

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN FITOFARMACOLÓGICA

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO UN PARAMETRO PARA DETERMINAR SU POTENCIAL COMO FUENTE DE MATERIAS PRIMAS PARA EL DESARROLLO DE AGENTES ANTITUMORALES"

COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS.

PRESENTA

FABIOLA GÓMEZ BASURTO MATRÍCULA 210181054

COMITE TUTORIAL

Tutor: Dr. FERNANDO CALZADA BERMEJO Asesor: Dra. CAROLINA BARRIENTOS Asesor: Dra. AÍDA SOLÍS OBA

JULIO, 2013

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO UN PARAMETRO PARA DETERMINAR SU POTENCIAL COMO FUENTE DE MATERIAS PRIMAS PARA EL DESARROLLO DE AGENTES ANTITUMORALES"

Comité tutoral

Dr. Fernando Calzada Bermejo Director	
Dra. Aída Solís Oba Asesora interna	aidalisa
Dra. Carolina Barrientos Salcedo Asesora externa	Level !

I.B.I. Fabiola Gómez Basurto Matrícula: 210181054

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO UN PARAMETRO PARA DETERMINAR SU POTENCIAL COMO FUENTE DE MATERIAS PRIMAS PARA EL DESARROLLO DE AGENTES ANTITUMORALES"

Jurado

Dr. Normand García Hernández Presidente	- Dawing
Dra. Claudia Velázquez González Vocal	Many Hoping
Dra. Aída Solís Oba Secretario	adoleta

RESUMEN

Se determinó la CC₅₀ de ocho especies vegetales (*Hippocratea excelsa, Ibervillea sonorae, Asparagus setaceus, Asparagus sprengeri, A. densiflorus* var. Myers, *Schinus molle, Rubus coriifolius* y *Lepidium virginicum*); usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de cáncer, contra la línea celular U-937 y linfocitos humanos. De las ocho especies evaluadas, los extractos etanólicos de *Asparagus setaceus* (PA), *Schinus molle* (PA) y *Asparagus setaceus* (R), presentaron la mayor actividad citotóxica con 129, 172 y 182 μg/mL, respectivamente; al no haber diferencias entre ellas se recurrió al índice de selectividad (IS) como un parámetro para seleccionar al extracto etanólico de *Schinus molle* (IS = 1.47) para ser estudiada mediante un método fitoquímico biodirigido; como técnicas de separación y purificación se utilizaron la cromatografía de columna abierta y CLAR, lo que condujo a la identificación de dos compuestos de tipo flavonoide: rutina (9) y quercitrina (10).

Los compuestos identificados rutina y quercitrina presentaron actividad citotóxica en dosis de 10 μg/mL; con IS = 1.02 y IS = 1.22, respectivamente.

Como parte de esta investigación, también se evaluó la toxicidad aguda oral del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA), en ratas de ambos sexos de la cepa Sprague Dawley, resultando ser inocuo a los dosis probadas (0.5, 1 y 2 g/Kg). Finalmente se llevó a cabo un análisis de variación química estacional, el cual permitió determinar el porcentaje de la composición de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en las partes aéreas de *Schinus molle* en el ciclo de un año. La actividad citotóxica mostrada del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* en espirate con la inequidad y la composición química en exidencia.

Schinus molle en conjunto con la inocuidad y la composición química es evidencia farmacológica y fitoquímica que permite explicar en parte el uso de las hojas de Schinus molle en el tratamiento de cáncer, y proponerla como una candidata para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

AGRADECIMIENTOS

A la UAM y al excelente profesorado a quien debo y obtuve mi formación profesional, para forjar mi futuro para servir a mi país.

A el CONACYT por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría, número de becario 239988.

Al IMSS por el financiamiento de mi trabajo con título del protocolo: Evaluación citotóxica de plantas medicinales mexicanas como un parámetro para determinar su potencial como agentes antitumorales.

NÚMERO DE REGISTRO COMITÉ LOCAL: R-2010-3603-12

NÚMERO DE FINANCIAMIENTO FIS: FIS/IMSS/PROT/MD/11/1005

Al IMSS por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría, número de matrícula 99094858.

AGRADECIMIENTOS

A mi Comité tutoral:

Dr. Fernando Calzada Bermejo Dra. Carolina Barrientos Salcedo Dra. Aída Solís Oba

Por las valiosas aportaciones a este trabajo.

ÍNDICE		Página
Resumen		iv
Glosario		xi
Índice de	cuadros	xi
Índice de	diagramas	xi
Índice de	estructuras	xi
Índice de	figuras	xi
	gráficas	xi
	tablas	xii
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	2
2.1.	Generalidades del cáncer	2
2.2.	Clasificación del cáncer	2
2.3.	Factores de riesgo	4
2.4.	Incidencia mundial	5
2.4.1.	Incidencia específica	6
2.4.2.	Incidencia según la edad	7
2.4.3.	Incidencia según el sexo	9
2.4.4.	Incidencia según la raza	9
2.5.	Incidencia en México	10
2.6.	Métodos de control del cáncer	12
2.7.	Generalidades de las plantas objeto del estudio	15
2.7.1.	Hippocratea excelsa HBK	15

2.7.2.	Ibervillea sonorae Greene	18
2.7.3.	Schinus molle L	21
2.7.4.	Lepidium virginicum L	25
2.7.5.	Rubus coriifolius Focke	27
2.7.6.	Asparagus setaceus Kunth	29
2.7.7.	Asparagus Sprengeri Regel	30
2.7.8.	Asparagus densiflorus Myers	31
3.	JUSTIFICACIÓN	33
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
5.	OBJETIVO GENERAL	34
5.1.	OBJETIVOS PARTICULARES	34
6.	HIPÓTESIS	34
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1.	Recolección del Material vegetal	35
7.1.1.	Preparación de los extractos	36
7.2.	Ensayo biológico	36
7.2.1.	Determinación de la actividad citotóxica	36
7.2.2.	Líneas celulares empleadas	37
7.2.3.	Preparación de los extractos, fracciones y compuestos	
	puros	37
7.2.4.	Técnica de MTT	38
7.2.5.	Método estadístico	38
7.3.	Preparación del extracto etanólico de Schinus molle a	39
	gran escala	
7.4.	Obtención de los compuestos con actividad citotóxica del	
	extracto etanólico de las hojas de Schinus molle	39
7.4.1.	Extracción de Schinus molle	39
7.4.2.	Fraccionamiento de Schinus molle	39
7.4.3.	Identificación de los compuestos responsables de la	
	citotóxicidad	41

7.4.4.	Purificación de rutina y quercitrina	41
7.5.	Estudio de toxicidad aguda oral del extracto etanólico de	
	las hojas de Schinus molle	42
7.5.1.	Animales de laboratorio	43
7.5.2.	Dosificación de los extractos	43
8.	RESULTADOS	45
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
10.	CONCLUSIONES	59
11.	REFERENCIAS	60
ANEXO	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	70
A.1.	Identificación de rutina	70
A.1.1.	Identificación de quercitrina	71

GLOSARIO

DO₅₂₄ Absorbancia a 524 nm.

A.C.Sm Albert Charles Smith

AcOEt Acetato de etilo.

CGB Células gliales de Bergmann

CCF Cromatografía en capa fina

CLAR Cromatografía líquida de alto rendimiento

CC₅₀ Concentración a la cual se reduce al 50% la viabilidad de las

células empleadas.

CMI Concentración mínima inhibitoria

DMSO Dimetil sulfóxido

FP Fracción primaria

°C Grados centígrados

GLUT-1 Transportador de glucosa

GlucTP Glucotropeolina

IMSS Instituto Mexicano del Seguro Social

i.p. Vía de administración intraperitoneal

msnm Metros sobre el nivel del mar

μg/mL Microgramos por mililitro

mg Miligramos

mg/kg Miligramos por kilogramo

mL Mililitros

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 bromuro difeniltetrazolio.

NO Óxido nítrico

OMS Organización Mundial de la Salud

rpm Revoluciones por minuto

SDS Dodecil sulfato de sodio

UDPG Uridina-difosfato-glucosa

U937 Linfoma humano del tipo histiocítico difuso

ÍNDICE DE CUADROS

1.	Frecuencia de cáncer infantil por grupos de edad	8
2.	Compuestos antitumorales obtenidos de especies vegetales,	
	que actualmente son empleados en el tratamiento de cáncer	13
3.	Compuestos puros aislados del extracto etanólico de Schinus	
	molle (PA)	56
	ÍNDICE DE DIAGRAMAS	
1.	Obtención de los extractos etanólicos de ocho especies	
	vegetales	36
	ÍNDICE DE FIGURAS	
1.	Cápsulas de Hippocratea excelsa	15
2.	Frutos de Ibervillea sonorae	18
3.	Hojas y frutos de Schinus molle	21
4.	Flores de Lepidium virginicum	25
5.	Hojas de Rubus coriifolius	27
6.	Hojas de Asparagus setaceus	29
7.	Frutos de Asparagus sprengeri	30
8.	Hojas de Asparagus densiflorus Myers	31
9.	Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social	35
	ÍNDICE DE GRÁFICAS	
1.	Rangos de incidencia edad y sexo específicos por millón de	
	niños	8
2.	Incidencia de cáncer infantil	10
3.	Incidencia de cáncer infantil por sexo	10
4.	Incidencia de cáncer infantil por edad	11

5.	Actividad citotóxica de los extractos comprendidos en el grupo	
	uno	53
6.	Índice de selectividad de los extractos comprendidos en el	
	grupo uno	54
7.	Actividad citotóxica de las fracciones primarias	55
8.	Índice de selectividad de las fracciones primarias	55
9.	Variación en el contenido de los flavonoides rutina y quercitrina	
	presentes en el extracto etanólico de las hojas de Schinus	
	molle en el ciclo de un año	58
	ÍNDICE DE TABLAS	
1.	Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentajes de	
	atribución	5
2.	Incidencia mundial según el tipo de neoplasia (casos x 106)	7
3.	Incidencia de cáncer infantil	11
4.	Resumen del fraccionamiento primario del extracto etanólico	
	obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal Schinus	
	molle	40
5.	Composición de los agentes cromógenos utilizados para los	
	análisis cromatográficos en capa fina (CCF)	41
6.	Sistema de elusión utilizado en la CLAR para separar las	
	fracciones FP-8 y FP-10	42
7.	CC ₅₀ de los extractos etanólicos de las ocho especies	
	vegetales	44
8.	CC ₅₀ de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de las	
	hojas de Schinus molle	45
9.	CC ₅₀ de los compuestos puros obtenidos del extracto etanólico	
	de Schinus molle	45
10.	Pesos corporales de ratas macho, después de una única	
	administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas	

	de Schinus molle, al término de 14 días de	
	observación	46
11.	Pesos corporales de ratas hembra, después de una única	
	administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas	
	de Schinus molle, al término de 14 días de	
	observación	47
12.	Pesos de los órganos de ratas macho, después de una única	
	administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas	
	de Schinus molle, al término de 14 días de observación	48
13.	Pesos de los órganos de ratas hembra, después de una única	
1	administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas	
	de Schinus molle, al término de 14 días de observación	49
14.	Variación de los flavonoides rutina y quercitrina a lo largo de	
	un año	51

1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas para controlar o curar alguna enfermedad en el hombre, tiene sus orígenes en los albores de la humanidad, desde que aparecen registros o referencias fiables. El uso, se pone de manifiesto por la existencia de herbarios desde la época de los sumerios, los asirios, los babilonios y los fenicios. El Papiro de Ebers describe, el uso medicinal de 700 plantas, como el ajo y la adormidera. En China y el resto de Asia el uso de plantas para tratar enfermedades se remonta a más de 10,000 años. Los griegos y romanos fueron los primeros en sistematizar en Occidente, el estudio de las plantas medicinales. Así, Dioscórides, en su obra de Materia Médica, describe más de 600 plantas de uso medicinal [1]. En el caso de México destacan los códices aztecas Matritense, Florentino y el de la Cruz-Badiano, los cuales son una recopilación gráfica sobre la botánica y medicina tradicional mexicana utilizadas por los indios aztecas [2].

En la actualidad el uso de las plantas medicinales para el control, la cura y el tratamiento de enfermedades constituye un conocimiento que aún es transmitido de forma oral de generación en generación [3]. Se estima que aproximadamente del 64% al 80% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales para resolver sus problemas de salud [4].

En este sentido México cuenta con una extraordinaria riqueza vegetal, ubicándolo en el cuarto lugar en biodiversidad a nivel mundial; de 26,500 especies a cerca de 4,000 (15%) se les atribuyen propiedades medicinales, constituyendo el recurso más accesible para procurar la salud de grandes núcleos de la población mexicana [3].

A pesar del uso tan difundido de las plantas medicinales, los estudios químicos y farmacológicos dirigidos a la validación de las propiedades medicinales que se les atribuyen siguen siendo escasos; a nivel mundial se estima que solo el 5% de estas especies tienen estudios químicos y farmacológicos [5].

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del cáncer

Cáncer es un término genérico para referirse a un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. El cáncer es un padecimiento que es considerado un problema de salud pública mundial, por su letalidad, diversas manifestaciones clínicas y por la gran variedad de factores de riesgo que se le asocian, que incluyen genéticos y ambientales.

El cáncer se puede definir como una enfermedad en la que las células del cuerpo empiezan a crecer de manera anormal y pueden invadir zonas adyacentes para diseminarse a otros órganos. Este crecimiento anormal afecta el equilibrio del organismo y puede conducirlo hasta la muerte.

En el cáncer las células que están en constante división rompen los mecanismos que regulan el ciclo celular y se dividen sin control, transmitiendo esta característica a sus descendientes. La alta tasa de proliferación da origen a masas de tejidos denominados tumores. El tumor resultante cuyas células ahora presentan cambios estructurales, funcionales y pérdida de identidad tisular son capaces de invadir otros tejidos cercanos o lejanos (metástasis). Esta última etapa es la que invariablemente conduce a la muerte [6]. Las células cancerosas manifiestan, en grados variables, cuatro características que las distinguen de las células normales: proliferación incontrolada, desdiferenciación y pérdida de la función, invasividad y metástasis [7].

2.2. Clasificación del cáncer

Básicamente el cáncer se puede clasificar de acuerdo con tres características [8]:

- Su lugar de origen por ejemplo, de pulmón, de mama, de próstata, de colón, de recto, etc.
- 2. El tejido o célula del que proceden

- Los carcinomas son, con mucha diferencia, los más frecuentes. Los carcinomas se originan en los epitelios, que son los tejidos que revisten las cavidades y los conductos de cuerpo, además de la piel.
- Los sarcomas, que proceden del tejido conjuntivo y sus derivados. Como el tejido conjuntivo se encuentra en todo el cuerpo, estos tumores pueden aparecer en cualquier parte, aunque son poco frecuentes. Como ejemplos se pueden citar los sarcomas de hueso y los miosarcomas (procedentes del músculo).
- Los linfomas, que se derivan de los linfocitos y suelen surgir en los ganglios linfáticos. Las leucemias se producen en la médula ósea y comparten algunas características con los linfomas.
- Los melanomas son tumores que suelen surgir en la piel (aunque también en otras localizaciones), pero que son muy distintos de los carcinomas, tanto al microscopio como en su comportamiento, por lo que se les clasifica por separado.
- Los tumores del sistema nervioso central se clasifican también por separado. La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los gliomas, aunque, a pesar de ser poco frecuentes, la variedad es muy amplia.
- 3. Su extensión: En la mayoría de los tumores, para definir su extensión, se utiliza un sistema denominado TNM, el cual es topográfico y en su denominación se emplean las iniciales tumor (T), ganglio linfático (N: lymph Nodes) y metástasis (M). Se representa así la invasión tumoral que puede ser local (T), regional (N) y a distancia (M). Para un mismo tipo de tumor la invasión local (T) cursa con supervivencia mayor que la invasión regional (N) y ésta, a su vez, representa menor gravedad que la invasión a distancia (M) [9].
- 4. Por subgrupos: se realiza con números que van del I al IV. Estadio I: indica que el tumor es menor de 2 cm y no hay metástasis, el índice de supervivencia relativa a 5 años es del 98%. Estadio II: abarca las siguientes situaciones: 1) no mide más de 2 cm pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados, 2)

mide entre 2 y 5 cm y puede o no haberse extendido, 3) mide más de 5 cm pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados. El índice de supervivencia a 5 años es del 88-76%. Estadio III: se divide en estadio IIIA y IIIB: El estadio III A, puede integrar a las siguientes formas: 1) el tumor mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras, 2) el tumor mide más de 5 cm y los ganglios linfáticos axilares están afectados. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 56%. El estadio III B, puede darse en los siguientes casos: 1) el cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax), 2) El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 46%. Estadio IV: se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suele aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 16% [10].

