

CONTENIDO DE POLIFENÓLICOS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE LA RAÍZ DE *Ibervillea sonorae*

POLYPHENOLICS CONTENT, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Ibervillea sonorae* ROOT

José Alberto Núñez-Gastélum^{1*}, Rubén Hernández-Rivas¹, Joaquín Rodrigo-García², Laura A. de la Rosa¹, Emilio Álvarez-Parrilla¹, Ángel Gabriel Díaz-Sánchez¹, Oscar Adrian Muñoz-Bernal¹, Keni Cota-Ruiz³ y Alejandro Martínez-Martínez¹

¹ Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo envolvente del Pronaf y Estocolmo s/n, 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

² Departamento de Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo envolvente del Pronaf y Estocolmo s/n, 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

³ El Colegio de Chihuahua, Anillo envolvente del Pronaf, Ciudad Juárez, Chihuahua, 32310, México.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de polifenólicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de la raíz de *Ibervillea sonorae* proveniente del estado de Sonora. Se utilizaron cuatro muestras representativas a las cuales se les realizó una extracción con metanol acuoso al 80 %. A los extractos se les determinó el contenido de polifenoles y flavonoides totales, además de la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH, ABTS y FRAP. También se analizó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco en *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Para polifenoles totales, se encontraron concentraciones mayores a 10 mg EAG/g y en flavonoides totales cantidades mayores a 1 mg EC/g. En cuanto a la actividad antioxidante los extractos presentaron concentraciones promedio de 20, 46.15 y 16.49 $\mu\text{mol ET/g}$ para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Mientras que la raíz de *I. sonorae* mostró inhibición en *Staphylococcus aureus* (200 mg/mL) y *Clostridium perfringens* (100 mg/mL), ambos Gram (+).

Palabras clave: *Ibervillea sonorae*, antioxidante, antimicrobiano, polifenoles

ABSTRACT

The purpose of this study was to estimate the polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial capacity of the root from *Ibervillea sonorae* from the state of Sonora. Four representative samples were used, to which an extraction with 80 % aqueous methanol was carried out. The content of polyphenols, total flavonoids, and antioxidant capacity was determined in the extracts by DPPH, ABTS and FRAP. The antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was also analyzed by the disk diffusion technique. On average, total polyphenols were present at 10 mg GAE/g, while total flavonoids were at 1 mg CE/g. On the other hand, the extracts presented an average of antioxidant activity of 20, 46 and 16

$\mu\text{mol TE/g}$ for DPPH, ABTS and FRAP, respectively. Meanwhile *I. sonorae* root extracts showed inhibition of *Staphylococcus aureus* (200 mg/mL) and *Clostridium perfringens* (100 mg/mL), both Gram (+) bacteria.

Keywords: *Ibervillea sonorae*, antioxidant activity, antimicrobial capacity, polyphenols

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y patologías como obesidad, diabetes tipo II, hiperlipidemia, envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis y aterosclerosis han sido relacionadas con el estrés oxidativo en los últimos 40 años (Hybertson *et al.*, 2011; Rivera-Ramírez *et al.*, 2011). Por otra parte, el descubrimiento de nuevas enfermedades infecciosas y el uso inadecuado de antibióticos en los últimos 50 años, han contribuido al incremento de la resistencia bacteriana desencadenando una reducción en la efectividad de los tratamientos farmacológicos (Dreser *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de la medicina tradicional ha registrado un aumento en su consumo a partir de 1990 en países desarrollados y subdesarrollados, siendo una importante alternativa para la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos y para el tratamiento de enfermedades crónicas no trasmisibles (OMS, 2013).

En la actualidad, México se ha catalogado como uno de los países ricos en variedad y uso de plantas medicinales; sin embargo, pocas han sido estudiadas y validadas farmacológicamente (Rosas-Piñón *et al.*, 2012). *Ibervillea sonorae*, comúnmente denominada "wereque", ha sido una de las especies poco estudiadas. Es una planta que es empleada como medicina tradicional por los nativos del noroeste de México para combatir distintos padecimientos (Johnson *et al.*, 2006). Las hojas y los cultivos de callos obtenidos de las hojas tienen actividad antioxidante (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2012). Existen pocos estudios en los que se busca validar el efecto farmacológico de la raíz de wereque. El efecto

