

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**



Casa abierta al tiempo

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
QUÍMICA MEDICINAL**

**“Evaluación del efecto citotóxico de extractos de *Cuphea aequipetala* Cav. y
Verbena carolina L. sobre líneas celulares cancerígenas”**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. RAÚL CALLEROS FLORES
2163804799**

COMITÉ TUTORAL:

TUTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ

ASESOR:

DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ

NOVIEMBRE 2019

“Evaluación del efecto citotóxico de extractos de *Cuphea aequipetala* Cav. y *Verbena carolina* L. sobre líneas celulares cancerígenas”

COMITÉ TUTORAL:

Vo. Bo.

TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ _____

ASESOR: DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ _____

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ _____

PRESENTA:

Q.F.B. RAÚL CALLEROS FLORES

MATRÍCULA: 2163804799

FIRMA

“Evaluación del efecto citotóxico de extractos de *Cuphea aequipetala* Cav. y *Verbena carolina* L. sobre líneas celulares cancerígenas”

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

Vo. Bo.

PRESIDENTE: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ _____

VOCAL: DRA. SAÉ MUÑIZ HERNÁNDEZ _____

SECRETARIO: DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ _____

PRESENTA:

Q.F.B. RAÚL CALLEROS FLORES

MATRÍCULA: 2163804799

FIRMA

Resumen

Las enfermedades crónicas no transmisibles generan anualmente un 63 % de defunciones y estas se concentran en países con bajo ingreso per cápita. El cáncer se considera una enfermedad crónico-degenerativa, con mayor incidencia en adultos no tratado adecuadamente, puede conllevar a la muerte. El origen del cáncer es multifactorial, influyen factores ambientales y genéticos, su tratamiento terapéutico puede ser con cirugía, radiación o quimioterapia.

La farmacoterapia actual contra el cáncer causa efectos secundarios y reacciones graves en los pacientes y su efectividad no siempre es al cien por ciento, también existen ciertos tipos de cáncer que desarrollan resistencia a la acción farmacológica. Por lo que, se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con actividad anticancerígena que generen tratamientos alternativos. Las plantas usadas en la medicina tradicional son una fuente importante de moléculas con actividad farmacológica, por lo que el propósito de este trabajo fue evaluar la actividad citotóxica de los extractos clorofórmico y metanólico de *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina*.

Se evaluó el efecto citotóxico mediante el ensayo de viabilidad por el método de reducción metabólica de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de los extractos clorofórmico y metanólico de las plantas en estudio, a concentraciones de 6.25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ sobre las líneas celulares C6, DU-145, Hela, SK-LU-1 y SW620, los resultados mostraron que los extractos clorofórmicos de ambas plantas presentan un mayor efecto citotóxico celular a bajas concentraciones, en comparación con los extractos metanólicos.

El mayor efecto citotóxico se encontró en los extractos clorofórmicos de ambas plantas, en el caso de *V. carolina*, se logró aislar un sólido cristalino en la fracción No. 5 (85 % Hexano – 15 % AcOEt) el cual fue analizado mediante IR, RMN y CG/EM logrando así determinar su estructura como β -sitosterol, este compuesto no había sido reportado en esta planta, así mismo, se observó que el precipitado de la fracción 10 de *V. carolina* se observó que posee una excelente actividad citotóxica, por lo que es necesario determinar su estructura.

Agradecimientos institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, así como a la coordinación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 457113, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Agradezco al Dr. Juan Carlos Ruiz Segura por su gran apoyo en la parte de elucidación e interpretación de los resultados obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Agradezco al Dr. Luis Alfonzo Rocha Moreno por su gran apoyo en la estadística desarrollada en el presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Saé Muñiz Hernández y al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por formar parte como mi jurado, así mismo por sus comentarios sobre el desarrollo de este trabajo de investigación, los cuales fueron cruciales para lograr concluirlo.

Así mismo, agradezco a mis asesores los doctores Miguel Ángel Zavala Sánchez, Martín Gómez Hernández y al Dr. Marco Antonio González López por su paciencia y aportes al desarrollo del presente trabajo.

Agradecimientos personales

A Dios por darme tanto en esta vida...