2.3. Factores de riesgo

En general, el cáncer no se origina por una sola causa, sino que en su generación operan múltiples factores; por eso se dice que es una enfermedad multifactorial. Las causas del cáncer son de dos tipos: externas o internas. Las causas internas se conocen como una predisposición genética, lo que quiere decir que en ciertas familias se hereda un gen anormal que hace que sus miembros presenten una alta probabilidad de desarrollar cáncer. En la actualidad se sabe que la mayoría de los cánceres son ocasionados por causas externas, es decir, por exposiciones a sustancias químicas o a agentes físicos o biológicos que afectan a los genes de las células, transformándolas en cancerosas. En la tabla 1 se ilustran los diferentes factores de riesgo a los que se les atribuye el cáncer [11].

Tabla 1. Factores de riesgo asociados al cáncer y porcentajes de atribución [11].

Factores de riesgo	Porcentaje atribuido
Dieta	35
Consumo de cigarrillo	30
Infecciones	10
Rayos solares	3
Alcohol	3
Ocupación	4
Radiación	1
Contaminación	2
Medicamentos	1

2.4. Incidencia mundial

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se registran 10 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo de los cuales 250,000 son niños; el cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en niños de 1 a 14 años [12].

La distribución y los tipos de neoplasias en niños difieren de la de los adultos, con un rango entre 75 a 150 casos x 10⁶ niños/año [13,14]. En los años noventa, la tasa estándar de incidencia en función de la edad era de 140 por millón para los niños europeos de entre 0 y 14 años.

En los Estados Unidos la incidencia asciende a 137 millones en la población de raza blanca y a 121 en la de raza negra [14]; en Inglaterra a 109 [15]; en Francia a 137 [16] en Italia a 141 [15]; en Dinamarca a 138 [17]. En países en desarrollo, incluyendo los latinoamericanos se han notificado tasas de 45 millones, que hacen

sospechar un importante subregistro, que puede estar ocasionado por la carencia de accesibilidad a centros hospitalarios especializados, y el escaso desarrollo de los sistemas de registro institucionales y poblacionales [18, 19].

Las neoplasias malignas más frecuentes en los niños corresponden a leucemias y linfomas y a diferencia de la de los adultos tienden a tener períodos de latencia cortos, crecen rápidamente, son biológicamente muy agresivas y responden mejor a la quimioterapia [20].

En los menores de 15 años, el 92% son de tipo no epitelial y 8% de tipo epitelial; entre los 15 y 19 años ocurre una transición; de los 30 a los 45 años las de tipo epitelial alcanzan una frecuencia de 80%, y más tarde, de 90% [21].

El cáncer en los niños se divide en 12 grandes grupos: I) leucemias; II) linfomas y otras neoplasias reticuloendoteliales; III) tumores del sistema nervioso central; IV) tumores del sistema nervioso simpático; V) retinoblastoma; VI) tumores renales; VII) tumores hepáticos; VIII) tumores óseos; IX) tumores de los tejidos blandos; X) tumores de células germinales, trofoblásticas y otras células gonadales; XI) carcinomas y otras neoplasias epiteliales malignas, y XII) otras neoplasias malignas inespecíficas [22].

2.4.1. Incidencia específica

En un estudio que abarcó la colaboración de 50 países, se obtuvo la incidencia específica de las diferentes neoplasias. Cabe comentar que esta sufre variaciones de acuerdo al tipo cáncer, el país o región que se estudie (tabla 2). Se han informado diferentes patrones de presentación, entre los que destacan tres tipos principales 1) estadounidense/europeo, 2) latinoamericano y 3) africano. En el primero se encuentran en orden de frecuencia las leucemias, los tumores del sistema nervioso central y los linfomas. En el latinoamericano la mayor incidencia también corresponde a las leucemias, seguidas por los linfomas y los tumores del sistema nervioso central. En el africano predominan los linfomas [15].

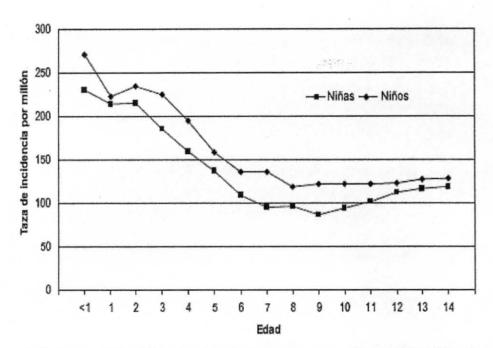
Tabla 2. Incidencia mundial según el tipo de neoplasia (casos x 106) [15].

Tipos de neoplasias	Tasa (variación de la incidencia a nivel mundial)	
Leucemias	15-50	
Linfomas Enfermedad de Hodgkin	2.7-14.8	
Linfomas no Hodgkin	2.7-14.5	
Tumores del sistema nervioso central	20-30	
Tumores de sistema nervioso simpático	3.1-12.6	
Retinoblastoma	3-5	
Tumores renales	6-9	
Tumores hepáticos	0.5-1.5	
Tumores óseos	2-3.5	
Tumores de los tejidos blandos	3-5	
Tumores de células germinales	0.5-5.8	
Carcinomas	0.5-2	
No especificados	0.5	

2.4.2. Incidencia según la edad

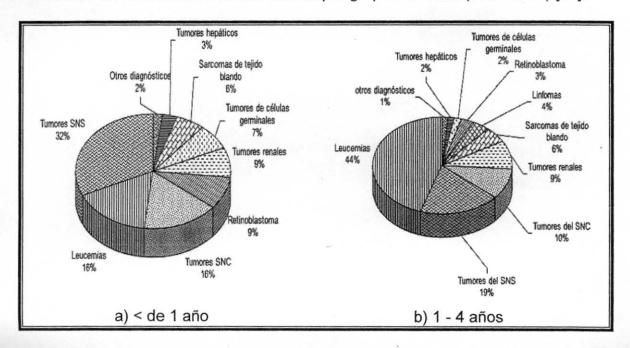
De acuerdo con las estadísticas mundiales, se considera que la incidencia es dos veces más frecuente en el grupo de menores de 5 años, que para el grupo de 5 a 14 años, (gráfica 1). Según la edad también difiere el patrón de presentación de las neoplasias. En los menores de un año predominan los tumores embrionarios (meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, tumor de Wilms y hepatoblastoma, principalmente). En el grupo de 1 a 4 años predomina la leucemia linfoide aguda; también son frecuentes los tumores renales, los tumores del sistema nervioso central y algunos linfomas. En el grupo de 5 a 9 años, nuevamente predominan las leucemias, aumentan los linfomas (entre los cuales predomina la enfermedad de Hodgkin) y se inicia la presentación de los tumores

óseos. En el grupo de 10 a 14 años continúa el predominio de las leucemias, pero aumenta la frecuencia de los linfomas y los tumores óseos, (cuadro 1) [23,24].

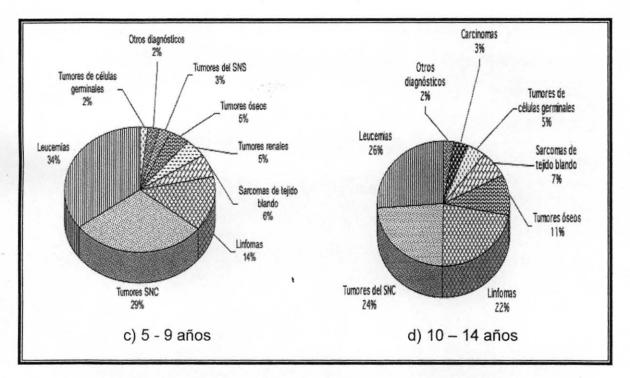


Gráfica 1. Rangos de incidencia de edad y sexo específicos por millón de niños (1998-2007) [24].





Cuadro 1. Frecuencia de cáncer infantil por grupos de edad (1998-2007) [24]. (Continuación).



2.4.3. Incidencia según el sexo

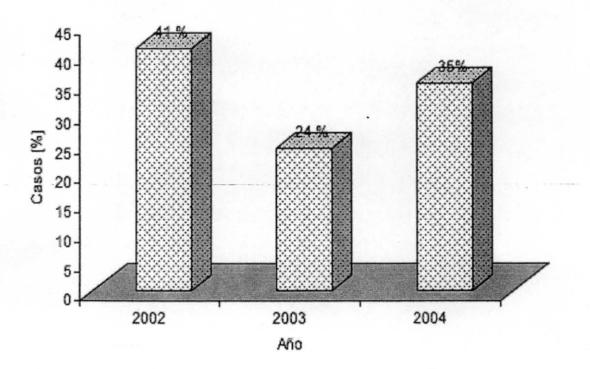
En referencia al sexo, la relación hombre: mujer es mayor de 1 (intervalo de 1.1 a 1.6) para el conjunto de todas las neoplasias, pero difiere según el tipo de neoplasia que se estudie. Así, por ejemplo, para los tumores renales como el tumor de Wilms y algunos tumores del Sistema Nervioso Central la relación es menor de 1 [23, 24].

2.4.4. Incidencia según la raza

Según registros obtenidos en Estados Unidos, la relación blanco: negro es mayor de 1 para el conjunto de las neoplasias, pero al igual que para el sexo, varía según la neoplasia: mayor de 1 para las leucemias, astrocitomas, linfomas, neuroblastoma, tumores hepáticos, óseos, de los tejidos blandos y los carcinomas; menor de 1 para el meduloblastoma, los gliomas, el retinoblastoma, el tumor de Wilms y los tumores de células germinales [23, 25].

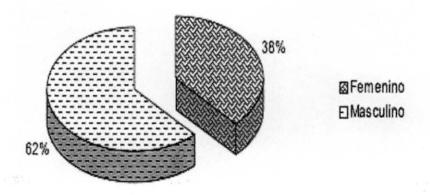
2.5. Incidencia en México

En el periodo del 2002-2004 un análisis retrospectivo [26], mostró que la incidencia promedio de cáncer infantil fue del 33%, (gráfica 2).



Gráfica 2. Incidencia de cáncer infantil.

En relación al género, el 62% de la población estudiada (654) pertenecía al sexo masculino, con una relación 1.6:1, (gráfica 3).

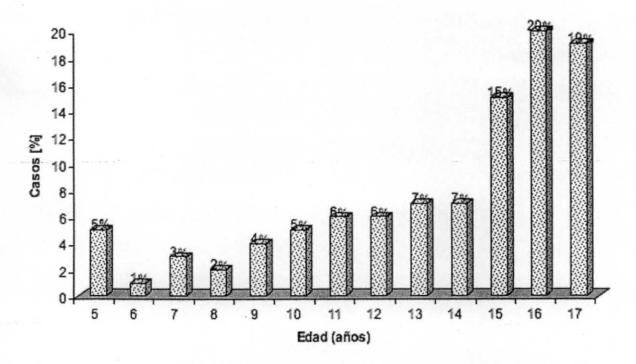


Gráfica 3. Incidencia de cáncer infantil por sexo en México (2002-2004) [26].

grand &

En cuanto a la edad, la gráfica 4 muestra que el grupo de edad comprendido de 15 a 17 años, mostró el mayor porcentaje de casos, con una incidencia promedio del 54%.

THE OWNER



Gráfica 4. Incidencia de cáncer infantil por edad en México (2002-2004) [26].

Con respecto al tipo de cáncer, las leucemias y los linfomas representaron el 40 y 7%, respectivamente de las neoplasias, (tabla 3).

Tabla 3. Incidencia de cáncer infantil [26].

TIPO DE CÁNCER	CASOS	%
Enfermedad de Hodgkin	8	1
Hepatoblastoma	3	0
Histiocitosis Maligna	1	0
Lesión de sitios contiguos	7	1
Leucemia	259	40

Tabla 3. Incidencia de cáncer infantil [26]. (Continuación).

Linfoma	44	7
Linfosarcoma	2	0
Mieloma múltiple	1	0
Sarcomas	12	2
Tumor de Burkitt	12	2
Otros	305	47
TOTAL	654	100

2.6. Métodos de control del cáncer

Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente, en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en que se encuentre el tumor.

En el caso de la quimioterapia, ésta es empleada como tratamiento principal cuando el tumor se encuentra en las etapas II, III y/o IV [27]. Esta estrategia consiste en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular. Los fármacos actuales son inespecíficos y agresivos ya que no sólo destruyen las células cancerosas sino que además afectan a las células sanas, lo que produce algunos efectos indeseables como caída del pelo, cansancio, pérdida de peso, náuseas, vómitos, mareo y debilidad, entre otros [7, 28-30]; por lo que la búsqueda de principios activos aislados de fuentes naturales como potenciales agentes quimioterapéuticos, continua vigente.

Una parte de la investigación en el desarrollo de estos fármacos, se enfoca a encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios [29]. En este contexto, las plantas han sido y seguirán siendo una posible alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos químicos que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos.

Algunos ejemplos de agentes antitumorales obtenidos de especies vegetales empleados actualmente en el tratamiento de cáncer son: 1) los alcaloides vincristina (1), vinblastina (2), y vindesina aislados de Catharanthus roseus, los cuales inhiben la mitosis en metafase uniéndose a la tubulina; son relativamente poco tóxicos, pero pueden causar efectos adversos neuromusculares; 2) taxanos, como paclitaxel (3) y docetaxel (4), aislados de la corteza de Taxus brevifolia, los cuales estabilizan los microtúbulos, inhibiendo la mitosis; los efectos adversos incluyen mielodepresión y neurotoxicidad acumulativa. Con docetaxel puede aparecer una retención de líquidos resistente (sobre todo edema en las piernas). Puede surgir una hipersensibilidad a ambos fármacos, que precisa un pretratamiento con corticoides y antihistamínicos. 3) El etopósido (5) y tenipósido (6) son dos glucósidos semisintéticos derivados de la epipodofilotoxina [31]. La epipodofilotoxina es un isómero de la podofilotoxina el cual fue aislado de las raíces de varias especies del género Podophyllum; estos compuestos inhiben la síntesis de ADN actuando sobre la topoisomerasa II y también inhiben la función mitocondrial. Los efectos adversos frecuentes comprenden vómitos, mielodepresión y alopecia, 4) camptotecinas, aislados de Camptotheca acuminata, como irinotecáno (7) y topotecáno (8), se unen a la topoisomerasa I y la inhiben. Se produce diarrea y mielodepresión reversible pero en general, estos fármacos producen menos efectos adversos que la mayoría de los demás antineoplásicos [7, 30-31].

Cuadro 2. Compuestos antitumorales obtenidos de especies vegetales, que actualmente son empleados en el tratamiento de cáncer.

Cuadro 2. Compuestos antitumorales obtenidos- de especies vegetales, que actualmente son empleados en el tratamiento de cáncer (Continuación).

2.7. Generalidades de las plantas objeto del estudio.

2.7.1. Hippocratea excelsa HBK

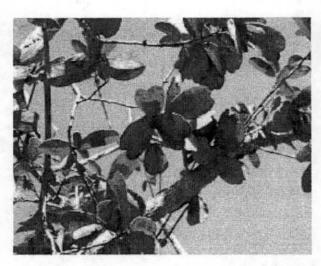


Figura 1. Cápsulas de Hippocratea excelsa.