*Autor para correspondencia: José Alberto Núñez-Gastélum
Correo electrónico: jose.nunez@uacj.mx

Recibido: 31 de Agosto de 2017

Aceptado: 15 de febrero de 2018

hipoglucémico es la principal propiedad que se atribuye a los componentes de la raíz de la planta, mismo que se cree es debida a moléculas hidrosolubles que estimulan la captación de glucosa en pre-adipositos mediante una vía independiente de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) y sin efectos pro-adipogénicos (Zapata-Bustos *et al.*, 2014). Se ha reportado solo un documento en la literatura que trata sobre la determinación de polifenoles y capacidad antioxidante en la raíz de wereque (Ramírez-Ortiz *et al.*, 2016); sin embargo, se requiere incrementar el conocimiento de composición química, propiedades farmacológicas y toxicológicas para poder montar un programa de manejo y aprovechamiento de este recurso (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y antimicrobiana de la raíz de wereque del estado de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y cuantificación de polifenoles

Las extracciones de las muestras y el análisis de polifenoles se realizaron por el método descrito por Moreno-Escamilla *et al.* (2015), con ligeras modificaciones. Se colectaron 4 grupos de muestras de la raíz de wereque en la región Sur del Estado de Sonora (27°53'N y 109°55'O), de plantas con una distancia de 50 m entre sí, mismos que fueron identificados como E1, E2, E3 y E4. Las muestras se trituraron y almacenaron en un ultracongelador Revco ExF (Thermo Scientific, Marietta, OH, EUA) a -80 °C por dos días, luego fueron liofilizadas (Labconco Freeze, Kansas City, MO, EUA) a -40 °C por cuatro días. Una vez secas, se trituraron con un homogeneizador comercial (Nutribullet, Los Angeles, CA, EUA) hasta obtener un polvo fino. Para la extracción se pesaron 10 g de cada muestra y se agregaron 100 mL de metanol (Hycel, Jalisco, Mexico) al 80 % en agua, después se sonicó a 40 kHz (Emerson Electric Co., St. Louis, MO, EUA) por 30 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó (Eppendorf 5018 R, Berlín, Alemania) a 4 °C por 15 min a 1600 x g. El sobrenadante se filtró y el residuo se sometió de nuevo a extracción bajo las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se juntaron y rotaevaporaron (Buchi R-3, Flawil, Suiza) a 40 °C a presión reducida y el residuo (extracto crudo) se congeló a -80 °C. Finalmente, los cuatro extractos se liofilizaron a -40 °C y almacenaron en bolsas de plástico a -20 °C para los posteriores análisis. Todos los reactivos empleados fueron comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) a menos que se indique otra cosa.

Los polifenoles totales (PFT) se analizaron empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 %, se agregaron 2.5 mL del reactivo comercial en un matraz de 25 mL y se aforó con agua destilada. Además, se preparó una solución estándar de ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL en metanol acuoso al 80 %. A partir de ésta, las diluciones apropiadas fueron preparadas. A 250 µL de soluciones de extracto de 10 mg/L o de estándar se les agregó 1 mL de bicarbonato de sodio al 7.5 %. Las mezclas se dejaron reposar por 2 min, luego se les adicionó 1.25 mL de la solución de Folin-Ciocalteu

al 10 % y se incubaron a 50 °C por 15 min. Finalmente, las soluciones se temperaron con agua fría por 2 min y se transfirieron 300 µL a cada pocillo en una microplaca para leer la absorbancia a 760 nm (BioRad xMark Plus, Tokio, Japón). La cantidad de PFT se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g).

Para la determinación de flavonoides totales (FVT) se preparó nitrito de sodio al 5% con agua destilada, cloruro de aluminio al 10 % e hidróxido de sodio 0.5 M. Se realizó una curva de calibración utilizando catequina en metanol acuoso al 80 % en diluciones adecuadas. Luego se pesaron 50 mg de cada muestra y se diluyeron en 1 mL de metanol acuoso al 80 %. De las soluciones anteriores se tomaron 124 µL y se les adicionaron 500 µL de agua destilada, 33.2 µL de nitrito de sodio al 5 % y se dejaron reposar por 5 min. Luego se añadieron 37.2 µL de cloruro de aluminio al 10 % y se dejó reaccionar durante 3 min. Pasado el tiempo se agregaron 500 µL de hidróxido de sodio 0.5 M y se incubó por 30 min en ausencia de luz. Finalmente, se transfirieron 300 µL de las soluciones a cada pocillo de la microplaca y se leyó la absorbancia a 510 nm. La cantidad de flavonoides totales se expresaron como mg de equivalentes a catequina por gramo de extracto (mg EC/g).

