biosynthesis in *Impatiens balsamina*. *Tetrahedron Lett.* 1969; 10(54): 4777-4780.
180. Grotzinger E, Campbell IM. *Phytochemistry*. Intermediate symmetry in lawsone biosynthesis. 1972; 13; 923-926.
181. Bagby M, Smith CRJr. Asymmetric triglycerides from *Impatiens edgeworthii* seed oil. *Biochim Biophys Acta.* 1967; 137: 475-477.
182. Pérez-Sacau E, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Gutiérrez Yapu D, Giménez Turba A. Antiplasmodial Activities of Naphthoquinones Related to Lapachol and β -lapachone. *Chem Biodivers.* 2005; 2: 264-274.
183. Coelho TSf, Silva RS, Pinto AV, Pinto MC, Scaini CJ, Moura KC, Almeida da Silva P. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2010; 92: 293-297.
184. Vinothkumar SP, Murali K, Gupta JK. Antioxidant Effect of Synthetic Hydroxy Naphthoquinone Derivatives. *J Pharm Res.* 2010; 3(11): 2784-2787.
185. Rahmoun NM1, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Med Mal Infect.* 2012; 42: 270–275.
186. López López LI, Nery Flores SD, Silva Melmares SY, Sáenz Galindo A. Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivates-A Structured Review. *Vitae.* 2014; 21(3): 248-258.
187. Rajan N, Baskar L, Sajeeth CI, Haribabu Y, Unnikrishnan G. Biologically Active Lawsones: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Some Naphthoquinone Derivatives. *Asian J. Research Chem.* Mar 2014; 7(3): 281-284.
188. De Araújo MV, de Souza PS, de Queiroz AC, da Matta CB, Leite AB, da Silva AE, de França JA, Silva TM, Camara CA, Alexandre-Moreira MS. Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluation of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. *Molecules.* 2014; 19, 15180-15195.
189. Redaelli M, Mucignat-Caretta C, Isse AA, Gennaro A, Pezzani R, Pasquale R, Pavan V, Crisma M, Ribaldo G, Zagotto G. New naphthoquinone derivatives against glioma cells. *Eur J Med Chem.* 2015; 96: 458-466.
190. Gu JQ, Graf TN, Lee D, Chai HB, Mi Q, Kardono LB, Setyowati FM, Ismail R, Riswan S, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Swanson SM, Kroll DJ, Falkinham JO 3rd, Wall ME, Wani MC, Kinghorn AD, Oberlies NH. Cytotoxic and

- antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. *J Nat Prod.* 2004; 67: 1156-1161.
191. Maruo S, Nishio K, Sasamori T, Tokitoh N, Kuramochi K, Tsubaki K. Biomimetic Synthesis of Zeylanone and Zeylanone Epoxide by Dimerization of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone. *Org Lett.* 2013; 15(7), 1556–1559.
 192. Johann L, Belorgey D, Huang HH, Day L, Chessé M1, Becker K, Williams DL, Davioud-Charvet E. Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as SmTGR inhibitors and new anti-schistosomal drugs. *FEBS J.* 2015; 282: 3199–3217.
 193. Ramos EI, Garza KM, Krauth-Siegel RL, Bader J, Martinez LE, Maldonado RA. 2,3-Diphenyl-1,4-Naphthoquinone: A Potential Chemotherapeutic Agent against *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* Apr 2009; 95(2): 461-466.
 194. Pieretti S, Haanstra JR, Mazet M, Perozzo R, Bergamini C, Prati F, Fato R, Lenaz G, Capranico G, Brun R, Bakker BM, Michels PA, Scapozza L, Bolognesi ML, Cavalli A. Naphthoquinone Derivatives Exert Their Antitrypanosomal Activity via a Multi-Target Mechanism. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(1): e2012.
 195. Mathew N, Karunan T, Srinivasan L, Muthuswamy K. Synthesis and Screening of Substituted 1,4-Naphthoquinones (NPQs) as Antifilarial Agents. *Drug Dev Res.* 2010; 1: 88–196.
 196. Silvearn RF, Holmes DHL. Synthesis of some 1,4-naphthoquinones and reactions relating to their use in the study of bacterial growth inhibition. *Can J Chem.* 1968; 46. 1859-1864.
 197. Kumar S, Malachowski WP, DuHadaway JB, LaLonde JM, Carroll PJ, Jaller D, Metz R, Prendergast GC, Muller AJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med Chem.* 2008; 51: 1706–1718.
 198. Ramirez O, Motta-Mena LB, Cordova A, Garza KM. A Small Library of Synthetic Di-Substituted 1, 4-Naphthoquinones Induces ROS-Mediated Cell Death in Murine Fibroblasts. *PLoS ONE.* 2014; 9(9): e106828.
 199. Ross AE, Emadi A, Marchionni L, Hurley PJ, Simons BW, Schaeffer EM, Vuica-Ross M. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. *BJU Int.* 2011; 108:447-454.
 200. De Moraes TA, Filha MJ, Camara CA, Silva TM, Soares BM, Bomfim IS, Pessoa C, Ximenes GC, Silva Junior VA. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of a