La planta se conoce popularmente como cancerina, "mata piojo", "miseg-bat" (Oaxaca), "barajillo", "ixcate", "ixcate rojo", "acpatle", "temecaixpajtle", "mapiojos" (Guerrero y Puebla) "hierba del piojo" "zipche" (Chiapas) y palo de reguilete (Yucatán) [32]. Su nombre científico es *Hippocratea excelsa* Kunth (sinonimia: *Hemiangium excelsum* Kunth. A.C.Sm); pertenece a la familia Hippocrateaceae [33].

La cancerina es una planta trepadora leñosa que puede crecer hasta 10 m de altura, de tallos delgados, con hojas coriáceas, opuestas, elíptico oblongas, ásperas, crenado onduladas, angostándose hacia la base, de 7-7.5 cm, flores pequeñas amarillas con cinco pétalos (de 5 mm), fruto una cápsula dividido en tres (14 cm de diámetro), y semillas aladas de 4-5 cm de largo (8-14 semillas por fruto).

La cancerina es una planta endémica cuya distribución se encuentra restringida a Centroamérica [34]. En México se distribuye en el sur y sureste del país en los estados de Hidalgo, Puebla, Jalisco, Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca,

Chiapas, Campeche, Tabasco y Quintana Roo. Crece en selvas tropicales secas y semihúmedas desde el nivel del mar hasta los 1200 m, principalmente en vegetación de selva baja caducifolia (sbc).

En la medicina tradicional se considera útil para el tratamiento de diversas enfermedades: ginecológicas (hemorrágicas, infecciones uterina y amenorrea); infestaciones o infecciones de la piel (piojos, ectoparásitos y hongos), calvicie, gastrointestinanles (gastritis, úlcera de estómago y duodenal); respiratorias (tos); renales; y diferentes tipos de cáncer (de mama, estómago, pulmón e hígado) y óseas (artritis). Se le atribuyen efectos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antiinfecciosos [35].

Desde el punto de vista fitoquímico esta especie ha sido objeto de diversos estudios, los cuales han conducido al aislamiento de diversos compuestos.

Algunos compuestos que se han aislado de la corteza de la raíz y el tallo son los siguientes: canofinol, β -sitosterol, β -amirina, ácido canafólico, friedelina, pristimerina, celastridina, β -sitosterol-3-O-glucósido, emarginatina, epicatequina, hidroxifriedelina, hidroxitaraxerol, hidroxiglutinol, hidroxi-amirenona, dihidroxi-amirenona, trans-poli-isopreno, hippocrateina I y II [36-41].

En una investigación más reciente se aislaron de la corteza del tallo seis triterpenos pentacíclicos, cinco del tipo oleanano y uno del tipo ursano, fueron identificados como 1) 1 β , 21 β -dihidroxi-oleano-12-eno-3-ona, 2) 3 α , 11 α , 21 β -trihidroxi-oleano-12-eno, 3) 3 α , 21 β -dihidroxi-11 α -metoxi-oleano-12-eno, 4) 3 α , 21 β -dihidroxi-oleano-9 (11), 12-dieno, 5) 3 α ,21 β -dihidroxi-oleano-12-eno, 6) 3 α , 21 β -dihidroxi-11 α -metoxi-ursano-12-eno [42].

Desde el punto de vista farmacológico, los compuestos β-sitosterol-3-*O*-glucósido, β-sitosterol y epicatequina (-); han mostrado un efecto gastroprotector en modelos murinos de 93.4, 85.7 y 72.1%, respectivamente, en comparación con subsalicilato de bismuto, el cual mostró un efecto gastroprotector de 46.2% [43].

La hippocrateina I mostró actividad moderada en la prueba de letalidad de *Artemia salina*, con una DL₅₀ = 212 μ g/mL, y actividad citotóxica frente a la línea celular 9PS (carcinoma de nasofaringe humano), DE₅₀ = 1.85 x 10⁻¹ μ g/mL [44].

El extracto etanólico obtenido de la corteza de *Hippocratea excelsa* se evaluó en diferentes modelos para determinar su potencial antiinflamatorio. En el modelo de edema subplantar inducido con carragenina, el extracto se administró a ratas Wistar macho y ratones de la cepa CD1 a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg, encontrándose inhibición de la inflamación (29.7%) en ratones significativa a la dosis de 100 mg/kg, mientras que en el caso de las ratas las dosis de 50 y 100 mg/kg fueron significativas con porcentajes de inhibición de la inflamación de 32.2 y 35.5%; respectivamente.

En el modelo de inflamación por granuloma inducido con algodón, el extracto se administró a ratas Wistar macho a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg, la dosis de 100 mg/kg fue significativa con 22.4% de inhibición [45].

En el modelo de artritis inducida con formaldehído: el extracto etanólico administrado a la dosis de 100 mg/kg en ratas macho Wistar mostró un porcentaje de inhibición significativo de 36.3% [45].

En el modelo de lisis de eritrocitos inducida con calor, el extracto etanólico administrado a una dosis de 100 μg/mL mostró un porcentaje de inhibición de 48.7% en comparación con indometacina (53.1%) [45].

En otra investigación el compuesto pristimerina III aislada de la corteza demostró actividad antiprotozoaria contra *Giardia lamblia* con $CI_{50} = 0.11 \mu M$ en comparación con metronidazol $CI_{50} = 1.23 \mu M$ [46].

En un estudio de toxicidad aguda en ratones de la cepa ICR (Región de impresión controlada), el extracto [MeOH–CH₂Cl₂ (1:1)] de la raíz de *Hippocratea excelsa* se evaluó a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg; mostrando ser altamente tóxico con una DL_{50} = 605 mg/kg [47].

Los extractos metanólico y acuoso obtenidos de la raíz de *Hippocratea excelsa* se evaluaron en ratas macho Sprague Dawley a la dosis de 300 mg/kg para determinar su actividad antisecretora con el modelo de secreción inducida con la tóxina del cólera y demostraron un potencial de inhibición de 80.3 y 75%; respectivamente [48].

Diversos extractos obtenidos a partir de la corteza de la raíz de Hippocratea excelsa mostraron propiedad insecticida contra Sitophilus zeamais con 68% de

inhibición en el caso del extracto acuoso, 68% en el caso del extracto de éter de petróleo y 55.7% para el extracto de diclorometano [49].

2.7.2. Ibervillea sonorae Greene



Figura 2. Frutos de Ibervillea sonorae.

Ibervillea sonorae es una planta dioica perenne, se conoce popularmente como "guareque" o "wereke". Su nombre científico es Ibervillea sonorae Greene (sinonimia: Maximowiczia sonorae S.Watson); pertenece a la familia Cucurbitaceae [50].

Ibervillea sonorae es una enredadera y/o bejuco perenne de 3-4 m, son plantas dicotiledóneas, de fruto carnoso de forma redonda y alargada, de cáscara gruesa, rugosa o lisa, y están compuestas por un sistema radicular el cual consta de una raíz principal y algunas raíces secundarias, poseen un tallo herbáceo y velloso, sus flores son generalmente unisexuales y de color amarillo y el fruto es una baya grande de pulpa suave y cáscara dura [51].

Se localiza en zonas semiáridas de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California. Algunos grupos étnicos usan la raíz para múltiples propósitos: antirreumático, antiinflamatorio, analgésico, enfermedades cardiacas, se dice que es efectiva para curar el cáncer y auxiliar en el tratamiento de la diabetes.

Un estudio fitoquímico, permitió aislar una mezcla de once monoglicéridos a partir

del tubérculo de *Ibervillea sonorae* (1-monopalmitina, 1-monomargarato de glicerilo, 1-monostearina, 1-mononadecilato de glicerilo, 1-monoaraquidato de, glicerilo, 1-monobehenato, 1-monotricosanoato de glicerilo, 1-monotetracosanoato de glicerilo, 1-monopentacosanoato de glicerilo, 1- monohexacosanoato y 1-monoctacosanoato de glicerilo) [52].

En otra investigación se aislaron las curcubitacinas kinoina A, kinoina B y kinoina C [53].

En una investigación farmacológica los extractos de hexano, diclorometano, metanol y acuoso de la raíz de guareque, se administraron vía oral, a las dosis de 150, 300 y 600 mg/Kg/día en ratones macho knock out de la cepa ICR, sanos e hiperlipémicos inducidos con tiloxapol (administración ip: 400 mg/kg) durante 28 días para determinar su actividad hipolipemiante e hipoglucemiante.

Con respecto a la actividad hipoglucemiante, los extractos de guareque tendieron a incrementar los niveles de glucosa a las dosis de 300 y 600 mg/kg/día; sin embargo fue destacable el efecto toxicológico que mostraron los extractos de diclorometano, acuoso y metanol ya que los animales presentaron diarrea severa, deshidratación, pelo erizado así como alteraciones en la conducta, espasmos y dificultad para respirar, incluso algunos presentaron convulsiones y finalmente la muerte. Los extractos acuoso y metanólico mostraron una letalidad del 37-50% y del 50-100%, respectivamente.

También se evaluaron las enzimas transaminasa glutámico oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica y fosfatasa alcalina; como indicadores de lesión hepatocelular, en el que los extractos mostraron un comportamiento según su polaridad; los extractos acuosos presentaron una tendencia a disminuir los niveles de dichas enzimas, mientras que los extractos obtenidos con metanol y diclorometano tendieron a incrementar estos valores [54].

En otra investigación se reportó que tanto la preparación tradicional (extracto acuoso) y el extracto crudo (jugo) de la raíz de *lbervillea sonorae* mostraron el mismo efecto en reducción de la glicemia en ratones machos sanos de la cepa CD-1; tras la administración vía ip. a las dosis de 300 y 600 mg /kg; también se obtuvo el extracto de diclorometano de la raíz y se administró a ratones macho de

la cepa CD-1 diabéticos inducidos con aloxán a las dosis de 300 y 600 mg/kg vía ip., lo que produjo una disminución en los niveles de glucosa, pero también se presentaron síntomas de hipoglucemia severa incluyendo convulsiones generalizadas y muerte subsecuente de todos los animales en experimentación. En otro estudio el extracto de diclorometano administrado diariamente vía oral a la dosis de 300 mg/kg durante seis semanas en ratas macho (Wistar) diabéticas inducidas con aloxán, produjo aumento del peso corporal y redujo significativamente la glucemia, mostrando mejoría en los animales diabéticos en comparación con los grupos control [55].

En otro trabajo se obtuvieron cuatro extractos acuosos a partir de la raíz seca de *Ibervillea sonorae* por medio de 2 métodos (maceración e infusión y la deshidratación de los extractos se llevó a cabo por 2 procesos, secado por aspersión y liofilización, una vez que se obtuvieron los extractos, se determinaron las constantes cinéticas (Km y Vmax) del transporte de glucosa en un modelo *in vitro* (células gliales de Bergmann, CGB), con el objetivo de elucidar el tipo de transportador de glucosa presente. Obteniéndose los valores de Km ≈ 5.828 mM y una Vmax ≈ 42.32 mM, con estos valores con se infirió que GLUT-1 es el transportador implicado en el ingreso de la glucosa a este sistema.

También se determinó el efecto de los extractos en el transporte de glucosa en CGB para lo cual se utilizaron a las concentraciones de 0.01 a 1% (p/v).

Los extractos obtenidos por liofilización infusión liofilizado y maceración liofilizado mostraron la mayor actividad con 283.4% y 665.5%; respectivamente a la dosis de 0.01% p/v; mientras que los extractos obtenidos por secado por aspersión infusión secado por aspersión y maceración secado por aspersión mostraron actividades similares con 77% y 99.1%; respectivamente a la dosis de 0.1% p/v.

Por otro lado se determinó la dosis letal 50, de los extractos en un modelo *in vivo*, en ratones de la cepa CD-1 (*Mus musculus*) para lo cual lo extractos se administraron a las dosis de 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 mg/kg via ip; los extractos se consideraron ligeramente tóxicos con los siguientes valores de DL₅₀: Infusión secado por aspersión (1140.03 mg/kg), infusión liofilizado (1061.18 mg/kg); maceración secado por aspersión (1173.02mg/kg) y maceración liofilizado

(963.026 mg/kg).

Finalmente para la determinación del efecto hipoglucémico en ratas Wistar sólo se utilizó el extracto de maceración liofilizado, considerando su baja toxicidad; encontrándose que la dosis de 400 mg/kg ejerció el mayor efecto hipoglucémico en comparación con las dosis de 100 y 200 mg/kg de peso [56].

En un estudio de toxicidad, el extracto acuoso obtenido a partir del tubérculo de *Ibervillea sonorae* obtuvo una $DE_{50} = 4.25 \mu g/mL$; en la línea celular T47D (carcinoma de mama) [57].

2.7.3. Schinus molle L.



Figura 3. Hojas y frutos de Schinus molle.

Popularmente se conoce con los nombres de árbol de Perú, bolilla, Perú, pirú. preconcuahuitl (Guerrero); copalquahuitl (Morelos); yag lachi (Oaxaca); ntaka (Puebla). Su nombre científico es *Schinus molle* L (sinonimia: *Guatteria grandiflora* Donn. A.C.Sm.); pertenece a la familia Anacardiaceae [58].

Schinus molle es un árbol perennifolio, de 4 m a 8 m de altura, pero puede alcanzar hasta los 15 m, con un diámetro de 25 cm a 35 cm, de copa redondeada y abierta. Hojas compuestas, alternas, de 15 cm a 30 cm de largo, colgantes, con savia lechosa; imparipinnadas, de 15 a 41 folículos, generalmente apareados.

Tronco nudoso, ramas flexibles, colgantes y abiertas; corteza rugosa, fisurada,

color pardo oscuro. Flores en panículas axilares en las hojas terminales, de 10 a 15 cm de largo, pequeñas y numerosas, de color amarillento. El fruto es un drupa en racimos colgantes, cada uno de 5 mm a 9 mm de diámetro, rosados o rojizos, mesocarpo delgado y resinoso, contiene una o dos semillas. Las semillas poseen un embrión bien diferenciado que llena toda la cavidad; la testa y endospermo son delgados [59].

Schinus molle es propio de las regiones cálidas y secas de Sudamérica. Vive en las laderas occidentales de la región interandina, vertientes occidentales de los andes peruanos, en la costa y en los valles. Su límite superior se encuentra en el centro y sur del Perú alrededor de 3500 msnm., aunque se extiende de Ecuador a Chile y Bolivia. Ampliamente distribuido en México, en Centroamérica y en el sur de California y oeste de Texas, en Estados Unidos. En México se ha registrado en Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas [60].

Todas las partes del árbol son utilizadas en medicina tradicional; las hojas y corteza son utilizadas como cicatrizantes y astringentes en afecciones diversas de la piel, y como antiinflamatorias en general y antirreumáticas. La corteza del tronco produce un exudado resinoso muy aromático utilizado en el tratamiento de tumores locales y verrugas. Las bayas desecadas se utilizan como sustitutas de la pimienta y las hojas como colorante. En América los frutos macerados en almíbar o vinagre se emplean en la preparación de diferentes bebidas para el tratamiento de procesos inflamatorios, como afecciones reumáticas y patologías inflamatorias de la piel [61].

La composición química de *Schinus molle* varía en función del órgano o parte de la planta [62]. Los frutos contienen aceite esencial (3 a 5%) donde predominan componentes como α - β -felandreno, β -espatuleno, D-limoneno, silvestreno, α - β -pineno, perillaldehído, carvacrol, mirceno, canfeno, ρ -etil-fenol, ρ -cimeno y ρ -cimol Las hojas contienen entre 0.2 y 1% de aceite esencial (con predominio de felandreno y carvacrol), flavonoides (miricetina, quercetina y camperol). Las

semillas secas contienen aproximadamente un 8% de proteínas y un 10% de lípidos. Los frutos contienen una oleoresina de la que se han aislado los ácidos isomasticadienonico, isomasticadienonalico, masticadienonico, 3-epi-isomasticadienolalico y 3-epi-isomasticadienolalico [63].