Evaluación de la capacidad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se realizó siguiendo la metodología descrita por Moreno-Escamilla *et al.* (2017), con ligeras modificaciones. Para la preparación del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH, por sus siglas en inglés) se pesaron 23.66 mg y se aforó a 10 mL con metanol al 80 % en ausencia de luz. Se transfirieron 317 µL y se aforó a 10 mL para obtener una concentración de 0.190 mM. Después, se pesaron 5 mg de extracto y se diluyeron en 1 mL de metanol al 80 %. Para el análisis se adicionaron 50 µL del estándar ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y/o muestras a cada pocillo que contenía 200 µL del reactivo de DPPH 0.190 mM, la absorbancia fue colectada a 517 nm. En todos los casos la capacidad antioxidante se expresó como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto (µmol ET/g).

Por otro lado, para la medición de la capacidad de inhibir el radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilben-zotiazolin)-6-sulfónico (ABTS, por sus siglas en inglés) se preparó amortiguador salino de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) 0.1 M, pH 7.4. Se generó el radical pesando 38.60 mg de ABTS y 6.62 mg de persulfato de potasio, se aforó a 10 mL con la solución de PBS y se dejó oxidar por 16 h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Luego, de la solución anterior se tomó un volumen de trabajo que se ajustó mediante dilución a una absorbancia de 0.7. La solución con la muestra se preparó disolviendo 5 mg de extracto en 1 mL de metanol al 80 %. Finalmente, se mezclaron 12 µL de las soluciones de Trolox y/o extracto con 285 µL de la solución ajustada de ABTS. La absorbancia de las mismas se midió a una longitud de onda de 734 nm por 30 min.

En el caso de la determinación del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés) se preparó

una solución amortiguadora de acetato con acetato de sodio y ácido acético con un pH de 3.6. También se realizó una solución de cloruro de hierro pesando 0.54 g y disolviendo en 100 mL con agua destilada en ausencia de luz. Posteriormente, para preparar el reactivo férrico se pesaron 31.23 mg de reactivo 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, por sus siglas en inglés) en un matraz aforado de 10 mL que contenía 33 μ L de HCl al 36 % y se llevó a ras con agua destilada. Luego, en un matraz aforado de 10 mL se añadió 1 mL de la solución de cloruro de hierro, 1 mL de TPTZ y se aforó con el amortiguador de acetatos. Para las soluciones de extracto se pesaron 4 mg y se diluyeron en 1 mL de metanol al 80 %. El reactivo férrico se calentó a 37 °C por 30 min, luego se agregaron 24 μ L de estándar y/o muestra con 180 μ L del reactivo férrico y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas.

Determinación de actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó por el método descrito por Klančnik *et al.* (2010), con ligeras modificaciones. Se seleccionaron cuatro especies representativas de infecciones comunes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Clostridium perfringens*. Se inocularon en un caldo nutritivo y se dejaron en incubación a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se ajustó el inóculo de cada microorganismo a una densidad óptica de 0.05 a 600 nm y se sembraron en agar Mueller Hinton (Bioxon BD, Ciudad de México, México) con un hisopo estéril. Luego se colocaron en la superficie del agar cuatro discos de papel filtro Whatman #4 de 6 mm de diámetro (Whatman, Inc., Maidstone, Reino Unido) y se impregnaron con 10 μ L de extracto a concentraciones de 200, 100 y 10 mg/mL. Se utilizó agua destilada como control negativo y cloranfenicol como control positivo. Finalmente, las muestras se incubaron a 37 °C y se observaron a las 24 y 48 h.