A mis padres María Concepción Flores Rangel y Raúl Calleros Delgado, los cuales son los cimientos de todo lo que soy, gracias por su tiempo, su esfuerzo y su paciencia, gracias por todo su apoyo y amor a lo largo de estos 28 años.

A Toso por estar siempre a mi lado, logramos esto juntos gracias.

A Doña Juanita y a Don Toso, gracias por todo su apoyo y su cariño, saben que los aprecio y quiero mucho.

Al Dr. Zavala gracias por todo su apoyo, sus consejos y su gran amistad la cual atesoro.

A mis compañeros de la maestría, los maestros en ciencias farmacéuticas, Luis Martínez, Blanquita Pérez, Ara Meléndez, Lupita Gonzales, Gaby García y Cynthia Garfias.

A mis compañeros de laboratorio Sergio Salazar, Itzel, Ceci, Maritza y Anabel Cruz, gracias por tus revisiones ortográficas.

Índice:

Resumen	4
Agradecimientos institucionales	5
Agradecimientos personales	6
Tabla de contenidos.....	9
Lista de símbolos y abreviaturas	12
1.- Introducción	14
2.- Marco teórico	15
2.1.- ¿Qué es el cáncer?.....	16
2.2.- El cáncer en el mundo	18
2.3.- El cáncer en México.....	18
2.4.- Causas del cáncer	19
2.5.- Tipos de cáncer	20
2.6.- Diagnóstico del cáncer.....	21
2.7.- Tratamientos para el cáncer	22
2.7.1.- <i>Radioterapia</i>	22
2.7.2.- <i>Cirugía</i>	23
2.7.3.- <i>Quimioterapia</i>	23
2.8.- Las líneas celulares como herramienta para la investigación comprensión y tratamiento del cáncer.....	26
2.9.- Las plantas como uso medicinal	27
2.9.1.- <i>Cuphea aequipetala Cav.</i>	29
2.9.2.- <i>Verbena carolina L.</i>	30
3.- Hipótesis	32
4.- Objetivo general.....	32

5.- Objetivos específicos	32
6.- Material y métodos.....	33
6.1.- Material Vegetal	33
6.2.- Análisis fitoquímico de las plantas <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	33
6.3.- Preparación de soluciones.....	33
6.4.- Obtención de los extractos metanólico y clorofórmico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	35
6.5.- Preparación de las fracciones clorofórmicas de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	35
6.6.- Líneas celulares cancerígenas.....	35
6.7.- Crecimiento celular	36
6.8.- Conteo celular.....	37
6.9.- Evaluación del efecto citotóxico de los extractos clorofórmico y metanólico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	37
6.10.- Porcentaje de inhibición	38
6.11.- Determinación de la IC ₅₀ de los extractos obtenidos	39
6.12.- Fraccionamiento del extracto clorofórmico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	39
6.13.- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y clorofórmicos de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	40
6.14.- Evaluación de toxicidad aguda de los extractos metanólicos y clorofórmicos de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	41
6.15.- Análisis estadísticos de la actividad citotóxica de los extractos y las fracciones de los extractos metanólicos y clorofórmicos de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	41
7.- Resultados y Discusión.....	42
7.1.- Análisis fitoquímico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	42
7.2.- Rendimiento de los extractos metanólico y clorofórmico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	43
7.3.- Obtención de manitol a partir del extracto metanólico de <i>C. aequipetala</i>	44

7.4.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico de <i>C. aequipetala</i>	45
7.5.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico de <i>V. carolina</i>	50
7.6.- Estudio fitoquímico biodirigido.....	54
7.7.- Efecto citotóxico de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de <i>C. aequipetala</i>	61
7.8.- Efecto citotóxico de las fracciones 8, 9 y 12 de <i>V. carolina</i>	63
7.9.- Efecto citotóxico de los precipitados (pp) de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de <i>V. carolina</i>	66
14.10.- <i>Análisis de toxicidad aguda</i>	70
7.10.- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico y metanólico de <i>C. aequipetala</i> y <i>V. carolina</i>	70
8.- Conclusiones	73
9.- Perspectivas	74
10.- Referencias.....	75
11.- Anexos.....	83
11.1.- Valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C para β -sitosterol.....	83
11.2 Curva concentración respuesta del cisplatino.	84
11.3.- Constancia de participación congreso internacional, Roma Italia.....	85