- Series of 2-Amino-Naphthoquinones against Human Cancer Cells. *Molecules*. 2014; 19: 13188-13199.
201. Pérez-Sacau E, Díaz-Peñate RG, Estévez-Braun A, Ravelo AG, García-Castellano JM, Pardo L, Campillo M. Synthesis and Pharmacophore Modeling of Naphthoquinone Derivatives with Cytotoxic Activity in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Line. *J Med Chem*. 2007; 50: 696-706.
 202. Kongkathip N, Luangkamin S, Kongkathip B, Sangma C, Grigg R, Kongsaree P, Prabpai S, Pradidphol N, Piyaviriyagul S, Siripong P. Synthesis of novel rhinacanthins and related anticancer naphthoquinone esters. *J Med Chem*. 2004; 47, 4427-4438.
 203. Lien JC, Wu CR, Hour MJ, Huang LJ, Huang TF, Kuo SC. Synthesis of 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinones as antiplatelet agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008; 341, 639–644
 204. Mahapatra A, Tshikalange TE, Meyer JJM, Lall N. Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibition activity of 1,4-naphthoquinone derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. *Ene* 2012; 47(6): 883-887.
 205. Mitchell MJ, Brescia AI, Smith SL, Morgan ED. Effects of the compounds 2-methoxynaphthoquinone, 2-propoxynaphthoquinone, and 2-isopropoxynaphthoquinone on ecdysone 20-monooxygenase activity. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2007; 66: 45–52.
 206. Khambay BPS, Batty D, Beddie DG, Denholm I, Cahill MR. A New Group of Plant-Derived Naphthoquinone Pesticides. *Pestic Sci*. 1997; 50: 291-296.
 207. Medina LFC, Stefani V, Brandelli A. Use of 1,4-naphthoquinones for control of *Erwinia carotovora*. *Can J Microbiol*. 2004; 50: 951–956.
 208. Laurieri N1, Egleton JE, Varney A, Thinnes CC, Quevedo CE, Seden PT, Thompson S, Rodrigues-Lima F, Dairou J, Dupret JM, Russell AJ, Sim E. A Novel Color Change Mechanism for Breast Cancer Biomarker Detection: Naphthoquinones as Specific Ligands of Human Arylamine N-Acetyltransferase. *PLoS ONE*. 2013; 8(8): e70600.
 209. Munday R, Smith BL, Fowke EA. Hemolytic activity and nephrotoxicity of 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone. *J Applied Toxicology*. 1991; 11(2): 85-90.
 210. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone : ninety day sub-chronic oral toxicity study in the rat. Safepharm Labs, UK. Study No: 436/7. 8.10.1992. Citado por: THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD

- PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. OPINION CONCERNING LAWSONE COLIPA n° C146. SCCNFP on 16 February 2004. SCCNFP/0798/04.
211. 13-Week toxicity study by oral route in rats - 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone. CIT, France. Report No: 11312 TCR. 10.4.1995. Citado por: THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. OPINION CONCERNING LAWSONE COLIPA n° C146. SCCNFP on 16 February 2004. SCCNFP/0798/04.
212. Embryotoxicity/teratogenicity study by oral route in rats. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone. CIT, France. Report No. 11321 RSR. 11.4.1995. Citado por: Citado por: THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. OPINION CONCERNING LAWSONE COLIPA n° C146. SCCNFP on 16 February 2004. SCCNFP/0798/04.
213. THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. OPINION CONCERNING LAWSONE COLIPA n° C146. SCCNFP on 16 February 2004. SCCNFP/0798/04.
214. Castro FAV, Mariani D, Panek AD, Eleutherio ECA, Pereira MD. Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE. 2008; 3(12): e3999.
215. Vairetti M, Richelmi P, Bellomo G, Berte F. Toxicity of 2-methyl-1,4-naphthoquinone in anthracycline-sensitive and resistant MCF-7 cell lines. Pharmacol Res. Sep–Oct 1990; 22(Suppl. 2): 486.
216. Dierickx PJ. Interaction of benzo- and naphthoquinones with soluble glutathione S-transferases from rat liver. Pharmacol Res Commun. 1983; 15(6): 581-591.
217. Demma J, Hallberg K, Hellman B. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells. Toxicol in Vitro. 2009; 23: 266–271.
218. Paulsen MT, Ljungman M. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 15; 209: 1-9.
219. Coelho-Cerqueira E, Netz PA, do Canto VP, Pinto AC, Follmer C. Beyond Topoisomerase Inhibition: Antitumor 1,4-Naphthoquinones as Potential Inhibitors of Human Monoamine Oxidase. Chem Biol Drug Des. 2014; 83: 401–410.

220. Munday R, Smith BL, Munday CM. Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone. *J Appl Toxicol.* 2007; 27: 262–269.
221. Kokwaro JO. Medicinal plants of East Africa. 3a ed. Nairobi: University of Nairobi Press; 2009. p. 478. Citado por: Lim TK. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Volume 7 Flowers. Springer Science Business Media Dordrecht; 2014.
222. Garcia D, Domingues MV, Rodrigues E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2010; 6:29.
223. Mabberley DJ. Plant Book - A Portable dictionary of the vascular plants, their classification and uses. 3a ed. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 2008.
224. Ratheesh Narayanan MK, Anilkumar N, Meera Raj R, Sivadasan M, Alfarhan AH. A New Scapigerous Species of *Impatiens* (Balsaminaceae) From India. *Bangladesh J Plant Taxon.* Dec 2011; 18(2): 141-148.
225. Janssens SB, Smets EF, Vrijdaghs A. Floral development of *Hydrocera* and *Impatiens* reveals evolutionary trends in the most early diverged lineages of the Balsaminaceae. *Ann Bot.* 2012; 109: 1285–1296.
226. Janssens SB, Knox EB, Huysmans S, Smets EF, Merckx VS. Rapid radiation of *Impatiens* (Balsaminaceae) during Pliocene and Pleistocene: result of a global climate change. *Mol Phylogenet Evol.* Sep 2009; 52(3): 806-824.
227. PLANTS Database [Internet]. Estados Unidos de América: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture [Actualizado 8 May 8 2015; Consultado 5 Ago 2015]. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/>
228. Von Balthazar M, Schönenberger J. Comparative floral structure and systematics in the balsaminoid clade including Balsaminaceae, Marcgraviaceae and Tetrameristaceae (Ericales). *Bot J Linn Soc.* 2013; 173: 325–386.
229. Yu SX, Janssens SB, Zhu XY, Lidén M, Gao T-G, Wang W. Phylogeny of *Impatiens* (Balsaminaceae): integrating molecular and morphological evidence into a new classification. *Cladistics.* 2015; 0 :1-19.
230. Clevenger, S. Anthocyanidins of some *Impatiens* species. *Evolution.* D1c 1971; 25(4):669-677.
231. Grey-Wilson C. *Impatiens* of Africa: morphology, pollination and pollinators, ecology, phytogeography, hybridisation, keys and a systematic treatment of all African