Análisis estadístico

Los valores de capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana se presentan como valores promedio \pm desviación estándar (DE). Se realizó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey a una significancia de $p \leq 0.05$ para determinar las diferencias entre las muestras de estudio. Se utilizó el paquete estadístico Minitab versión 17 (Minitab Inc., PA, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de fenoles y flavonoides totales

Cabe señalar que son escasos los estudios científicos que se han realizado para caracterizar la planta de wereque, todavía son menos los que tratan de la raíz de la planta. El rendimiento de los extractos osciló entre 9–10 %, éstos presentaron una coloración amarillo claro. Según Rivera-Ramírez *et al.* (2011), después de realizar un extracto acuoso mediante reflujo de un polvo comercial de raíz de wereque se obtiene alrededor de un 8 % de rendimiento de un polvo de color café. El tratamiento de extracción a altas temperaturas pudo ocasionar la oxidación de componentes de la muestra, generando dicha coloración, lo cual no sucede en la extracción asistida por ultrasonido. El contenido de PFT y FVT en los extractos se determinó realizando tres réplicas con tres repeticiones cada uno. Los PFT presentaron una máxima concentración en E1 y se encontraron diferencias significativas entre las muestras. Por otra parte, el contenido de FVT mostró una mayor concentración para el E2, también se observó diferencia significativa entre los extractos (Tabla 1). De acuerdo con lo reportado por Chew *et al.* (2011), la cantidad de PFT puede ser categorizada en alta (50 mg/EAG g), media (30–10 mg/EAG g) y baja (<10 mg/EAG g), lo cual ubica a los cuatro extractos con una concentración media. Estudios realizados por Estrada-Zúñiga *et al.* (2012), mostraron que la hoja de wereque presenta una concentración de 360 mg EAG/g, valor superior al encontrado en la raíz analizada en el presente estudio, esto puede ser explicado por el estrés al cuál las hojas están sometidas, lo que hace que sintetizen una mayor cantidad de compuestos polifenólicos para su protección. Por otro lado, Ramírez-Ortiz *et al.* (2016), encontraron aproximadamente de 14 y 30 mg EAG/g en extractos de raíz de *I. sonorae* obtenidos con alcohol y agua, respectivamente. Ambos valores son mayores a los del presente estudio; el más cercano corresponde al extracto etanólico, semejante a la mezcla extractora usada aquí. El extracto acuoso duplica lo encontrado en este estudio; sin embargo, se ha reportado que cuando ciertos compuestos demasiado solubles en agua, tales como: azúcares, aminoácidos y/o vitaminas, que se encuentran en los extractos vegetales pueden provocar que el método de Folin-Ciocalteu sobreestime. Aunado a esto, la etapa de desarrollo de la planta y su hábitat tienen una gran influencia sobre la concentración de los fitoquímicos

Tabla 1. Contenido de compuestos polifenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante de los extractos de raíz de *I. sonorae*.
Table 1. Content of polyphenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity of extracts from root of *I. sonorae*.

Muestra	CPFT ^a	FLVT ^b	DPPH ^c	ABTS ^d	FRAP ^e
M1	13.29 \pm 0.13 ^c	1.02 \pm 0.04 ^a	28.46 \pm 0.35 ^c	67.25 \pm 0.20 ^b	40.14 \pm 2.23 ^c
M2	12.54 \pm 0.12 ^c	1.88 \pm 0.29 ^c	28.44 \pm 0.71 ^c	52.41 \pm 3.55 ^a	41.95 \pm 0.42 ^c
M3	10.96 \pm 0.09 ^b	1.83 \pm 0.40 ^c	24.78 \pm 0.35 ^b	51.46 \pm 1.56 ^a	33.40 \pm 2.50 ^b
M4	10.92 \pm 0.19 ^a	1.70 \pm 0.16 ^b	20.50 \pm 1.04 ^a	46.15 \pm 3.94 ^a	16.49 \pm 1.16 ^a

Se presenta el promedio de 3 réplicas con 3 repeticiones \pm DE, superíndice diferente entre filas representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$). ^amg EAG/g. ^bmg EC/g. ^c μ mol ET/g.

(Muñoz-Bernal *et al.*, 2017). Así mismo, el contenido de FVT en los extractos analizados por Ramírez-Ortiz *et al.* (2016), fue aproximadamente de 3 y 5 mg EC/g para el etanólico y acuoso, respectivamente. Esto concuerda con lo obtenido en esta investigación, donde el contenido de flavonoides es mucho menor que el del resto de los compuestos polifenólicos.