El aceite esencial obtenido a partir de las hojas y los frutos maduros e inmaduros de *Schinus molle* se evaluó a las dosis de 35, 70 y 176 μg/cm² contra *B. cereus*, *M. luteus*, *S. aureus* resistente a metacilina, *S. aureus*, *E. feacalis*, *E. coli* 0157:H7, *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, para determinar su actividad antimicrobiana; así mismo fueron probados contra la especie de cucaracha *Blatta orientalis* L, a las dosis de 0.025, 0.05 y 0.075 mg/L, para determinar su actividad repelente.

La CMI fue de 2 mg/mL en el caso de *E. coli* 0157, *B. cereus* y *S. aureus*, CMI de 4 mg/mL para *S. aureus* y *M. Luteus* y CMI de 8 mg/mL para *E. coli*. El aceite esencial obtenido de los frutos inmaduros no presento actividad antimicrobiana significativa, mientras que el aceite obtenido de los frutos maduros produjo una CMI de 4 mg/mL para *E. coli* 0157 y de 8 mg/mL para *E. coli*.

El extracto de hexano obtenido a partir de las hojas mostró una CMI = 0.03 mg/L para *E. coli* 0157; mientras que los extractos obtenidos tanto de los frutos maduros como inmaduros presentaron valores de CMI menores.

La mayor actividad repelente contra las cucarachas adultas la obtuvo el aceite esencial obtenido de las hojas, mostrando la misma actividad que N,N dietil-m-toluamida; en ambos casos la actividad parece ser dosis dependiente [64].

En otra investigación se evaluó la actividad citotóxica del extracto de metanol obtenido a partir de la corteza y las hojas de *Schinus* frente a células Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano), mostrando una $Cl_{50} = 50$ mg/mL; el efecto parece ser dosis dependiente [65]; en dos investigaciones recientes se evaluó la actividad citotóxica del aceite esencial obtenido de los frutos de *Schinus molle* sobre la línea celular de MCF7 (cáncer de mama), mostrando una $Cl_{50} = 54$ +/- 10 mg/L [66].

El aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *Schinus molle* se evaluó contra la línea celular K562 (humana leucemia) mostrando una $DL_{50} = 78.7 \,\mu\text{g/mL}$ [67]. El extracto de hexano obtenido a partir de las hojas de *Schinus molle*, se evaluó

en el modelo de suspensión de la cola en ratones macho de la cepa Swiss a_las dosis de 30-600 mg/Kg vía oral, demostrando una reducción del tiempo de inmovilización de hasta un 50% a la dosis de 100 mg/kg; el efecto parece depender de su interacción con los sistemas serotonérgico, noradrenérgico y dopaminérgico [68]. En otra investigación el flavonoide rutina aislado del extracto etanólico de *Schinus molle* se administró a las dosis de 0.3-10 mg/kg vía oral en la prueba de nado forzado y a las dosis de 0.01-10 mg/kg en la prueba de suspensión de la cola en ratones macho de la cepa Swiss; los resultados mostraron que la rutina no produjo un efecto significativo en el tiempo de inmovilización en la prueba de nado forzado; sin embargo la rutina administrada a las dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg disminuyó significativamente el tiempo de inmovilización en la prueba de suspensión de la cola en un 30, 22.1 y 32.5%; respectivamente. Los resultados parecen indicar que la presencia de rutina ejerce un efecto antidepresivo al incrementar la biodisponibilidad de serotonina y noradrenalina en la hendidura sináptica [69].

También, se han demostrado las propiedades relajantes de músculo liso *in vitro*. A dosis de 100 mg/mL el extracto diclorometano de las hojas redujo las contracciones inducidas por serotonina e histamina en útero de rata, y las contracciones inducidas por acetilcolina en duodeno aislado de rata. A dosis inferiores (10 mg/mL) el extracto sólo fue efectivo frente a contracciones inducidas por serotonina e histamina [70].

En otras investigaciones se han determinado las consecuencias de la exposición subcrónica de los extractos etanólicos obtenidos a partir de los frutos y las hojas de *Schinus molle* en ratones de la cepa CF1; los extractos se agregaron en la dieta diaria a razón de 1 g/kg de peso durante 90 días. El extracto de las hojas produjo un aumento de la actividad motora en hembras, así como un aumento de la cantidad de orina en los machos. Por su parte el extracto de los frutos aumentó la cantidad de neutrófilos y redujo la cuenta de linfocitos y los niveles de colesterol en las hembras [71].

En otro estudio se evaluaron la toxicidad aguda y sub aguda del extracto etanólico de los frutos de Schinus molle en ratas macho Wistar. Para el ensayo de toxicidad

aguda el extracto se agregó a la dieta a razón de 2 g/Kg durante un día, mientras que para el ensayo de toxicidad sub aguda el extracto se agregó a la dieta a razón de 1 g/kg de peso durante 14 días. Ambos extractos aumentaron el nivel de excitación de los animales [72].

2.7.4. Lepidium virginicum L

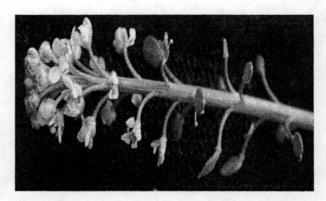


Figura 4. Flores de Lepidium virginicum

Los nombres comunes por los que se conoce a esta especie son *chilacaquilitl* (quelite delgado colorado); ajonjolillo, chilillo, cola de zorrillo, cupapayo, hierba del pajarito, lentejuela, mastuerzo, pepita, pierna de vieja, verbena; *yo- hi* (Estado de México); *kuitiski* (Michoacán),; *mexixi*, *meshishi*, *mishishi* (Morelos); *yuku kue eni*, *yuku ndk* (Oaxaca). La especie *Lepidium virginicum* pertenece a la familia Brassicaceae [73].

Lepidium virginicum es una maleza que mide de 20 a 60 cm de alto, con la superficie pubescente, hojas basales aserradas, pinatífidas o pinadas; las superiores lanceoladas o linearlanceoladas, aserradas, flores en racimos terminales, frutos lenticulares, ovales, de unos 2 mm [74].

Se trata de una especie de hábito arvense, común en bosques de junípero, de pino-encino y de otras coníferas. Su distribución abarca Norte y Centroamérica: Canadá, Estados Unidos (principalmente California y Florida), México, Panamá y Guatemala. En México se ha reportado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán,

Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán [75]. Su rango de altitud, aunque variable se encuentra preferentemente en zonas soleadas entre los 1800 y 3100 m. La enfermedad para la que se utiliza con más frecuencia esta planta, es para la diarrea así como otros padecimientos digestivos como la disentería, dolor de estómago, flatulencia, cólicos gastrointestinales, para "niños enlechados", vómito, inflación de estómago, indigestión, cólicos de bebés (cólico del recién nacido), "abotigamiento", empacho, amibas, lombrices intestinales y como purgante. En Quintana Roo y Yucatán se usa exclusivamente cuando se padece de catarro, asma o tos [75].

A partir de *Lepidium virginicum* se aislaron los compuestos benciltiocianato y fenilacetonitrilo [76].

Desde el punto de vista farmacológico, se ha demostrado que el extracto metanólico de la planta entera mostró actividad antiprotozoaria contra los trofozoitos de *E. histolytica* y de *G. lamblia* con CI_{50} = 105.05 y de 61.30 μ g/mL, respectivamente [77].

Recientemente se reportó el aislamiento del glucotropeolina (GlucTP) a partir del extracto metanólico de la raíz el cual fue activo contra E. histolytica con $CI_{50} = 20.39 \,\mu\text{g/mL}$ [78].

En otra investigación, se obtuvo el extracto clorofórmico de las partes aéreas de Lepidium virginicum y se midió su efecto sobre la contractilidad espontánea de yeyuno de conejo *in vitro*, mostrando una $Cl_{50} = 316 \ \mu g/mL$ [79].

Se determinó la actividad citotóxica del extracto etanólico de las hojas de Lepidium virginicum, sobre la línea celular humana de carcinoma de pulmón A549 y se encontró una CC₅₀ > 100 μg/mL [80].

En una investigación más reciente se obtuvieron los extractos metanólico y acuoso a partir de la raíz de *Lepidium virginicum* y fueron evaluados para determinar su actividad antiestrés utilizando la prueba de Porsolt (nado forzado). Los extractos se administraron a las dosis de 1.25 y 12.5 g/kg diariamente durante cinco días en ratones de la cepa Swiss; los extractos mostraron la mayor actividad antiestrés a

la dosis de 1.25 g/Kg reduciendo los tiempos de inmovilización hasta en un 50% con respecto a los grupos control [81].

2.7.5. Rubus coriifolius Focke

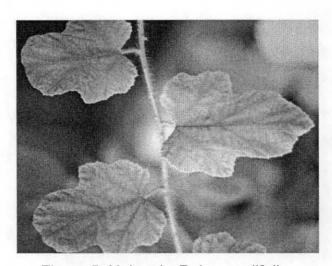


Figura 5. Hojas de Rubus coriifolius

Rubus coriifolius es conocida con los nombres de zarzamoras, frambuesas, "Situni", "Coatlamiti" y "Makum". Los indígenas tzetzales conocen a Rubus coriifolius con los nombres de "MakVm", Tzajal makum, Pili sat makum y Makum"; pertenece a la familia Rosaceae.

Rubus coriifolius es una enredadera con tallos de 10 m de largo, sus ramas están llenas de espinas, sus hojas son alternadas de cinco hojuelas que se extienden a lo largo (5 a 10 cm) y ancho (3 a 5 cm) del tallo, sus flores son usualmente perfectas racemosas, de color blanco o rosa, el fruto esta constituido por numerosas esferas que nacen de un receptáculo y su color va del rojo al negro, es oblongo de 2.5 cm de largo y 1 cm de ancho.

Rubus coriifolius se encuentra distribuida desde México hasta Guatemala. En México se le localiza en los estados de Michoacán, Veracruz, Morelos y Chiapas. En este último estado la especie crece en las cañadas, en las montañas con clima lluvioso y en los bosques de pinos en zonas de climas templados a 1500-2400 m sobre el nivel del mar [82-83].

Los indígenas tzetzales utilizan la raíz para tratar la diarrea con sangre, la planta entera contra la diarrea y la hoja contra la tos. La especie se utiliza con menos frecuencia para el vómito, la debilidad, la infección de dientes y garganta [84-85]. Del extracto de las partes aéreas de *Rubus coriifolius* se han aislado epicatequina, (+)- catequina, hiperina, nigaichigódiso F1, β-sitosterol 3-O-β-d-glucopiranósido, ácido gálico y ácido elágico [86].

Estudios farmacológicos del extracto metanólico de *Rubus coriifolius* han demostrado sus propiedades antiprotozoarias contra *E. histolytica* y *G. lamblia* con Cl₅₀ de 72.42 μg/mL y de 77.82 μg/mL, respectivamente [87].

En otra investigación se obtuvo el extracto metanólico y se evaluó para determinar sus propiedades antiprotozoarias, para lo cual el extracto fue administrado a las dosis de 1.25-20 mg/kg en ratones hembra de la cepa CD-1 infectados con trofozoitos de *G. lamblia*, demostrando una DE₅₀= 0.506 mg/kg en comparación a metronidazol y emetina con DE₅₀= 0.194 y 0.167 mg/kg, respectivamente [88].

En otra investigación el compuesto epicatequina aislado a partir de Rubus demostró propiedades antiprotozoarias contra G. lamblia con $DE_{50} = 0.072 \ \mu mol/kg [89].$

Del extracto etanólico de las partes aéreas de *Rubus coriifolius* se determino su capacidad de activar macrófagos humanos con producción de óxido nítrico, utilizando la técnica de Greiss; se observó una fuerte estimulación de producción de nitritos de hasta un 40%, a concentraciones desde 18 µg del extracto [90].

En otra investigación se obtuvo el extracto metanólico de las partes aéreas de Rubus coriifolius y se evaluó en el modelo de edema inducido con carragenina para determinar su actividad antiinflamatoria; el extracto fue administrado a una dosis de 400 mg/kg vía intraperitoneal en ratas macho Sprague Dawley, demostrando una inhibición de hasta un 85.8% y el 89.7% en la primera y segunda fase del edema, respectivamente [91].

2.7.6. Asparagus setaceus Kunth

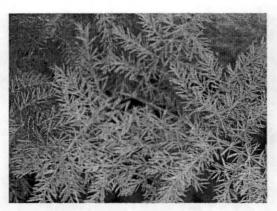


Figura 6. Hojas de Asparagus setaceus

Se conoce popularmente como helecho plumoso, espuma de mar. Su nombre científico es Asparagus setaceus (sinonimia: Asparagopsis setacea Kunth, Asparagus plumosus Baker, Protasparagus plumosus (Baker) Oberm, Protasparagus setaceus (Kunth) Oberm.) es una planta de la familia Asparagaceae.

Es una planta trepadora, perennifolia, de tallo muy ramificado y hojas aciculares que se ubican en el mismo plano que las ramas laterales, lo cual les da un aspecto de fronde de helecho. Los frutos son bayas que son tóxicas y no deben comerse.

Es nativa de África del Sur, pero en otros lugares se cultiva como planta ornamental [92].

En la medicina tradicional se utilizan las hojas y la raíz para tratar problemas de micción [93].

A partir del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Asparagus plumosus*, se aislaron tres glucósidos de espirostanol: 1) 3-*O*-[{ α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 3)}- β -D-glucopiranosil]-(25*S*)-espiro-5-en-3 β -ol, 2) 3-*O*-[{ α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)} { α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 3)}- β -D-glucopiranosil]-(25*S*)-espiro-5-en-3 β -ol y 3) 3-*O*-[{ β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)} { α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)}- β -D- glucopiranosil]-(25*S*)-espiro-5-en-3 β -ol [94].

Desde el punto de vista farmacológico esta especie sólo ha sido objeto de un estudio en el que se obtuvo la enzima glicosil transferasa dependiente de UDPG

(uridina-difosfato-glucosa) a partir de las fracciones membranal y citosólica de los brotes de *Asparagus plumosus* y fue evaluada para determinar su capacidad catalítica sobre sitosterol y yamogenina en presencia del activador Tritón X-100 a las dosis de 0.1-0.5 %; encontrándose que el detergente estimuló fuertemente la actividad de la glicosil transferasa obtenida de la fracción membranal en el caso de sitosterol obteniendo el mayor porcentaje de glicosilación (400%) a la dosis de 0.1 % de tritón; por su parte la enzima obtenida a partir de la fracción citosólica causo un porcentaje de glicosilación del 200 % a la dosis de 0.1% del detergente. Las enzimas obtenidas de ambas fracciones no se vieron estimuladas por la adición del detergente a ninguna de las dosis, en el caso de yamogenina [95].

2.7.7. Asparagus sprengeri Regel



Figura 7. Frutos de Asparagus sprengeri

Es comúnmente denominada esparraguera africana, pertenece a la familia Asparagaceae. Es una hierba perenne de porte colgante, tallos arqueados (de hasta 60 cm) y hojas (cladodios) rígidas, aplanadas, lineares y muy mucronadas. Las flores son muy pequeñas, perfumadas, de color blanco o verde y dispuestas en racimos. Los frutos tienen forma de bayas rojas brillantes y cada una de ellas tiene una larga semilla negra en su interior [96].