- species: with a note on collecting and cultivation. Holanda: A. A. Balkema Rotterdam; 1980.
232. Henry ADreer. Seed catalog. 1N Water Street, Philadelphia PA: Henry G. Gilbert Nursery and Seed Trade Catalog Collection of the National Agricultural Library; 1890. Citado por: Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.
233. Johnson, Stokes. Seed catalog. Market Street, Philadelphia PA: Henry G. Gilbert Nursery and Seed Trade Catalog Collection of the National Agricultural Library; 1890. Citado por: Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.
234. Kramer IN, Son. Seed catalog. 225-227 Third Ave. Cedar Rapids, IA: Henry G. Gilbert Nursery and Seed Trade Catalog Collection of the National Agricultural Library; 1900. Citado por: Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.
235. Livingston Seed Company. Seed catalog. Columbus OH: Henry G. Gilbert Nursery and Seed Trade Catalog Collection of the National Agricultural Library; 1900. Citado por: Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.
236. U.S. Department of Agriculture (USDA), National Agricultural Statistics Service (NASS). 1998 Census of Horticultural Specialties. Estados Unidos: U.S. Department of Agriculture (USDA), National Agricultural Statistics Service (NASS); 1998. p.4.
237. United States Department of Agriculture. *Impatiens* (Balsaminaceae). Report of the Herbaceous Ornamental Crop Germplasm Committee; 1995. Citado por: Mandle L, Warren DL, Hoffmann MH, Peterson AT, Schmitt J, von Wettberg EJ. Conclusions about Niche Expansion in Introduced *Impatiens walleriana* Populations Depend on Method of Analysis. PLoS ONE. 2010; 5(12): e15297.

238. Hope C. Letter from Claude Hope to Nona Wolfram-Koivula, Executive Director, National Garden Bureau; 1993. Citado por: Uchneat MS. *IMPATIENS Impatiens wallerana*. In: Anderson NO, editor. Flower Breeding and Genetics Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century. Springer, Bussiness Dordrecht; 2007. p. 277-299.
239. Leue E. Synopsis of Priority Genera - *Impatiens*. In: Report of the Herbaceous Ornamental Crop Germplasm Committee; 1995. Citado por: Uchneat MS. *IMPATIENS Impatiens wallerana*. In: Anderson NO, editor. Flower Breeding and Genetics Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century. Springer, Bussiness Dordrecht; 2007. p. 277-299.
240. Skálová H, Pyšek P. Germination and establishment of invasive and native *Impatiens* species in species-specific microsites. In: Pyšek P, Pergl J, editores. Biological Invasions: Towards a Synthesis. Neobiota. 2009; 8: 101–109
241. Pyšek P, Lambdon PW, Arianoutsou M, Kühn I, Pino J, Winter M. Alien vascular plants of Europe Europe. In: Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe, editor. Handbook of alien species in Europe. Berlin: Springer; 2009. p. 43–61.
242. Garguillo MB, Magnuson B, Kinball L. A Field Guide to Plants of Costa Rica. New York: Oxford University Press Inc.; 2008. p. 287.
243. Baxter A. Regeneration and transformation of *Impatiens walleriana* using cotyledonary node culture [Tesis]. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University; 2005.
244. Chen Y, Akiyama S, Ohba H. *Impatiens walleriana* Balsaminaceae. In: Flora of China. Vol 12. Science Press (Beijing) and Missouri Botanical Garden Press; 2007. p. 58.
245. Csurhes S, Edwards R. Potential environmental weeds in Australia: Candidate species for preventative control. Canberra, Australia. Biodiversity Group, Environment Australia; 1998. p. 112
246. Grey-Wilson C. Hybridization in African *Impatiens*: Studies in Balsaminaceae: II. Kew Bulletin. 1980; 34(4): 689-722.
247. Arisumi T. Chromosome numbers and comparative breeding behavior of certain *Impatiens* from Africa, India and New Guinea. J Amer Soc Hort Sci. 1980; 105: 99-102.
248. Arisumi T. Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. J Amer Soc Hort Sci. 1985; 110: 273-276.