Capacidad antioxidante de la raíz de *I. sonora*

La capacidad antioxidante por DPPH, ABTS y FRAP se determinó realizando tres réplicas con tres repeticiones cada uno (Tabla 1). Por el método de DPPH se presentó una máxima inhibición en E1 y se encontraron diferencias significativas entre los extractos. Por otra parte, en ABTS la mayor inhibición fue para E1, mientras que los otros extractos fueron estadísticamente iguales. En FRAP se obtuvo una inhibición máxima para E2, mientras que E4 presentó una actividad menor a las demás. Un estudio realizado por Estrada-Zúñiga *et al.* (2012), mostró que las hojas y los callos cultivados a partir de explantes de éstas tenían actividad antioxidante, la que se midió por los métodos de DPPH y ABTS. Mientras que Ramírez-Ortiz *et al.* (2016), encontraron que los extractos acuosos y etanólicos que realizaron de la raíz de *I. sonora* aportaban una actividad antioxidante de 39.5 $\mu\text{mol ET/g}$, similar al reportado aquí. No fue posible comparar los valores de actividad antioxidante por los métodos de ABTS y FRAP debido a la ausencia de información en la literatura.

Capacidad antimicrobiana de la raíz de *I. sonora*

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos se determinó realizando cada experimento por triplicado. A concentraciones de 200 mg/mL, E2 (14.66 ± 0.94

cm) y E4 (13.66 ± 1.24 cm) mostraron un halo de inhibición para *Clostridium perfringens* y se encontraron diferencias significativas entre ellos (Figura 1). E2 (13.00 ± 1.24 cm) tuvo efecto en la inhibición de *Staphylococcus aureus* a una concentración mínima inhibitoria de 200 mg/mL. A una concentración de 100 mg/mL, E2 (11.33 ± 0.47 cm) y E4 (11.00 ± 0.81 cm) sólo mostraron inhibición para *Clostridium perfringens*; sin embargo, la concentración mínima inhibitoria prevaleció en concentraciones de 100 mg/mL. A concentraciones de 10 mg/mL, no se presentó inhibición alguna mostrando igualdad entre los extractos.

Las inhibiciones presentadas en *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* pertenecientes a bacterias Gram (+) se debe a que poseen una capa externa de peptidoglicano suficientemente porosa que permite que los fitoquímicos penetren y puedan ejercer su efecto. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* pertenecientes a las bacterias Gram (-) poseen una capa externa con porinas, las cuales impiden la entrada de fitoquímicos al espacio intracelular. Estudios realizados por Ramírez-Ortiz *et al.* (2016), demuestran que los extractos de la raíz de wereque presentaron alcaloides, cumarinas, flavonoides y quinonas, lo cuales comúnmente juegan un papel importante en efecto antimicrobiano. En las bacterias Gram (+) las quinonas poseen la capacidad de inactivar proteínas y los alcaloides de intercalarse con el ADN microbiano dando como consecuencia la muerte celular (Domingo y López-Brea, 2003). El efecto antimicrobiano de los fitoquímicos de la raíz de *I. sonora* no había sido reportado con anterioridad.

CONCLUSIONES

Se presenta por vez primera un estudio sobre el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de la raíz de wereque. Los extractos presentaron menores contenidos PFT y FVT comparados con las hojas de la planta. La actividad antioxidante de la raíz también fue menor que la reportada para las hojas. La raíz presentó actividad antimicrobiana en microorganismos Gram (+) como: *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*; sin embargo, en bacterias Gram (-) (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) no se observó un efecto inhibitorio en las concentraciones ensayadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Biol. Juan López por la asistencia durante la realización de las pruebas antimicrobianas. A la señora Mercedes Castelo Valencia, nativa de la región del Sur de Sonora, por el apoyo brindado durante la recolección de las muestras. JAN-G agradece a su esposa Rosario Ortiz-Casas por el soporte en momentos difíciles.