A partir del extracto metanólico obtenido de la raíz de *Asparagus sprengeri*, se aislaron cuatro espirostanósidos de diosgenina: 1) $3-O-[\beta-D-xylo-(1\rightarrow 4)-\beta-D-xylo-(1\rightarrow 4)-\beta-$

gluco]-(25R)-espiro-5-en-3 β -ol; 2) 3-O-[α -L-ramno-(1 \rightarrow 6)- β -Dgluco]-(25R)-espiro-5-en-3 β -ol; 3) 3-O-{ [α -L-ramno-(1 \rightarrow 2)] [β -D-xylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-gluco}-(25R)-espiro-5-en-3 β -ol y 4) 3-O-{ [α -L-ramno-(1 \rightarrow 2)] [α -L-ramno-(1 \rightarrow 6)]- β -D-gluco}-(25R)-espiro-5-en-3 β -ol [97]; [dos espirostanósidos monodesmosídios y un glicósido de furostanol bisdesmosídico: 1) (25R)-3 β -hidroxi-5 β -espirostano-12-ona 3-O-{ β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranósido}; 2) (25R)-5 β -espirostano-3 β -ol 3-O-{ β -D-glucopiranosil-(1 4 2)-[α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranósido}; 3) 26-O- β -D-glucopiranosil]-22 α -metoxi-(25R)-furostano-3 β ,26-diol 3-O-{ β -D-glucopiranosil-(1 2)-[β -D glucopyranoside}, a partir del extracto metanólico de la raíz [98] y la saponina diosgenina [99].

En una investigación la planta de *Asparagus sprengeri*, se evaluó para determinar su capacidad de fitoremediación en suelos contaminados con arsénico, para lo cual la planta se colocó en medios hidropónicos, encontrándose que es tolerante a arsénico con factores de bioacumulación < 10; sin embargo no fue considerada una candidata potencial para la fitorremediación de arsénico [100].

2.7.8. Asparagus densiflorus Myers



Figura 8. Hojas de Asparagus densiflorus Myers

Es comúnmente denominada esparraguera de jardín, pertenece a la familia Asparagaceae. Es una planta perenne de color verde que puede alcanzar los 50

cm de altura. No soporta las heladas y habita en climas cálidos. La variedad "Myers" presenta largos y finos tallos flexibles de los cuales surgen hojas en forma de agujas. Cuando llega a la madurez genera flores de color blanco-rosadas, dando lugar a pequeños frutos redondeados de color rojo. Es originaria del sur de África [101-102].

Esta especie no ha sido objeto de estudio desde el punto de vista fitoquímico; desde el punto de vista farmacológico la especie sólo ha sido objeto de un estudio en el cual se evaluó su capacidad de resistencia a *Fusarium oxysporum*, para lo cual la raíz fue inoculada con el patógeno y se determinó la muerte de las células epidérmicas así como la actividad peroxidasa y la actividad fenilalanina amonioliasa como mecanismos de defensa, durante ocho semanas.

A. densiflorus var. Myers, mostró una respuesta hipersensible después de la inoculación; a las ocho horas se observó muerte de las células epidermales de la raíz en un 2-6 % y se incrementó de 9-15% en 24 hrs, no se encontraron hifas fúngicas en las células adyacentes a las que ya habían muerto, indicando que la respuesta hipersensible previene el crecimiento y la esparción de los patógenos al tejido sano.

La actividad peroxidasa aumentó hasta ocho veces a las ocho horas después de la inoculación y disminuyó en un 350% a los 2 días, a partir del día tres al catorce la actividad disminuyó en un 30%; la actividad fenilalanina amonio liasa aumentó 300% al segundo día después de la inoculación y a partir del día cuatro al catorce disminuyó en un 50%, lo anterior indica que *A. densiflorus* var. Myers, es altamente resistente a la infección por *Fusarium oxysporum* [103].

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante mencionar que en México los estudios químicos y farmacológicos que sustentan científicamente el uso de las plantas medicinales a las cuales se les atribuyen propiedades contra el cáncer son escasos, de 300 plantas pertenecientes a 90 familias botánicas, sólo 181 han sido evaluadas científicamente, de las cuales 88 extractos han mostrado actividad citotóxica contra alguna línea celular y sólo 14 han sido evaluados *in vivo* [104], por lo que es clara la importancia de la investigación multidisciplinaria de nuestros recursos vegetales, en este sentido el presente trabajo propone por una parte determinar el potencial antitumoral de un grupo de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana con el propósito de aportar evidencias farmacológicas que permitan explicar su uso tradicional, por otra parte seleccionar a la especie más activa y realizar su estudio fitoquímico biodirigido y así contribuir al conocimiento fitoquímico y farmacológico de una especie medicinal mexicana.

A partir de esta investigación se obtendrán productos de origen vegetal con propiedades citotóxicas con potencial para el desarrollo de fitofármacos y fármacos que en un futuro ayudarán al control y/o tratamiento del cáncer.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios de investigación bibliográfica así como entrevistas directas a la comunidad indicaron que las siguientes especies: Hippocratea excelsa, Ibervillea sonorae, Asparagus setaceus, Asparagus sprengeri, A. densiflorus var. Myers, Schinus molle, Rubus coriifolius y Lepidium virginicum son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de cáncer, estas investigaciones también nos permitieron saber que los extractos etanólicos y las partes vegetales propuestas en esta investigación no han sido objeto de estudio para determinar su potencial citotóxico, por lo que la presente tesis fue conducida para determinar su actividad citotóxica y de alguna forma aportar información para validar su uso en la medicina tradicional.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad citotóxica de los extractos etanólicos obtenidos a partir de las especies vegetales *Hippocratea excelsa*, *Ibervillea sonorae*, *Asparagus setaceus*, *Asparagus sprengeri*, *A. densiflorus* var. Myers, *Schinus molle*, *Rubus coriifolius* y *Lepidium virginicum* y, posteriormente realizar un estudio fitoquímico farmacológico del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolectar las especies vegetales Hippocratea excelsa, Ibervillea sonorae, Asparagus setaceus, Asparagus sprengeri, A. densiflorus var. Myers, Schinus molle, Rubus coriifolius y Lepidium virginicum.
- Obtener los extractos etanólicos de las ocho especies seleccionadas.
- Determinar la citotoxicidad de los extractos obtenidos.
- En base a los resultados del inciso 3, se procede a realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto etanólico de las hojas de Schinus molle.
- Llevar a cabo una prueba de toxicidad aguda oral del extracto etanólico de las hojas de Schinus molle en un modelo murino.
- Llevar a cabo un análisis de variación estacional de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en el extracto etanólico de las hojas de Schinus molle, a lo largo de un año.

6. HIPÓTESIS

Si la información bibliográfica existente sobre el uso de las especies vegetales Hippocratea excelsa, Ibervillea sonorae, Asparagus setaceus, Asparagus sprengeri, A. densiflorus var. Myers, Schinus molle, Rubus coriifolius y Lepidium virginicum, empleadas en la medicina tradicional en el tratamiento de cáncer es verdadera, así como su actividad citotóxica contra líneas celulares malignas, entonces estas especies conducirán al hallazgo de extractos, fracciones y/o compuestos puros que mostrarán actividad citotóxica *in vitro* evaluados en la línea celular U-937 y poco efecto contra los linfocitos humanos, además de demostrar ser inocuos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Recolección del Material vegetal

La recolección y/o adquisición de las especies vegetales se hizo en diferentes partes del Distrito Federal. En todos los casos la parte vegetal corresponde a la utilizada en las prácticas médicas populares; fueron autentificadas por la M. en C. Abigail Aguilar y se depositaron ejemplares de referencia en la colección etnobotánica del Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM) (figura 9).

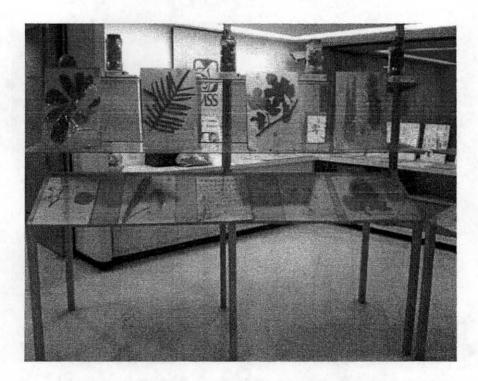


Figura 9. Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social.

7.1.1. Preparación de los extractos

Los extractos se prepararon a partir de 20 g de material vegetal de cada una de las ocho especies vegetales seleccionadas, por maceración con etanol (300 mL x 2 veces x 2 semanas) a temperatura ambiente, los extractos resultantes se filtraron y se concentraron en un rotavapor a presión reducida hasta sequedad y peso constante.

En el caso del análisis de variación estacional las hojas de *Schinus molle* (20 g) se recolectaron de un solo ejemplar en Centro Médico SXXI de la Ciudad de México cada dos meses a partir de mayo del 2010 hasta completar un año; una vez obtenidos los extractos se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso, (diagrama 1).

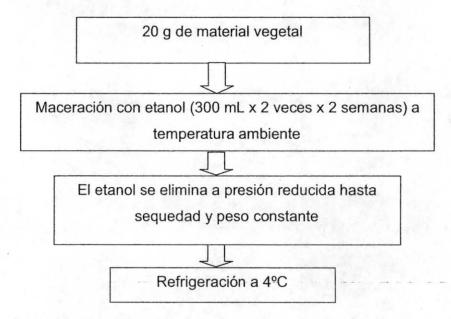


Diagrama 1. Obtención de los extractos etanólicos de ocho especies vegetales.

7.2. Ensayo biológico

7.2.1. Determinación de la actividad citotóxica

Cabe mencionar que el ensayo de MTT se utilizó de manera rutinaria tanto en la evaluación de los extractos etanólicos, como en el estudio fitoquímico biodirigido de la especie más activa (extracto activo, fracciones y compuestos puros).

A continuación se describen los aspectos más importantes de la prueba biológica.

7.2.2. Modelos celulares empleados

En el estudio se emplearon los siguientes modelos celulares:

Línea celular U937: Procede de un linfoma histiocítico difuso de un humano caucásico [105].

Linfocitos humanos: Los linfocitos se obtuvieron a partir de sangre periférica por centrifugación diferencial mediante un gradiente de densidad, con Ficoll-Hypaque [106].

Ambos modelos celulares se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico, en atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂, hasta obtener la confluencia necesaria.

Cuando se obtuvo una confluencia del 80-90% de los cultivos celulares se les realizó un conteo en una cámara de Neubauer con azul tripán vol/vol y se ajustaron a un inóculo de 5x10³ células en 10 mL.

7.2.3. Preparación de los extractos, fracciones y compuestos puros

Se tomaron 5 mg de cada uno de los extractos y se resuspendieron en 1 mL de DMSO al 2% para tener soluciones stock de concentración de 5000 μg/mL, las cuales se diluyeron a una concentración de 500 μg/mL.

En el caso de las fracciones y compuestos puros se tomaron 2 mg de cada uno y se resuspendieron en 1 mL de DMSO al 2% para tener soluciones stock de concentración de 2000 μg/mL, las cuales se diluyeron a una concentración de 20 μg/mL; en ambos casos, las soluciones stock se almacenaron protegidas de la luz en refrigeración hasta el momento de su uso.

7.2.4. Técnica de MTT

El efecto de las extractos, sobre la línea celular U-937 y linfocitos, se midió mediante el ensayo colorimétrico de MTT, para lo cual se adicionaron 5 x 10³ células por pozo en placas de poliestireno de 96 pozos y fondo plano, para cultivos celulares (Nunc).

A partir de las soluciones stock de cada extracto se adicionaron 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μ L/pozo y se aforaron con medio correspondiente hasta llegar a un volumen final de 200 μ L, para obtener concentraciones finales de 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50 μ g/mL, por pozo.

En el caso de fracciones y compuestos puros, a partir de las soluciones stock se adicionaron 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.2, 62.5 μ L/pozo y se aforaron con medio correspondiente hasta llegar a un volumen final de 200 μ L, para obtener concentraciones finales de 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12 y 6.25 μ g/mL.

Los experimentos se realizaron en atmósfera al 5 % de CO₂ y a 37 °C. Luego de 24 h de tratamiento se adicionaron 10 μL/pozo de MTT incluyendo los controles y al cabo de 4 h en atmósfera al 5 % de CO₂ y 37 °C, se adicionaron 100 μL/pozo de SDS al 10%. Cada experimento se realizó por triplicado [107].

7.2.5. Método estadístico

Con los datos obtenidos al medir la DO₅₇₀ se calculó el porcentaje de viabilidad como:

% viabilidad = 100
$$\begin{pmatrix} B \\ A \end{pmatrix}$$

Donde:

A: valores promedio de DO₅₇₀ de las células no tratadas

B: valores promedio de DO₅₇₀ de las células tratadas.

Con los valores porcentuales de viabilidad celular y los de las concentraciones probadas se empleó el programa estadístico Excel para Windows para determinar la concentración citotóxica cincuenta (CC₅₀) [108].

Luego, se precisó el índice de selectividad, definido como la relación de citotoxicidad entre células normales y células cancerosas:

El índice de selectividad es > 1 cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células normales [57].

- 7.3. Preparación del extracto etanólico de Schinus molle a gran escala El material vegetal (600 g de las hojas de Schinus molle) se recolectó en Centro Médico SXXI de la Ciudad de México en mayo del 2010, una muestra de referencia se depositó en el herbario IMSSM y fue identificada por la M en C. Abigail Aguilar (Voucher 15670).
 - 7.4. Obtención de los compuestos con actividad citotóxica del extracto etanólico de las hojas de Schinus molle.

7.4.1. Extracción de Schinus molle

Se pesaron 600 gramos del material vegetal fresco, fueron cortados y posteriormente se extrajeron por maceración con etanol (4 L x 2 veces x 2 semanas) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y se concentró en un rotavapor a presión reducida, obteniéndose 67 g de un residuo de color verde.

7.4.2. Fraccionamiento de Schinus molle

Una parte (6.3 g) del extracto etanólico de Schinus molle se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta, empleando como

123

fase estacionaria Gel de sílice 600 (0.063-0.200 nm) Merck, los eluyentes empleados fueron disolventes con aumentos subsecuentes de polaridad diclorometano (CH₂Cl₂); acetato de etilo (AcoEt) y etanol (EtOH). Se obtuvieron 287 fracciones de 50 mL cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a sus similitudes cromatográficas mediante cromatografía en capa fina (CCF), obteniéndose 11 fracciones primarias, (tabla 4).

Tabla 4: Resumen del fraccionamiento primario del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie vegetal *Schinus molle*.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Rendimiento (mg)
			1-3 (FP-1)	331
			4-10 (FP-2)	354
CH ₂ Cl ₂	100	1-159	11-16 (FP-3)	218
			17-33 (FP-4)	1171
			34-42 (FP-5)	1753
			43-156 (FP-6)	1576
			157-181 (FP-7)	429
AcOEt	100	160-198	182-196 (FP-8)	323
			197-201 (FP-9)	264
AcOEt:EtOH	80:20	199-287	202-246 (FP-10)	891
ACCELLETOR	60.20	199-207	247-287 (FP-11)	445

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de aluminio (cromatofolios en aluminio TLC 20 X 20 cm sílica gel 60 F254 Merck) y diferentes sistemas de elusión. La composición de los agentes cromógenos utilizados se muestra en la tabla 5 [109].

Tabla 5. Composición de los agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina (CCF).

Agente cromógeno	Composición	Uso	
	Ac. Sulfúrico al 5% en etanol	Terpenoides	
Vainillina-H₂SO₄	100 mL.	Fenil	
	Vainillina 1 g	propanoides	
		• fenoles	
Tricloruro de aluminio	Cloruro de aluminio 5 g		
	Agua 100 mL	Flavonoides	
Tricloruro férrico	Cloruro de fierro III 10 g	Principios amargos	
	Agua 100 mL		
Fast blue	Fast blue 0.5 g	Compuestos fenólicos	
	Agua 100 mL		

En todos los casos antes de revelar con el agente cromógeno se procedió a visualizar las placas con luz U.V. con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

7.4.3. Identificación de los compuestos responsables de la citotóxicidad

7.4.4. Purificación de rutina y quercitrina

Las fracciones FP-8 y FP-10 se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para lo cual 10 mg de cada una de las fracciones se resuspendieron en 10 mL de metanol (MetOH) grado cromatográfico y se inyectaron 20 μL al cromatógrafo de líquidos Waters 2795. Binary LC Pump, equipado con un detector de UV (Waters 996) con arreglo de diodos, y automuestrador. Se empleó una columna de fase reversa Kromasil C18 (150 mm x 4.6 mm x 5 μm) y la temperatura fue de 25 °C; como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo: ac. acético glacial, el método empleado fue de gradiente, con un flujo de 0.4 mL/min, la detección se realizó a 254 nm y el tiempo total de elución fue de 60 min, (tabla 6).