249. Wei JL, Lay HY, Chen ZS. Chelator effects on bioconcentration and translocation of cadmium by hyperaccumulators, *Tagetes patula* and *Impatiens walleriana*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 173-178.
250. Lai HY. Effects of Leaf Area and Transpiration Rate on Accumulation and Compartmentalization of Cadmium in *Impatiens walleriana*. *Water Air Soil Pollut.* 2015; 226: 2246.
251. Pant P, Allen M, Tansel B. Mercury uptake and translocation in *Impatiens walleriana* plants grown in the contaminated soil from Oak Ridge. *Int J Phytoremediation.* 2011; 13:168–176.
252. Lai HY. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Impatiens walleriana* in relation to its phytoextraction potential. *Chemosphere.* 2015; 138: 370–376.
253. Dan Y, Baxter A, Zhang S, Pantazis CJ, Veilleux RE. Development of efficient plant regeneration and transformation system for *Impatiens* using *Agrobacterium tumefaciens* and multiple bud cultures as explants. *BMC Plant Biol.* 2010; 10:165.
254. Organización para Estudios Trópicos. Florula Digital Páginas de Especies: *Impatiens balsamina* [Monografía en internet]. Organización para Estudios Trópicos; 2013 [Consultado 16 de enero de 2016]. Disponible en: http://sura.ots.ac.cr/florula4/find_sp.php?key_species_code=LS000826&key_family=Balsaminaceae&key_genus=Impatiens&specie_name=balsamina
255. Quattrocchi U. CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Vol 5. Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC; 2012. p. 2062.
256. Mr Bull's Catalogue. Citado por: The Gardeners' chronicle: a weekly illustrated journal of horticulture and allied subjects. Ene- Jun1886; 25: 760-776.
257. Missouri Botanical Garden St. Louis. *Impatiens hawkeri* SUNPATIENS SERIES [Monografía en Internet]. Saint Louis; Missouri: Missouri Botanical Garden St. Louis [Consultado 16 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=295318&isprofile=0&>
258. Missouri Botanical Garden. *Impatiens hawkeri* (group). In: Missouri Botanical Garden. A Living Collections Management System [Base de datos en internet]. Saint Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden. 2016 - [Consultado 19 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://livingcollections.org/mobot/Taxon/265519?tab=gardening>

259. Suárez A, Echandi MM, Ulate G, Cicció JF. Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev Biol Trop*. 2003; 51(1): 247-252.
260. World Health Organization. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: World Health Organization; 2003. p.15-16.
261. Cascante Marín A. Guía para recolectar y preparar muestras botánicas. San José, Costa Rica: Museo Nacional de Costa Rica, Herbario Nacional (CR); 2008.
262. Morales JF. *Impatiens turrialbana*. En: *Atta Biodiversity of Costa Rica* [Base de datos en internet]. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad. c2011-[Consultado 10 de febrero 2016]. Disponible en: <http://atta2.inbio.ac.cr/neoportal-web/species/Impatiens%20turrialbana>
263. The United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América* 30. Formulario Nacional 25. Volumen 1. Estados Unidos de América: The United States Pharmacopeial Convention; 2007. p. 349.
264. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet*. 2014; 3(8), 147-156.
265. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. 47641 Folin-Ciocalteu's phenol reagent [Monografía en internet]. Suiza: Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Consultado 2 de febrero de 2016]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.pdf>
266. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem*. Jul 2010; 58(14): 8139–8144.
267. Zhang Y, Shen Y, Zhu Y, Xu Z. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*. Sep 2015; 63(1): 569-574.
268. Blainski A, Lopes GC, de Mello JC. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 2013; 18: 6852-6865.
269. Ghosh M, Sinha BN, Seijas JA, Vázquez-Tato MP, Feás X. FLAVONOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM *Litsea polyantha* JUSS. BARK. In: Seijas Vázquez JA, Vázquez-Tato, editores. *The 18th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-18)* 1-30 November 2014. Basilea, Suiza: 2014

[Consultado 2 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/18/files/B/b016/index.pdf>.

270. Balaji K, Hean KC, Ravichandran K, Shikarwar M. *In-Vitro* Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Methanolic Extract of *Convolvulus pluricaulis*. Res J Pharm Biol Chem Sci. Nov-Dec 2014; 5(6): 959-964.
271. Maurya S, Singh D. Quantitative Analysis of Total Phenolic Content in *Adhatoda vasica* Nees Extracts. Int J Pharmtech Res. Oct-Dec 2010; 12(4): 2403-2406.
272. Genwali GR, Acharya PP, Rajbhandari M. Isolation of Gallic Acid and Estimation of Total Phenolic Content in Some Medicinal Plants and Their Antioxidant Activity. Nepal J Sci Technol. 2013; 14(1): 95-102.
273. Kamtekar S, Keer V, Patil V. Estimation of Phenolic content, Flavonoid content, Antioxidant and Alpha amylase Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. Journal of applied pharmaceutical science. Sep 2014; 4(9): 61-65.
274. Lee HS. Phenolic Compounds in Foods. In: Nollet LML, editor. Handbook of Food Analysis. 2a ed. Estados Unidos: Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 657-715.
275. Shanmugam S, Sathish Kumar T, Paneer Selvan K. Laboratory Handbook on Biochemistry. Nueva Delhi: PHI Learning Private Limited; 2011. p. 98-100.
276. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Anal Methods. 2014; 7: 1776–1782.
277. Mărghitas LA, Dezmirean D, Laslo L, Moise A, Popescu O, Maghear O. Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. Bulletin USAMV-CN. 2007; 63/64: 164-169.
278. Sharma N, Patni V. Comparative analysis of total flavonoids, quercetin content and Antioxidant Activity of in *In vivo* and *In vitro* Plant Parts of *Grewia Asitica* Mast. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(2): 464-469.
279. Maurya S, Singh D. Quantitative analysis of flavonoids in *Adhatoda vasica* Nees extracts. Der Pharma Chemica. 2010; 2(5): 242-246.
280. Sharma GN, Dubey SK, Sati N, Sanadya J. Anti-inflammatory Activity and Total Flavonoid Content of *Aegle marmelos* Seeds. IJPSDR. 2011; 3(3): 214-218.
281. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology. 1995; 28: 25-30.
282. Contreras-Guzman ES, Strong FC. Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. JAOAC. 1982; 65:1215–1222. Citado por: Kedare SB,

- Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. Jul-Ago 2011; 48(4): 412–422.
283. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. Jul-Ago 2011; 48(4): 412–422.
284. Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2014; 62: 4251–4260.
285. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 4290-4302.
286. Grajeda-Iglesias C, Salas E, Barouh N, Baréa B, Panya A, Figueroa-Espinoza MC. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. *Food Chem*. 2016; 194: 749–757.
287. Zhang Y, Shen Y, Zhu Y, Xu Z. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*. Sep 2015; 63(1): 569-574.
288. Harzallah A, Bhourri AM, Amri Z, Soltana H, Hammami M. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Ind Crops Prod*. 2016; 83: 255–267.
289. Berger JM, Rana RJ, Javeed H, Javeed I, Schulien SL. Radical Quenching of 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl: A Spectrometric Determination of Antioxidant Behavior. *J Chem Educ*. Mar 2008; 85(3): 408-410.
290. Gülçin I. Fe³⁺–Fe²⁺ Transformation Method: An Important Antioxidant Assay. Armstrong D, editores. In: *Advanced Protocols in Oxidative Stress III, Methods in Molecular Biology*. Vol. 1208. Springer Science Business Media New York; 2015. p. 233-246.
291. Bursal E, Gülçin İ. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Res Int*. 2011; 44: 1482–1489.
292. Berker KI, Güçlü K, Tor I, Demirata B, Apak R. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Anal Methods*. 2010; 3:154–168.

293. Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*. 2007; 72: 1157–1165.
294. Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem*. 2007, 100: 1511–1516.
295. Zhang A, Fang Y, Wang H, Li H, Zhang Z. Free-Radical Scavenging Properties and Reducing Power of Grape Cane Extracts from 11 Selected Grape Cultivars Widely Grown in China. *Molecules*. 2011; 16: 10104-10122.
296. Majnooni M, Mansouri K, Gholivand M, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh H, Afnanzade NS, Abolghasemi M, Piriyaie M. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *Afr J Biotechnol*. Ene 2012; 11(2): 498-503.
297. Troy DB, editor. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21a ed. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 561.
298. Kokare CR. Pharmaceutical Microbiology Principles and Applications. 6a ed. Pune, India: Nirali Prakashan; 2008. p. 19.4-19.6.
299. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América 36. Formulario Nacional 31. Volumen 1. Estados Unidos de América: The United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 56-95.
300. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J Ethnopharmacol*. 2006; 106: 290–302.
301. Salgado HRN, Lopes CCGO, Lucchesi MBB. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 40:443–446.
302. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4a ed. Estados Unidos de América: Taylor and Francis Group, LLC; 2010.
303. Coelho de Souza G, Haas AP., von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2004; 90: 135–143.
304. National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1998. Citado por: National Center for Infectious Diseases (NCID), Centers for Disease Control and