Tabla de contenidos

<i>Figura 1. Cámara de Neubauer, el conteo se realizó en los cuadrantes marcados con la letra (L).</i>	37
<i>Figura 2. Infrarrojo de comparación entre manitol de referencia y compuesto aislado de extracción metanólica de <i>C. aequipetala</i>.</i>	44
<i>Figura 3. Infrarrojo de la fracción número 5, del compuesto en forma de cristales de aguja, aislado de extracción clorofórmica de <i>V. carolina</i></i>	57
<i>Figura 4. Infrarrojo de β-sitosterol reportado en la literatura (Mayakrishnan Prabakaran, Seung-Hyun Kim, Asokan Sasireka, Venkatesan Hemapriya, & Ill-Min Chung , 2017).</i>	57

<i>Figura 5. Asignación de números de carbonos a la estructura de β-sitosterol.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 6. Cromatografía en capa fina de las 14 fracciones obtenidas de V. carolina y revelada mediante el reactivo p-anisaldehído.</i>	<i>59</i>
<i>Gráfica 1. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los extractos clorofórmico y metanólico de C. aequipetala, así como el control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>45</i>
<i>Gráfica 2. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de los extractos clorofórmicos y metanólicos de Cuphea aequipetala, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>46</i>
<i>Gráfica 3. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de los extractos clorofórmico y metanólico de Cuphea aequipetala, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>47</i>
<i>Gráfica 4 Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de los extractos clorofórmico y metanólico de Cuphea aequipetala, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>48</i>
<i>Gráfica 5. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los extractos clorofórmico y metanólico de Verbena carolina, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>50</i>
<i>Gráfica 6. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de los extractos clorofórmico y metanólico de Verbena carolina, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>51</i>
<i>Gráfica 7. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de los extractos clorofórmico y metanólico de Verbena carolina, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>52</i>
<i>Gráfica 8. Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de los extractos clorofórmico y metanólico de Verbena carolina, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>53</i>
<i>Gráfica 9. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de C. aequipetala y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>61</i>
<i>Gráfica 10. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9.10 de C. aequipetala y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>62</i>
<i>Gráfica 11. Efecto citotóxico sobre la línea celular SK-LU-1 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de C. aequipetala y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT..</i>	<i>62</i>
<i>Gráfica 12. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>64</i>
<i>Gráfica 13. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT..</i>	<i>64</i>
<i>Gráfica 14. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT.....</i>	<i>65</i>
<i>Gráfica 15. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los precipitados de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>66</i>
<i>Gráfica 16. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>67</i>
<i>Gráfica 17. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT..</i>	<i>67</i>

<i>Gráfica 18. Efecto citotóxico sobre la línea celular SK-LU-1 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>68</i>
<i>Gráfica 19. Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT.</i>	<i>68</i>
<i>Gráfica 20. Actividad antioxidante de los extractos de C. aequipetala, así como de quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).....</i>	<i>72</i>
<i>Gráfica 21. Actividad antioxidante de los extractos de V. carolina, así como de quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 1.- Fármacos antineoplásicos (Villaseñor & Rogelio., 2009)</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 2 Características de las líneas celulares</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 3. Resultados de las pruebas del análisis fitoquímico, las cuales se interpretan de la siguiente forma: Presencia: Abundante (+++) Moderada (++) Escasa (+) Negativa (-)</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 4. IC₅₀ de los extractos metanólico y clorofórmico de C. aequipetala, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa y SW620.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 5. IC₅₀ de los extractos metanólico y clorofórmico de V. carolina, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa y SW620.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 6. Número de fracciones obtenidas de la separación cromatográfica en columna abierta de C. aequipetala, así como sus respectivas polaridades de elución, con punto las fracciones con factor de retención similar.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 7. Número de fracciones y sus respectivas polaridades a las que se obtuvieron, de la separación cromatográfica del extracto clorofórmico de Verbena carolina, con punto las fracciones con factor de retención similar.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 8. IC₅₀ de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de C. aequipetala, en las líneas celulares C6, DU-145 y SK-LU-1.</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 9. IC₅₀ de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de V. carolina, en las líneas celulares C6, DU-145 y HeLa.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 10. IC₅₀ de la fracción 10 clorofórmica de V. carolina, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa, SK-LU-1 y SW620</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 11. Resultados obtenidos del análisis de toxicidad agua en ratones CD1 por el método de Lorke.....</i>	<i>70</i>
<i>Anexo 1. Valores de desplazamiento químico de ¹H y ¹³C para β-sitosterol, la asignación de señales interpretadas se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales como COSY HSQC y correlaciones HMBC y H2BC, los valores de desplazamiento químico están reportados en δ (ppm).</i>	<i>83</i>