El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millenium.

En un análisis comparativo por CLAR con los estándares respectivos; se logró la identificación de dos flavonoides: rutina (9) y quercitrina (10) con tiempos de retención y espectros U.V. totalmente superpuestos (ANEXO 1).

En el caso del ensayo de variación estacional se tomaron 20 mg de cada uno de los extractos, se resuspendieron en 10 mL de MetOH grado cromatográfico y se procedió a inyectar 20 μL al cromatógrafo, en las condiciones que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Sistema de elución utilizado en la CLAR para separar las fracciones FP-8 y FP-10 y análisis de las muestras de variación estacional.

		Proporción		
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Acetonitrilo	% Ac. Acético glacial	
0	0.40	95	5	
12	0.40	90	10	
24	0.40	85	15	
36	0.40	75	20	
48	0.40	60	40	
60	0.40	95	5	

7.5. Estudio de toxicidad aguda oral del extracto etanólico de las hojas de Schinus molle.

El estudio de toxicidad, así como el cuidado y el manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 [110,111].

7.5.1. Animales de laboratorio

Se emplearon ratas Sprague Dawley; de ambos sexos, con peso corporal entre 150 y 200 g, a los cuales se les retiró la comida 16 h antes de la administración. Todos procedentes del Bioterio del IMSS (CMNSXXI).

Los animales se mantuvieron en una sala con temperatura controlada de 22± 2°C y ciclos luz-oscuridad de 12/12 horas, se colocaron 3 animales por jaula.

7.5.2. Dosificación de los extractos

Se tuvieron tres grupos de tratamiento y un grupo control (n= 6); 3 hembras y 3 machos a razón de 6 animales por grupo y se administraron 3 dosis: 0.5 g/Kg, 1 g/Kg y 2 g/Kg.

Se realizó una única administración por vía oral mediante cánula intragástrica, para lo cual el extracto crudo se resuspendió en 1 mL de DMSO al 2%. Se registró el peso corporal así como la ingesta de alimento y agua diaria, los animales permanecieron en observación durante 14 días, al cabo de los cuales se sacrificaron mediante dislocación cervical; se realizó una observación macroscópica y la determinación del peso de órganos: corazón, riñón, hígado, intestino delgado, intestino grueso, pulmones. [110].

8. RESULTADOS

En la tabla siete se muestran los resultados de CC₅₀ evaluados en la línea celular U-937, linfocitos humanos e índice de selectividad de los 13 extractos etanólicos estudiados.

Tabla 7. CC₅₀ de los extractos etanólicos de las ocho especies vegetales.

Modelo celular	Parte vegetal	U-937	Linfocitos humanos	I. Selectividad
		CC ₅₀	CC ₅₀	
Especie Vegetal		[µg/mL]	[µg/mL]	
Hippocratea excelsa				
Control positivo	(C)	139.61	189.43	1,36
Ibervillea sonorae				
Control negativo	(R)	211.24	172.80	0.82
Asparagus setaceus	(R)	181.52	196.08	1.08
Asparagus setaceus	(PA)	129	123	0.95
Asparagus Sprengeri	(B)	191.78	143.93	0.75
Asparagus Sprengeri	(R)	216.33	192.22	0.88
Asparagus Sprengeri	(PA)	309.73	393.78	1.27
Asparagus densiflorus Myers	(B)	471.36	149.98	0.32
Asparagus densiflorus Myers	(R)	189.85	139.55	0.74
Asparagus densiflorus Myers	(PA)	249.93	191.63	0.77
Schinus molle	(PA)	172.04	252.97	1.47
Rubus coriifolius	(PA)	165.57	167.64	1.01
Lepidium virginicum	(PA)	351.84	167.36	0.48

B = Bulbo, C = Corteza, PA = Partes aéreas, R = Raíz

Las cifras son el promedio de experimentos por triplicado.

En la tabla ocho se muestran los resultados de CC₅₀ evaluados en la línea celular U-937, linfocitos humanos e índice de selectividad del fraccionamiento primario.

Tabla 8. CC₅₀ de las 11 fracciones primarias obtenidas del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Modelo celular	U-937	Linfocitos humanos	l. Selectividad
No. Fracción	CC ₅₀ [µg/mL]	CC ₅₀ [µg/mL]	
FP-1	8.66	13.85	1.60
FP-2	12.98	11.05	0.85
FP-3	12.28	8.93	0.73
FP-4	11.00	9.51	0.86
FP-5	9.77	12.85	1.31
FP-6	9.58	11.44	1.19
FP-7	11.11	8.32	0.75
FP-8	9.29	10.07	1.08
FP-9	10.10	9.08	0.90
FP-10	10.80	12.70	1.18
FP-11	10.43	9.44	0.91

En la tabla 9 se muestran los resultados de CC₅₀ evaluados en la línea celular U-937, linfocitos humanos e índice de selectividad de los compuestos puros obtenidos a partir de *Schinus molle*.

Tabla 9. CC₅₀ de los compuestos puros obtenidos del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Modelo celular	U-937	Linfocitos humanos	I. Selectividad
Compuesto	CC ₅₀ [µg/mL]	CC ₅₀ [µg/mL]	
Rutina	9.62	9.85	1.02
Quercitrina	10.23	12.50	1.22

En la tabla 10 se muestran los pesos corporales de ratas macho, después de la administración intragástrica del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Tabla 10. Pesos corporales de ratas macho, después de una única administración intragástrica de diferentes dosis del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, al término de 14 días de observación.

	Dosis				
Día	Control	0.5 g/kg	1 g/kg	2 g/kg	
0	91.30 ± 8.82	81.00 ± 15.59	89.67 ± 5.39	87.67 ± 8.39	
1	105.90 ± 11.00	91.83 ± 17.62	98.00 ± 7.81	102.47 ± 5.62	
2	114.07 ± 11.11	98.90 ± 18.37	100.30 ± 6.88	90.77 ± 9.35	
3	121.20 ± 10.03	101.03 ± 19.10	111.73 ± 8.34	118.73 ± 5.69	
4	127.67 ± 7.81	111.40 ± 21.88	118.63 ± 8.17	125.73 ± 5.88	
5	125.73 ± 8.66	118.80 ± 22.94	122.77 ± 8.15	131.77 ± 3.68	
6	144.6 ± 11.07	129.33 ± 25.55	136.37 ± 7.16	142.17 ± 5.71	
7	148.33 ± 10.71	126.37 ± 24.52	140.00 ± 5.83	146.60 ± 3.32	
8	157.70 ± 12.41	156.03 ± 4.30	138.47 ± 5.90	155.40 ± 0.95	
9	163.97 ± 11.71	145.73 ± 27.00	154.90 ± 5.05	160.83 ± 3.97	
10	174.07 ± 11.21	152.10 ± 23.57	165.00 ± 4.92	167.77 ± 6.09	
11	179.37 ± 12.14	158.33 ± 20.76	174.27 ± 4.46	159.53 ± 5.75	
12	188.57 ± 12.94	159.97 ± 20.52	181.97 ± 4.46	179.43 ± 6.41	
13	194.63 ± 11.75	169.93 ± 21.71	190.73 ± 5.64	188.33 ± 8.55	
14	190 ± 11.13	178.66 ± 21.39	198.00 ± 7.40	199.30 ± 8.90	

n = 3

En la tabla 11 se muestran los pesos corporales de ratas hembra, después de la administración intragástrica de diferentes dosis del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Tabla 11. Pesos corporales de ratas hembra, después de una única administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, al término de 14 días de observación.

	Dosis					
Día	Control	0.5 g/kg	1 g/kg	2 g/kg		
0	86.07 ± 4.00	87.20 ± 5.01	85.07 ± 3.52	84.50 ± 5.07		
1	98.03 ± 4.99	97.77 ± 5.40	95.93 ± 5.56	96.77 ± 4.91		
2	109.63 ± 0.47	106.60 ± 5.31	103.10 ± 4.95	104.40 ± 5.41		
3	109.27 ± 5.00	108.60 ± 5.46	103.30 ± 4.25	106.47 ± 6.00		
4	115.87 ± 6.31	114.83 ± 5.51	112.43 ± 4.54	112.67 ± 5.53		
5	122.40 ± 1.15	122.50 ± 5.60	119.70 ± 4.64	117.70 ± 7.37		
6	128.70 ± 7.00	131.20 ± 4.42	128.47 ± 5.77	128.47 ± 9.35		
7	128.40 ± 7.15	132.37 ± 4.10	129.00 ± 4.94	127.23 ± 9.38		
8	133.53 ± 6.45	139.30 ± 2.95	137.93 ± 6.12	132.37 ± 10.22		
9	138.63 ± 9.47	143.10 ± 3.20	130.80 ± 4.51	135.90 ± 9.86		
10	145.37 ± 8.47	149.50 ± 4.19	146.50 ± 4.61	130.87 ± 9.82		
11	144.00 ± 14.70	152.67 ± 7.94	149.67 ± 4.25	142.23 ± 11.61		
12	150.03 ± 17.10	155.73 ± 7.80	153.27 ± 6.03	149.40 ± 12.37		
13	155.17 ± 15.96	152.53 ± 9.59	160.90 ± 6.53	157.73 ± 8.50		
14	157.77 ± 16.37	162.77 ± 13.80	165.47 ± 7.31	158.07 ± 15.24		

En la tabla 12 se muestran los pesos de los órganos de ratas macho, después de la administración intragástrica de diferentes dosis del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Tabla 12. Pesos de los órganos de ratas macho, después de una única administración intragástrica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, al término de 14 días de observación.

	Dosis				
Órgano	Control	0.5 g/Kg	1 g/Kg	2 g/Kg	
Hígado	8.10 ± 1.13	10.16 ± 1.16	8.15 ± 1.12	9.53 ± 2.05	
I. Delgado	6.20 ± 2.34	8.17 ± 2.31	10.82 ± 1.14	10.20 ± 2.34	
I. Grueso	8.23 ± 2.97	7.50 ± 2.00	6.82 ± 1.15	5.50 ± 2.05	
Testículos	3.57 ± 0.12	3.55 ± 0.05	3.59 ± 0.12	2.87 ± 1.18	
Estómago	1.50 ± 0.00	3.50 ± 0.00	2.88 ± 1.20	2.20 ± 1.13	
Corazón	1.47 ± 0.06	1.53 ± 0.06	1.57 ± 0.12	1.53 ± 0.06	
Pulmón	2.17 ± 1.15	1.47 ± 0.06	1.51 ± 0.14	1.52 ± 0.07	
Riñón	1.50 ± 0.00	1.55 ± 0.04	1.47 ± 0.03	1.53 ± 0.06	
Bazo	1.60 ± 0.10	1.51 ± 0.10	1.54 ± 0.11	1.50 ± 0.00	

n=3

En la tabla 13 se muestran los pesos de los órganos de ratas hembra, después de la administración intragástrica del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA).

Tabla 13. Pesos de los órganos de ratas hembra, después de una única administración intragástrica de diferentes dosis del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, al término de 14 días de observación.

	Dosis				
Órgano	Control	0.5 g/Kg	1 g/Kg	2 g/Kg	
Hígado	6.81 ± 2.33	6.81 ± 1.18	5.47 ± 0.06	7.47 ± 2.05	
I. Delgado	6.81 ± 1.17	6.20 ± 1.21	6.87 ± 1.18	6.82 ± 1.14	
I. Grueso	4.85 ± 1.22	4.19 ± 1.15	4.17 ± 1.15	4.22 ± 1.16	
Aparato rep	1.49 ± 0.02	1.50 ± 0.03	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	
Estómago	1.48 ± 0.03	1.52 ± 0.03	1.45 ± 0.05	2.17 ± 1.15	
Corazón	1.50 ± 0.02	1.48 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.52 ± 0.11	
Pulmón	1.49 ± 0.02	1.52 ± 0.04	1.60 ± 0.10	1.50 ± 0.01	
Riñón	1.50 ± 0.00	1.52 ± 0.04	1.51 ± 0.02	1.50 ± 0.00	
Bazo	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.63 ± 0.12	1.54 ± 0.06	

n=3

En la tabla 14 se muestran los resultados de variación estacional.

Tabla 14. Variación de la concentración de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en el extracto etanólico de *Schinus molle* (PA), a lo largo de un año.

No. Extracto	Fechas de recolección	Rendimiento (g)	Componentes	
			Rutina [μg/mL]	Quercitrina [μg/mL]
E1 (Extracto a gran escala)	06/05/10	67.00	24.48	2.89
E2	19/07/10	2.03	29.12	1.98
E3	20/09/10	2.03	41.59	3.50
E4	19/11/10	2.16	54.44	3.09
E5	20/01/11	2.24	28.13	5.60
E6	18/03/11	2.87	37.62	2.46
E7	09/05/11	2.50	38.35	2.54

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio se llevó a cabo en tres fases, en la primera fase se determinó la CC₅₀ de 13 extractos etanólicos provenientes de ocho especies vegetales (*Hippocratea excelsa, Ibervillea sonorae, Asparagus setaceus, Asparagus sprengeri, A. densiflorus* var. Myers, *Schinus molle, Rubus coriifolius* y *Lepidium virginicum*). Se encontró que seis extractos presentaron CC₅₀ en el rango de 100-200 μg/mL, al no haber diferencias entre ellos se procedió a determinar la CC₅₀ en linfocitos humanos y a calcular el índice de selectividad, tomando este último como un criterio para seleccionar al extracto de *Schinus molle* (PA), para llevar a cabo su estudio fitoquímico biodirigido. De este se identificaron dos compuestos: rutina (9) y quercitrina (10), los cuales mostraron actividad citotóxica similar e índices de selectividad de 1.02 y 1.22; respectivamente.

En la segunda etapa de la investigación se procedió a determinar la toxicidad del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA), en un modelo murino, resultando no ser tóxico a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/Kg.

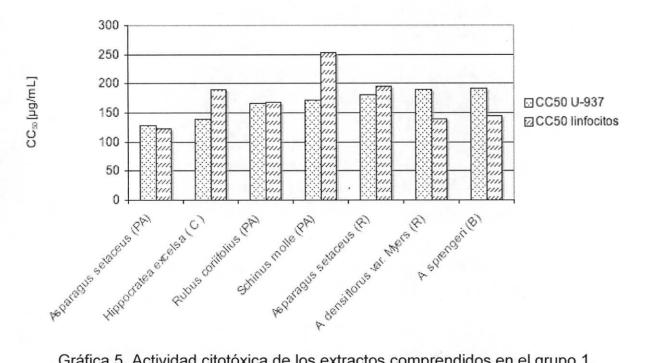
En la última etapa de la investigación se llevó a cabo un estudio de variación química estacional de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, el cual demostró que la máxima concentración se obtuvo en el mes de noviembre del 2010 en el caso de rutina y enero del 2011 para quercitrina.

A partir del material vegetal de las ocho especies vegetales se prepararon los extractos en pequeña escala, utilizando etanol como disolvente de extracción. A los extractos obtenidos se les determinó la CC₅₀ en la línea celular U-937 (tabla 7).

Las dosis probadas fueron seleccionadas mediante experimentos reportados en la literatura en los que se ha demostrado que los extractos crudos presentan efecto citotóxico en el rango de 4 a 50 μg/mL [112].

La actividad citotóxica mostrada para los extractos evaluados se presenta en la tabla 7, los valores se expresan en μ g/mL y fueron evaluados a las dosis de 3.12 μ g/mL hasta 500 μ g/mL.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las especies evaluadas se dividieron en dos grupos: El grupo 1, constituido por aquellas plantas en las que la CC₅₀ está en el rango de 100 a 200 μg/mL, este grupo incluye a las especies: Asparagus setaceus (PA), Hippocratea excelsa (C), Rubus coriifolius (PA), Schinus molle (PA), Asparagus setaceus (R), A. densiflorus var. Myers (R) y A. sprengeri (B); con 129, 140, 166, 172, 182, 190 y 192 μg/mL, respectivamente (gráfica 5).