- Prevention (CDC), World Health Organization Regional Office for Africa (WHO/AFRO) . Antimicrobial Susceptibility Testing (Agar Disk Diffusion Method). En: National Center for Infectious Diseases (NCID), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), World Health Organization Regional Office for Africa (WHO/AFRO). Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera.). Atlanta, Georgia, Estados Unidos: Centers for Disease Control and Prevention; 1999. p. 61-74.
305. American Type Culture Collection. Reference Strains: How many passages are too many?. Manassas, Virginia: American Type Culture Collection; 2013. Tech Bulletin: 6.
 306. Sutton S. Determination of Inoculum for Microbiological Testing. Journal of GXP compliance. 2011; 15(3): 49-53.
 307. Cazedey ECL, Salgado HRN. Development and Validation of a Microbiological Agar Assay for Determination of Orbifloxacin in Pharmaceutical Preparations. Pharmaceutics. 2011; 3: 572-581.
 308. Cavalieri SJ, Harbeck RJ, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter RI, Sharp SE, Spiegel CA. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology; 2005.
 309. Girardi FA, Tonial F, Chini SO, Sobottka AM, Scheffer-Basso SM, Bertol CD. Phytochemical profile and antimicrobial properties of *Lotus* spp. (Fabaceae). An Acad Bras Cienc. 2014; 86(3): 1295-1302.
 310. Omer SA, Adam SEI, Mohammed OB. Antimicrobial activity of Commiphora myrra Against Some Bacteria and *Candida albicans* Isolated From Gazelles at King Khalid Wildlife Research Center. Res J Med Plant. 2011; 5(1): 65-71.
 311. NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 . Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2002.
 312. Kosalec I, Pepeljnjak S, Kustrak D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). Acta Pharm. 2005;55: 377–385.
 313. Petrikkou E, Rodríguez-Tudela M, Cuenca-Estrella A, Molleja A, Mellado E. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. J Clin Microbiol. Abr 2001; 39(4): 1345–1347.

314. López-Oviedo E, Aller AI, Martín C, Castro C, Ramirez M, Pemán JM, Cantón E, Almeida C, Martín-Mazuelos E. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar 2006; 50(3): 1108-1111.
315. Cardoso SG, Schapoval EES. Microbiological assay for terbinafine hydrochloride in tablets and creams. *Int J Pharm.* 2000; 203: 109–113.
316. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, Glicksman M, Inglese J, Iversen PW, Li Z, McGee J, McManus O, Minor L, Napper A, Peltier JM, Riss T, Trask OJ Jr., Weidner J, editores. *Assay Guidance Manual [Libro en internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-2013 [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf
317. Langdon SP, editor. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004.
318. American Type Culture Collection. *ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines*. Manassas, Virginia: American Type Culture Collection; 2014.
319. European Collection of Cell Cultures (ECACC), Sigma-Aldrich®. *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*. 2a ed. Sigma-Aldrich Co; 2010.
320. American Type Culture Collection. *Product Sheet Soybean Trypsin Inhibitor (ATCC® 302104™)* [Monografía en internet]. Manassas, Virginia: American Type Culture Collection; 2015 [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: <https://www.atcc.org/~ps/30-2104.ashx>.
321. De Oliveira PF, Alves JM, Damasceno JL, Oliveira RAM, Dias HJ, Crotti AEM, Tavares DC. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2015; 25(2):183-188.
322. De Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotuf LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123: 439–445.

323. Nemati F, Dehpouri AA, Eslami B, Mahdavi V, Mirzanejad S. Cytotoxic Properties of Some Medicinal Plant Extracts from Mazandaran, Iran. *Iran Red Cres Med J.* 2013; 15(11): e8871.
324. Minnesota State University Moorhead College Biochemistry & Biotechnology. Mammalian Cell Culture Media Preparation [Monografía en internet]. MSUM Biochemistry & Biotechnology [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://web.mnstate.edu/provost/Media%20Preparation%20Protocol.pdf>
325. Clouthier S. SOP-BCR-4.1 Complete Media Preparation [Monografía en internet]. University of Michigan Comprehensive Cancer Center; 2012 [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.med.umich.edu/wichalab/SOP/SOP%204.1-%20Complete%20Media%20Preparation.pdf>
326. Sigma-Aldrich®. Media Preparation – Plant Tissue Culture Protocol [Monografía en internet]. Sigma-Aldrich Co. LLC; 2016 [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/media-preparation.html>
327. American Type Culture Collection. MTT Cell Proliferation Assay [Monografía en internet]. Manassas, Virginia: American Type Culture Collection; 2011 [Consultado 25 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
328. Vijayarathna S, Sasidharan S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(10): 826-829.
329. Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. *BMC Complement Altern Med.* 2010; 10: 55.
330. Liu ZC, Yang ZX, Zhou JS, Zhang HT, Huang QK, Dang LL, Liu GX, Tao KS. Curcumin regulates hepatoma cell proliferation and apoptosis through the Notch signaling pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(3): 714-718.