REFERENCIAS

- Alarcón-Aguilar, F.J., Campos-Sepúlveda, A.E., Xolalpa-Molina, S., Hernández-Galicia, E. y Román-Ramos, R. 2002. Hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonora* roots in

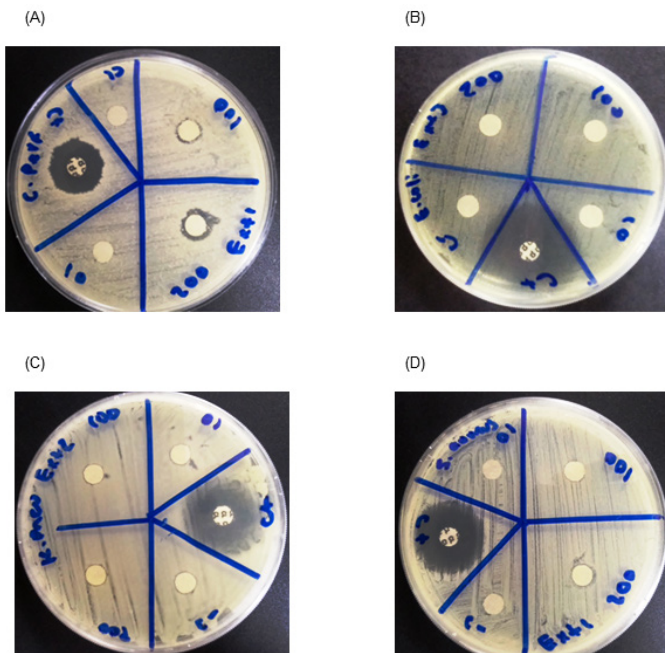


Figura 1. Capacidad antimicrobiana de extractos de la raíz de wereque en *C. perfringens* (A), *E. coli* (B), *K. pneumoniae* (C) y *S. aureus* (D).

Figure 1. Antimicrobial activity of extracts from root of *I. sonora* on *C. perfringens* (A), *E. coli* (B), *K. pneumoniae* (C) and *S. aureus* (D).

- healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biology*. 40(8): 570-575.
- Chew, Y.L., Wan, E., Chan, L., Tan, P.L., Lim, Y.Y., Stanslas, J. y Goh, J.K. 2011. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *Complementary and Alternative Medicine*. 11: 12-22.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4): 385-393.
- Dreser, A., Wirtz, V.J., Corbett, K.K. y Echániz, G. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*. 50(2): 480-487.
- Estrada-Zúñiga, M.E., Arano-Varela, H., Buendía-Gonzalez, L. y Orozco-Villafuerte, J. 2012. Fatty acids, phenols content, and antioxidant activity in *Ibervillea sonora* callus cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(1): 89-96.
- Hybertson, B.M., Gao, B., Bose, S.K. y McCord, J.M. 2011. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 32(4-6): 234-246.
- Johnson, N., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E. y Martinez, A. 2006. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the Southwestern United States. *Phytotherapy Research*. 20: 250-255.
- Klancnik, A., Jer, B. y Smole, S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 81: 121-126.
- Moreno-Escamilla, J.O., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., Núñez-Gastélum, J.A., González-Aguilar, G.A. y Rodrigo-García. 2017. Effect of different elicitors and pre-harvest day application on the content of phytochemicals and antioxidant activity of butterhead lettuce (*Lactuca sativa* var capitata) produced under hydroponic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(26): 5244-5254.
- Moreno-Escamilla, J.O., de la Rosa, L.A., López-Díaz, J.A., Rodrigo-García, J., Núñez-Gastélum, J.A. y Álvarez-Parrilla, E. 2015. Effect of the smoking process and firewood type in the phytochemical content and antioxidant capacity of red Jalapeño pepper during its transformation to chipotle pepper. *Food Research International*. 76: 654-660.
- Muñoz-Bernal, O.A., Torres-Aguirre, G.A., Núñez-Gastélum, J.A., de la Rosa, L.A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, F. y Alvarez-Parrilla, E. 2017. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 20(2): 23-28.
- OMS 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. Hong Kong SAR, China.
- Ramírez-Ortiz, M.E., Rodríguez-Carmona, O.Y., Hernández-Rodríguez, O.S., Chel-Guerrero, L. y Aguilar-Méndez, M.A. 2016. Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de la tronadora, wereque y raíz de nopal. En: *Alimentos Funcionales de hoy*. M.E. Ramírez Ortiz (ed), pp 143-180. OmniaScience. Barcelona, España.
- Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G.N., Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C. y Paniagua-Castro, N. 2011. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 1-6.
- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M.I., Sánchez-Nieto, S., Rivero-Cruz, J.F. 2012. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 141(3): 860-865.
- Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, A.J., Gómez-Sánchez, M. y Salazar-Olivo, L.A. 2014. *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 152: 546-552.