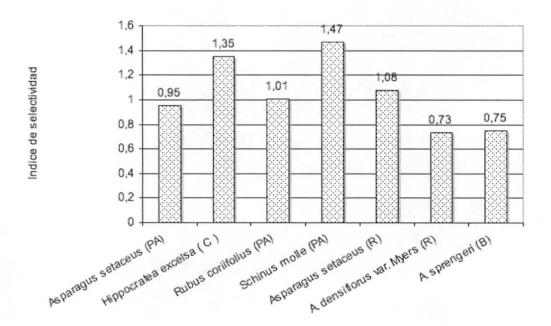


Gráfica 5. Actividad citotóxica de los extractos comprendidos en el grupo 1.

En el segundo grupo están aquellas especies cuya CC₅₀ está en el rango de 200 a 400 μg/mL; incluye a las especies *Ibervillea sonorae* (B), A. sprengeri (R), A. densiflorus var. Myers (PA), A. sprengeri (PA), Lepidium virginicum (PA), A. densiflorus var. Myers (B) con 211, 216, 250, 310, 352 y 471 µg/mL, respectivamente.

Al no haber diferencias en las especies comprendidas en el grupo 1; se procedió a determinar la CC₅₀ en linfocitos humanos y así calcular el índice de selectividad y tomarlo como un parámetro para seleccionar a la especie más activa y llevar a cabo su estudio fitoquímico biodirigido.

Como se observa en los resultados de la tabla 7 y la gráfica 6, el extracto etanólico de *Schinus molle* (PA) obtuvo el mayor índice de selectividad, por lo que la especie vegetal fue seleccionada para realizar su estudio fitoquímico biodirigido, con el objetivo de identificar los compuestos con propiedades citotóxicas.

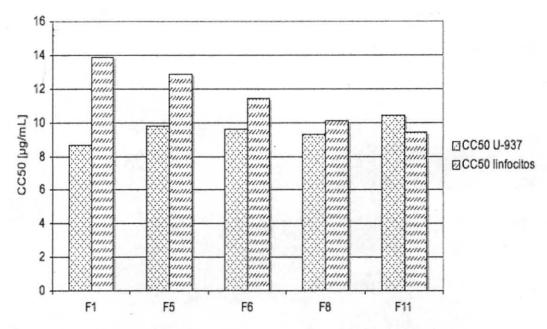


Gráfica 6. Índice de selectividad de los extractos comprendidos en el grupo 1.

A partir de las hojas de *Schinus molle* se preparó el extracto etanólico a gran escala mediante maceración y fue sometido a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta utilizando diferentes sistemas de elusión; obteniéndose 287 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica en 11 fracciones primarias (tabla 7).

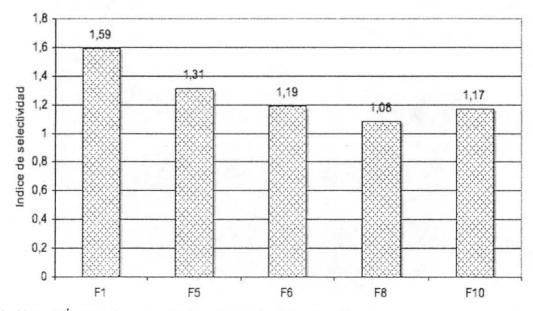
Las 11 fracciones resultantes se sometieron al ensayo biológico para determinar su citotoxicidad, (tabla 8).

Los resultados indican que las fracciones primarias FP-1, FP-5, FP-6, FP-8 y FP-11 presentaron valores de CC_{50} comprendidos en el rango de 9 a 10 μ g/mL (gráfica 7).



Gráfica 7. Actividad citotóxica de las fracciones primarias.

Al no haber diferencias entre ellas, se procedió nuevamente a determinar la CC₅₀ en linfocitos humanos y el índice de selectividad para poder elegir una o alguna de ellas para continuar con la purificación (tabla 8, gráfica 8).



Gráfica 8. Índice de selectividad de las fracciones primarias.

Como se observa en la tabla 8 y gráfica 8; de las 11 fracciones obtenidas las fracciones primarias FP-1, FP-5, FP-6, FP-8 y FP-10 obtuvieron el mayor índice de selectividad (1.59, 1.31, 1.19, 1.08 y 1.17, respectivamente).

Las fracciones FP-8 y FP-10 se purificaron mediante CLAR (tabla 9) identificándose rutina (9) y quercitrina (10), con CC₅₀ de 10 μg/mL e índices de selectividad de 1.02 y 1.22, respectivamente. (tabla 9, cuadro 3).

Cuadro 3. Flavonoides identificados en el extracto etanólico de las hojas de S. molle.

Rutina (9)

$$HO$$
 HO
 HO

Como parte de esta investigación, también se evalúo la toxicidad aguda oral del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA), demostrando que durante los 14 días que duró la prueba no se presentó mortalidad, ni hubo aparición de signos tóxicos posteriores a la administración del extracto aún a la dosis más alta (2000 mg/kg).

No se mostraron diferencias significativas en los pesos corporales de las ratas macho y hembra al término de 14 días de observación después de la administración intragástrica del extracto etanólico de *Schinus molle* (PA). (tablas 10 y 11).

ATTITION.

Con respecto a los pesos de los órganos en ratas macho los órganos: i. Delgado, y estómago presentaron diferencias significativas respecto al grupo control; mientras que los demás órganos, no mostraron diferencias significativas (tabla 12). En el caso de los pesos de los órganos de ratas hembra, ninguno de los grupos tratados mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (tabla 13). En la necropsia no se detectó ninguna alteración macroscópica de los órganos examinados.

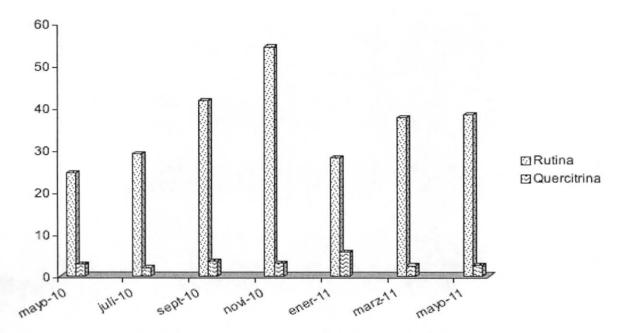
A pesar de las diferencias en los pesos de los órganos de las ratas macho, el extracto etanólico de *Schinus molle* (PA), se enmarca en la categoría de no clasificado, ya que no se presentó mortandad aún a la dosis de 2 g/kg [110].

Cabe mencionar que ya se ha llevado a cabo una investigación para determinar la toxicidad subcrónica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*, en la que el extracto fue administrado en ratones a una dosis de 1 g/Kg y mediante una batería observacional se encontró que el extracto produce un aumento de la actividad motora en ratones hembras y un aumento en la cantidad de orina en los ratones machos [71], sin embargo al igual que en esta investigación se concluye que el extracto no es tóxico a la dosis probada.

A pesar de los resultados encontrados se recomienda que en investigaciones futuras se realicen análisis de bioquímica sérica y urinaria, hematología y estudios histológicos para determinar alteraciones que pudieran resultar de la administración del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*.

En la última etapa de esta investigación se determinó el contenido de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en el extracto etanólico de *Schinus molle* (PA); para lo cual el material vegetal se recolecto cada dos meses durante un año (tabla 14). Los resultados indican que el contenido de rutina aumentó de 24.47 a 54.43 μg/mL en los meses de mayo a noviembre del 2010, siendo la concentración más alta la correspondiente al mes de noviembre, sin embargo al empezar el año 2011 el contenido de rutina disminuyó y a partir de marzo volvió a presentar un comportamiento ascendente.

Por su parte, la quercitrina se encontró en menores concentraciones, las cuales fueron bastante estables durante todo el año. La mayor concentración es la correspondiente al mes de enero del 2011 (gráfica 9).



Gráfica 9. Variación en el contenido de los flavonoides rutina y quercitrina presentes en el extracto etanólico de *Schinus molle* (PA) en el ciclo de un año.

10.CONCLUSIONES

- 10.1. Los extractos etanólicos de las especies: Asparagus setaceus (PA), Hippocratea excelsa (C), Rubus coriifolius (PA), Schinus molle (PA), Asparagus setaceus (R), A. densiflorus var. Myers (R) y A. sprengeri (B), presentaron la mayor actividad citotóxica, sin embargo se seleccinó el extracto etanólico de Schinus molle (PA) ya que obtuvo el mayor selectividad.
- 10.1.1. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto etanólico de Schinus molle (PA) permitió la identificación de dos compuestos de tipo flavonoide: rutina (9) y quercitrina (10).
- Los flavonoides rutina y quercitrina presentaron actividad citotóxica similar y quercitrina obtuvo la mayor selectividad.
- 10.2. En la prueba de toxicidad aguda oral, no se presentó mortalidad durante los 14 días que duró la prueba, a pesar de la variación en los pesos de los órganos de ratas macho, el extracto se enmarcó en la categoría de no clasificado.
 - 10.3. El análisis de variación estacional permitió determinar el porcentaje de la composición de los flavonoides rutina y quercitrina procedentes de las partes aéreas de Schinus molle a lo largo de un año; siendo los meses de noviembre del 2010 y enero del 2011, en los que se obtuvo el mayor contenido de rutina y quercitrina, respectivamente.
 - 10.4. Las actividades ya demostradas para el extracto etanólico en conjunto con la actividad citotóxica, análisis de toxicidad y variación estacional demostradas en este estudio son evidencia farmacológica y fitoquímica que permite explicar el uso de las hojas de Schinus molle en el tratamiento de cáncer y proponerla como una candidata importante para la obtención de compuestos con utilidad terapéutica.

11.REFERENCIAS

- Palacios M. "Inhibición del crecimiento de Gardnerella vaginalis por seis plantas de uso medicinal de la flora suroccidental Guatemalteca". Tesis para optar por el título de Química Bióloga. Universidad de San Carlos. Guatemala. Noviembre 2004: Pp. 11
- González J, Ruiz H, Chávez P, Medina M, Aranda M, García J. "La oftalmología en el códice de la Cruz-Badiano". Revista Peruana de Oftalmología. 2010: 33(2): 106.
- Velázquez, C. "Evaluación in vivo de la actividad inhibidora de la secreción intestinal inducida por la toxina de Vibrio cholerae de 26 plantas medicinales: estudio fitoquímico bio-dirigido del extracto metanólico de las flores de Chiranthodendron pentadactylon". Tesis Doctoral. Escuela Superior de Medicina – IPN. 2006: 1-2.
- World Healt Organization. Guideliness for the Assessment of Herbal Medicines.
 Programme on Traditional Medicine. CH-1211. Geneva. 1991: 27.
- 5. Myers N. "Securing the fabric of life. People and the Planet". 1998: 7: (4): 6-9.
- 6. Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/topics/cancer/es/
- 7. Rang H, Dale M.M, Ritter J.M. "Farmacología". Ed. Harcourt, Madrid. 2000. Pp.
- ATSDR-¿Qué es el cáncer?
 http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/es_cancer_fs.pdf
- Arias J, Aller MA, Arias JI, Lorente L. "Fisiopatología quirúrgica".
 Traumatismos, Infecciones, Tumores. Ed. Tébar. Pp. 511.
- 10. Un especial de el mundosalud.com.
 http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/mama5.htm.
- 11. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. El cáncer. Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. 2004. Pp.12.
 - http://www.cancer.gov.co/documentos/Cartillas/Elcancer.pdf
- 12. Alvarado LM. "El cuidado paliativo brindado al niño con enfermedad oncológica: una mirada a la labor de enfermería desde las familias cuidadoras".

- Trabajo de grado para obtener el título de Especialista en Enfermería en Cuidado al niño es estadio crítico de salud. Universidad de Antioquia. Facultad de enfermería. Medellín. 2007:20-24
- IARC. Scientific. International incidence of childhood cancer. Lyon: IARC, 1998: 235-237.
- Ries LA. Miller RW, Smith MA. "Cancer in children (ages 0–14 and ages 0–19)". Cancer Statistics Reviews: 1973–1990 Bethesda: Nacional Cancer Institute, 1993: 1-15.
- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. "International incidence of hildhood cancer". Int J Cancer, 1988: 42:511–520.
- 16. Bernard E, Coste D, Thyss A, Scheiner C, Perrimond H. "Childhood cancer incidence in the sourth-east of France". Eur J Cancer, 1993: 29A: 2284–2291.
- 17. De-Nully-Brown P, Hertz H, Olsen JH, Yssing M, Scheibel E, Moller OJ. "Incidence of childhood cancer in Denmark 1943–1984". Int J Epidemiol, 1989: 18:546–555.
- Alert J, Jiménez J. "Malignant tumors in Cuban children". Fourth triennial 1973– 1975 of the national cancer registry. Neoplasma, 1980: 27:739–744.
- Drut, Hernández R., Pollono A. "Incidence of childhood cancer in La Plata, Argentina, 1977–1987". Int J Cancer, 1990: 45(6):1045–47.
- 20. Castro M, Murillo R, Pardo C, Piñeros, M. "Casos nuevos de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología Colombia, 2002". Rev Colomb Cancerol Bogotá, DC. 2003: 7(3): 4-19.
- 21. Miller RW, Myers MH. "Age distribution of epithelial cancers". Lancet, 1983: 2:1250.
- 22. Birch J, Marsden H. "A classification scheme for childhood cancer". Int J Cancer, 1987: 40: 620–624.
- 23. Greenberg S. "Epidemiology of cancer in children". Epidemiol Rev 1985: (7): 22-48
- 24. Kaatsch P. "Epidemiology of childhood cancer". Cancer Treatment Reviews 2010: (36): 277–285.

- 25. Robison L. "General principles of the epidemiology of childhood cancer". Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2^a. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1993: 3-10.
- 26. Cova M. "Cáncer infantil en el Hospital General de México". Periodo 2002-2004". Tesis de licenciatura. UAM-X: 2006.
- 27. Del Pozo H, Beresi V. "Quimioterapia de los tumores malignos de la infancia". Revista chilena de pediatría. 1976: **47(1):** 20-28.
- 28. Cragg GM, Grothaus GP, Newman JD. "Impact of natural products on developing new anti-cancer agents". *Chemical reviews*. 2009: **109** (7): 3012-3043.
- 29. Joshua HA, Leland JG. "Selective anticancer drugs". *Natural Reviews Drug Discovery*. 2002: **(1)**: 491-492.
- 30. Schlaepfer L, Mendoza JA. "Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010: 41: (4): 18-27.
- 31. Vega E. "Estudio de *Cuphea aequipetala* Cav. sobre la proliferación *in vitro* de células humanas transformadas". Tesis Doctoral. UAM-I. 2005.
- 32. Villa MG y Barajas M. "Estudio Anatómico de *Hippocratea excelsa* HBK (Hippocrateaceae)". Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro, México. *Acta Botánica Mexicana*. 1998: **43:**7-21.
- 33. UBIO. 2009. The Marine Biological Laboratory.
 http://names.ubio.org/browse/details.php?namebankID=8694495.
- 34. Cáceres DZ, Cantillo CG, Mena R. y-Quijano L. Resúmenes de trabajos en carteles. C-C-40 "Aislamiento de triterpenos hidroxilados de *Hippocratea* excelsa H.B.K". Sociedad de Química México 2004: **48 (1)**:22-43.
- 35. García A. "Manejo social de la cancerina (Hippocratea), planta medicinal de la selva baja caducifolia en la cuenca del río Papagayo, Guerrero, México". Tesis Doctoral. Colegio de postgraduados. 2009.
- 36. Martínez VM. "Aislamiento y evaluación anticancerígeno y antiinflamatoria de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa* (cancerina)". Universidad Autónoma de México. Instituto de Química, México, 2000.