ANEXOS

8. Anexos: Descripción botánica de *Impatiens turrialbana*:

Impatiens turrialbana Donnell Smith:

Impatiens turrialbana (IT) es una hierba erecta que puede alcanzar los 2 m de altura (A1), normalmente ramificada, levemente suculenta, presenta un tallo estriado, las hojas crecen de forma opuesta, acumulándose en las partes más elevadas de la planta, la lámina muestra un contorno elíptico a oblongoelíptico con una superficie glabra, las dimensiones de las hojas oscilan entre 2 cm a 7,5 cm de largo por 1 cm a 3 cm de ancho, el margen es serrulado hasta el ápice, la lámina es continua hasta la base mientras el ápice es de obtuso a subagudo, el margen puede ser mucronato en la base foliar la cual es corta del tipo cuneata, las hojas presentan entre 8 a 12 pares de nervaduras ascendentes que son poco apreciables, los pecíolos presentan una longitud de entre los 1 cm y los 4 cm, su superficie es glabra (A2). Las inflorescencias crecen solas y se ubican sobre las axilas de las hojas, consisten en un pedúnculo de superficie glabra de entre 4 cm a 5 cm de longitud al final del cual se disponen dos flores, mismas que se caracterizan por presentar una coloración escarlata y una sola bráctea de entre 3 mm a 4 mm de longitud, la bráctea es de textura glabra, es deltoide y apiculada, los sépalos de la flor presentan una longitud de 8 mm de alto por 7 mm de ancho, son circulares, ovatos, apiculados y subcordados en la base; el sépalo posterior constituye el estolón característico del género *Impatiens* posee una longitud de entre 2 cm a 3 cm, el pétalo anterior presenta un ancho y largo de 10 mm, con forma de ovata a oblongada, usualmente apiculado, los pétalos laterales se encuentran fusionados exhibiendo una morfología oblongoelíptica con 2 lóbulos oblongos u ovatos que presentan 4 mm de longitud y entre 3 mm a 4 mm de ancho, el ovario usualmente es glabro (43). El fruto corresponde a una cápsula dehiscente de superficie glabra con una longitud 2,5 cm y un diámetro de entre 2 mm a 3 mm (A1-A2).

IT constituye la única planta del género *Impatiens* nativa de América Central, también se reporta su crecimiento como planta silvestre en México, se cree que la planta es nativa de las zonas altas de los volcanes Turrialba e Irazú en Costa Rica, sin embargo también se ha localizado en Panamá, en el Valle del Río Chiriquí Viejo (A1-A2). El Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, registra especímenes de IT provenientes de las zonas de conservación La Amistad Caribe, La Amistad Pacífico y Cordillera Volcánica Central encontradas a altitudes a partir de los 1300 metros sobre el nivel del mar, sin embargo se reporta un espécimen hallado a 0 metros de altitud (A5), la floración de IT se da entre marzo y octubre, la planta habita en sitios muy húmedos (A4).

Referencias:

A1. United States Department of Agriculture. Plant Inventory No. 184. Washington D.C: United States Department of Agriculture; 1978. p. 54.

A2.Elias TS. Family 110. Balsaminaceae. In: Woodson RE, Schery RW, et al. Flora of Panama Part VI. Ann Missouri Bot Gard. 1967; 54(1): 21-24.

A3.Instituto Nacional de . Lista de especímenes de *Impatiens turrialbana* [Internet]. Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad [Consultado 16 de enero de 2016]. Disponible: <http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0134/f01661/g007217/s021003.htm>.

A4.Morales JM. *Impatiens turrialbana* China de Monte [monografía en internet]. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, 2011 [Consultado 2 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://atta2.inbio.ac.cr/neoportal-web/species/impatiens%20turrialbana>

*/**/**/***/

Delgado R, Fabian. (2016). *Protocolo de Investigacion Area Farmacologia* Facultad de Farmacia Univesidad de Costa Rica