- 37. Reyes CR, Jiménez E, Cristóbal E, Torres L, Pérez E. and Mercado R. "Natural insecticidas from *Hippocratea excelsa* and *Hippocratea celestroides*. Devoted to Past, Present, and Future Uses of Plants by People: Landraces of Maize in Central México". *Economic Botany*, 2003: 57(1):54-57.
- 38. Mata R, Calzada F, Díaz E. y Toscano B. "Chemical studies on mexican plants used in tradicional medicine, xv sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*". *Journal of Natural Products*, 1990: **53(5)**: 1212-1219.
- 39. Aguilar G, A.R., Mena R. y Padilla M, Toscazo A. and Quijano L. "Triterpenoids from *Hippocratea excelsa*. The cristal structure of 29-hydroxytaraxerol". *Naturforsch*. 2005: 60:577-684.
- 40. Núñez R, "Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum uragoga (Celastraceae)". Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. 2004.
- 41. Nariñan E, Martínez L, González M, Estrada L. y Navarrete A. "Evaluación de la actividad citoprotectora del extracto metanólico de *Hemiangium excelsum* sobre úlcera gástrica en rata wistar". Lecturas para el diplomado internacional de plantas medicinales de México. 2ª edición. Universidad Autónoma de Chapingo. México, 2002: 515-520, 580.
- 42. Cáceres D, Mena GJ, Cedillo R, Quijano L. "21beta-Hydroxy-oleanane-type triterpenes from Hippocratea excelsa". Phytochemistry 2008;69(4):1057-64.
- 43. Navarrete A, Trejo J y-Reyes L. "Principles of root bark of Hippocratea excelsa (Hippocrataceae) with gastroprotective activity". *Journal Ethnopharmacology*, 2002: **79 (3)**:383-388.
- 44. Aguilar G, A.R., G.J. Mena R. y N. Padilla M., Toscazo A. and Quijano L. "Triterpenoids from *Hippocratea excelsa*. The cristal structure of 29-hydroxytaraxerol". *Naturforsch*, 2005: **60**:577-684.
- 45. Perez RM, Perez S, Zavala MA, Salazar M. "Anti-inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*". Journal of Ethnopharmacology 1995: **(47):** 85-90.
- 46. Mena GJ, Pérez AR, Cedillo R, Bazzocchi IL, Jiménez IA, Quijano L. "Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of Hippocratea excelsa". J

- Nat Prod. 2007: 70: (5): 863-5.
- 47. Déciga M, Rivero I, Arriaga M, Castañeda G, Angeles GE, Navarrete A, Mata R. "Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine". <u>J Ethnopharmacol.</u> 2007:110: (2): 334-42.
- 48. Velázquez C, Calzada F, Torres J, González F, Ceballos G. "Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico". J Ethnopharmacol. 2006:103: (1): 66-70.
- 49. Chilpa R, Jiménez M, Cristóbal E, Torres L, Villavicencio MA, Pérez BE, Mercado R. "Natural Insecticides from *Hippocratea Excelsa* and *Hippocratea Celastroides*". Economic Botany January 2003 : 57:(1):54-64.
- 50. Ibervillea tenuisecta.

 http://plantencyclo.free.fr/sp/fb_ibervillea_tenuisecta_gg.htm
- 51. Hernández Escoto. "Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y de 6-Bencilaminopurina (BAP) en el cultivo in vitro de Ibervillea sonorae (Waregui:Curcubitaceae): una especie de gran potencial para el tratamiento de la diabetes mellitus". Informe de Servicio social para obtener el titulo de biólogo. UAM-Xochimilco. 2008. Pp. 21.
- 52. Hernández E, Calzada F, Roman R, Alarcón FJ. "Monoglycerides and fatty acids from Ibervillea sonorae root: isolation and hypoglycemic activity". Planta Med. 2007 73(3): 236-40.
- 53. Weckert E, Domínguez X, Achenbach H. "The absolute configuration of kinoin C". *Phytochemistry*, 1993: **33 (2):**447-448.
- 54. Pazos D. "Evaluación del efecto hipolipemiante e hipoglucemiante de extractos de *Turnera diffusa, Ibervillea sonorae y Morinda citrifolia*". Tesis de Maestría. IPN. 2009.
- 55. Alarcón FJ, Calzada F, Hernandez E, Ruiz C, Roman R. "Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II". Journal of Ethnopharmacology 2005: **97**: 447–452.
- 56. Hernández A. "Producción de extractos de *Ibervillea sonorae* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*". Tesis de Maestría. IPN. 2011.
- 57. Vega E, Espejo A, Alarcón F, Velasco R. "Cytotoxic Activity of Four Mexican

- Medicinal Plants". Proc. West. Pharmacol. Soc. 2009: 52: 78-82.
- 58. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info especies/arboles/doctos/3anaca

 4m.pdf
- 59. Yueqin Z. "Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 2006.
- 60. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info especies/arboles/doctos/3anaca 4m.pdf].
- 61. Duke JA (1985) CRC Handkbook of Medicinal Herbs. CRC Press: Boca Raton, Pp. 434.
- 62. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Pirul. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Pirul&id=7925
- 63. Pozzo T, Nobile L, Scapini G y Cini M. "The triterpenoid acids of *Schinus molle*". Phytochemistry, 1978: (17): 2107-2110.
- 64. Deveci O, Sukan A, Tuzun N y Hames E. "Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L." Journal of Medicinal Plants Research **4:(21):** 2211-2216.
- 65. Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner M.L, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. "Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line". Journal of Ethnopharmacology 2002: 79: 335–339.
- 66. Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. "Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils". J Food Sci. 2010: 75 (6): 466-72.
- 67. Díaz C, Quesada S, Brenes O, Aguilar G, Cicció JF. "Chemical composition of Schinus molle essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines". Nat Prod Res. 2008: 22: (17): 1521-34.
- 68. Machado D, Master M, Binfaré R, Dias M, Santos Adair, Pizzolatti M, Brighente I. Rodrigues A. "Antidepressant-like effect of the extract from leaves of Schinus molle L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system". Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. (2007): 31:

421-428.

- 69. Machado D, Bettio L, Cunha M, Santos A, Pizzolatti M, Brighente I, Rodrigues A. "Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from Schinus molle L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems". European Journal of Pharmacology 2008: 587: 163–168.
- 70. Bello R, Beltrán B, Moreno L, Calatayud S, Primo E, Espulgues J. "In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from Schinus molle L". Phytotherapy Research. 1998: 12: (7): 523–525.
- 71. Bras C, Domínguez S, Codón S, Minetti A, AFerrero A. "Consequences of subchronic exposure to ethanolic extract from fruits and leaves of Schinus molle var. areira L. in mice". *Journal of Ethnopharmacology*, 2010: 132: 321– 327.
- 72. Ferrero A, Minetti A, Bras C, Zanetti N. "Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of *Schinus molle* in rats". *Journal of Ethnopharmacology*, 2007: **113**: 441–447.
- 73. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Flora Medicinal Indígena de México. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=&po=&id=6 360&clave region=31.
- 74. Sánchez, O. "La flora del valle de México". Segunda edición. Ed. Herrero S. A., México. 1979: 175-178.
- 75.Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Lentejilla. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7411
- 76. Cole AR. "Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in *Cruciferae*". Phytochemistry. 1976: **15**: 759-762.
- 77. Calzada F, Meckes M, Cedillo R, Tapia A y Mata R. "Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity". Pharmaceutical Biology.1998: 36: (5): 305-309.

- 78. Barbosa CRE. "Glucotropeolina, compuesto con actividad contra E. histolytica del extracto metanólico de la raíz de L. virginicum". Tesis de Licenciatura. 2000. UNAM.
- 79. Cortés R, Lara B, Hernández J, Aoki K. "Efecto inhibitorio de algunas plantas mexicanas sobre la contractilidad muscular". http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol36 s 02/F%20Producciones%20Plantas%20y% 20Prod.%20Natya.pdf
- 80. Díaz A, Rodríguez H y Scull R. "Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549". *Rev Cubana Farm*, 2011: **45 (1):** 101-108.
- 81. Naval MV, Gómez MP, Carretero ME, Gupta M, Villar AM. "Estudio de la actividad antiestrés de los extractos metanólico e hidrometanólico de Lepidium virginicum L". Revista de Fitoterapia 2004: 4 (2):157-159.
- 82. Breedlove, D.E. "Listados Florísticos de México, I-X", Instituto de Bilogía; UNAM, México, 1986.
- 83. Standley P. "Tres and strubs of Mexico", Bulletin of the United Status Nacional Museum, 1997: 23: 328-331.
- 84. Rodríguez G. "Muestras de herbario, Herbario del IMSS",1996.
- 85. Berlin B. y Berlin E. "The gastrointestinal diseases". Medical Ethnobiology of the Highland of Chiapas, México. Princeton University Press, New Jersey, 1996.
- 86. Alanís A, Calzada F, Cedillo R, Meckes M. "Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*". *Phytother. Res.* 2003: **17**: 681–682.
- 87. Alanís AD. "(-)Epi-catequina, principio con actividad antiprotozoaria in Vitro contra Entamoeba histolytica y gardia lamblia obtenido de las partes aereas de Rubus coriifolius focke (Rosaceae)". Tesis de Maestría. 2000.
- 88. Barbosa E, Calzada F, Campos R. "Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. Journal of Ethnopharmacology. 2006: **108**: 395–397.
- 89. Barbosa E, Calzada F, Campos R. "In vivo antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional

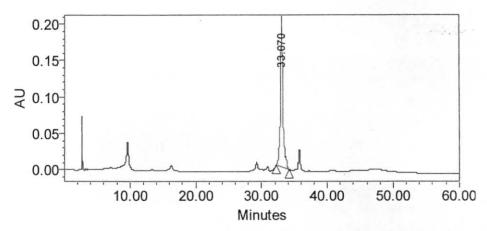
- medicine for the treatment of diarrhea". Journal of Ethnopharmacology. 2007: **109:** 552–554.
- 90. Said S, González F, Vargas J, Palacios R, Molina GM, Aguilar A, Meckes M, Jiménez A. "Activación de óxido nítrico, de macrófagos humanos por efecto del extracto etanólico de partes aéreas de Rubus coriifolius Focke". Resúmenes de trabajos en carteles. Rev. Soc. Quím. Méx. 2004: 48 (1): 24.
- 91. Meckes M, Rivera D, Nava V, Jiménez A. "Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema". Phytomedicine. 2004: 11: 446–451.
- 92. Asparagus setaceus. http://es.wikipedia.org/wiki/Asparagus setaceus.
- 93. Wondimu T, Asfaw Z, Kelbessa E. "Ethnobotanical study of medicinal plants around Dheeraa' town, Arsi Zone, Etiopía". Journal of Ethnopharmacology. 2007: **112:** 152–161.
- 94. Sati OP, Pant G. "Spirostanol glycosides from Asparagus plumosus." Phytochemistry. 1985: 24: (1): 123-126.
- 95. Paczkowski C, Zimowski J, Krawczyk D y Wojciechowski A. "Steroid-specific glucosyltransferases in *Asparagus plumosus* shoots". Phytochemestry. 1990: 29: (1): 63-70.
- 96. Esparraguera: Asparagus sprengeri.

 http://plantencyclo.free.fr/sp/nmauric asparagus sprengeri gg.htm
- 97. Sharma SC, Sharma R, Kumar R. "Spirostanosides of Asparagus *sprengeri*". Phytochemistry. 1983: **22:** (10): 2259-2262.
- 98. Debella A, Haslinger E, Kunert O, Michl G, Abebe D. "Steroidal saponins from Asparagus africanus". Phytochemistry. 1999. **51**: 1069-1075.
- 99. Held GY, Gujfalvi DV, Uresch F. "Isolation of diosgenin from Asparagus sprengeri". Phytochemistry. 1969: **8:** 493-495.
- 100. Anderson LL, Walsh M, Roy A, Bianchetti CM, Merchan G. "The potential of Thelypteris palustris and Asparagus *sprengeri* in phytoremediation of arsenic contamination". . Int J Phytoremediation.2011: 13: (2):177-84.
- 101. Agricultura. El cultivo de la esparraguera.
 http://www.infoagro.com/flores/plantas ornamentales/esparraguera.htm

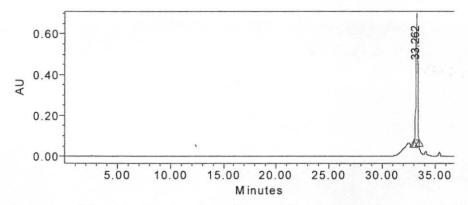
- 102. Parque de Málaga: Asparagus densiflorus myersii. http://parquemalaga.blogspot.com/2010/04/asparagus-densiflorus-myersii.html
- 103. He C, Hsiang T, Wolyn D. "Activation of defense responses to Fusarium infection in Asparagus densiflorus". European Journal of Plant Pathology. 2001: 107: 473–483.
- 104. Alonso AJ, Villarreal ML, Salazar LA, Gómez M, Domínguez F, García A. "Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies". J Ethnopharmacol. 2011: 133: (3):945-72.
- 105. The Essentials of life science research. ATCC. U-937. http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/De fault.aspx?ATCCNum=CRL-1593.2&Template=cellBiology
- 106. Noble PB, Cutis JH. "Separation of blood leukocutes by ficoll gradient". Can. Vet. Tour. 1967: 8: (5): 110-111.
- ATCC. MTT Cell Proliferation Assay Instructions. Catalog Number 30-1010K. http://www.atcc.org/attachments/2273.pdf
- 108. Villavicencio M.A, Pérez B.E, Mendoza E, Maldonado V. "Citotoxicidad en células HELA de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México". Polibotánica, 2008: 026:137-147.
- 109. Wagner H, Bladt S, Zgainki EM. "Plant Drug Análisis. A Thin Layer Chhromatograohy Atlas". Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York Tokio. Printed in Germany. 1984:299-304.
- 110. OECD. Guideline for the Testing of Chemical No. 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. 2001.
- 111. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2002/gm023n.pdf.
- 112. Economic and Medical Plant Research. Volume 5. Edited by H.Wagner, Norman R. Farnsworth. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.

ANEXO. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

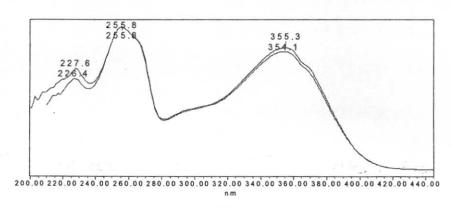
A.1. Identificación de rutina



Cromatograma del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle*. (Pico de rutina en 33.07 min).

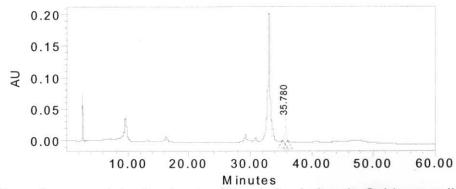


Cromatograma del estándar de rutina Sigma, tiempo de retención 33.26 min.

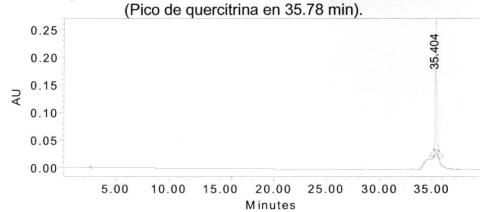


Espectros UV de rutina. Extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* en rojo. Estándar de rutina Sigma en verde.

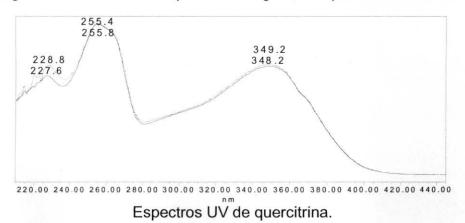
A.1.1. Identificación quercitrina.



Cromatograma del extracto etanólico de las hojas de Schinus molle.



Cromatograma del estándar de quercitrina Sigma, tiempo de retención 35.40 min.



Extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* en rojo. Estándar de quercitrina Sigma en azul.