Lista de símbolos y abreviaturas

‰: Porcentaje

°C: Grados Celcius

µg/mL: Microgramos por mililitro

ad libitum: A placer o a voluntad

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50 porciento

IR: Infrarrojo

DL₅₀: Dosis letal al 50 porciento

cm²: Centímetros cuadrados

cisplatino: Cisplatino

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

Fig.: Figura

EM: Espectrometría de Masas

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

mg: Miligramos

mL: Mililitros

MTT: (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico)

INCan: Instituto Nacional de Cancerología

nm: Nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS-1X: Buffer fosfato salino

pH: Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio

pp. precipitado

Rf: Factor de retención

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

UV: Ultravioleta

1.- Introducción

Las enfermedades crónicas no trasmisibles suman anualmente 16 millones de defunciones en humanos, estas se concentran en países con bajo presupuesto económico (OMS, 2017).

Una definición clínica del cáncer la define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular no regulado, que conduce a la invasión de los tejidos circundantes y propagación (metástasis) a otras partes del cuerpo (King, 2006), si no es tratado adecuadamente puede llevar a la muerte (Society American Cancer, 2018). La metástasis es la causa del 90 % de las muertes por esta enfermedad (Valdespino, 2014).

Las características de este padecimiento son que el cáncer se ha tornado una de las enfermedades más mortales y difíciles de tratar. Al analizar las causas, se tiene que los principales agentes cancerígenos son físicos, químicos y biológicos; y la suma de estos a los factores ambientales y genéticos aumentan la posibilidad de desarrollar cáncer (OMS, 2014). El tratamiento común para el cáncer es mediante cirugía, radiación o quimioterapia (Society American Cancer, 2018). El desarrollo científico y tecnológico está en la búsqueda de mejores tratamientos contra el cáncer, que puedan ser dirigidos y más específicos (Quackenbush, 2006).

Como alternativa, la medicina tradicional representa una opción en la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir el cáncer, los cuales podrían ser de menor costo y sin las repercusiones del uso de medicamentos radioactivos, o con menor cantidad de efectos secundarios. La medicina herbolaria es ampliamente utilizada por la población de México y del mundo considerando que las plantas son una fuente importante de moléculas biológicamente activas y que pueden ayudar a combatir el cáncer.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas a los tratamientos y medicamentos existentes en el mercado, en el presente trabajo se estudió el efecto citotóxico de los extractos clorofórmico y metanólico de *Cuphea aequipetala* y *Verbena Carolina*, sobre líneas celulares cancerígenas, dado que el uso de técnicas *in vitro*, es una alternativa al uso de animales de laboratorio, brinda resultados en menores tiempos en comparación con modelos animales y da un acercamiento a los posibles efectos en pruebas *in vivo*.

Las líneas celulares utilizadas fueron, HeLa que corresponden a células humanas epiteliales de cuello uterino, DU-145 células epiteliales humanas de próstata, derivadas de metástasis cerebral; SK-LU-1 son células epiteliales humanas de pulmón, SW620 células epiteliales humanas provenientes de colon, y se utilizó la línea celular C6 fibroblastos murinos de cerebro, con el fin de establecer un panorama frente a los distintos tipos de cáncer que afectan mayormente a la población (Secretaría de Salud, 2018), cáncer de mama, de próstata y cervicouterino, así como en menor proporción el cáncer de colon y pulmón. El propósito de este trabajo fue determinar la actividad citotóxica de los extractos mediante la evaluación de la viabilidad celular por el ensayo de MTT y realizar la separación biodirigida para tratar de aislar, identificar y caracterizar el o los componentes presentes en estos.

2.- Marco teórico

El cáncer es una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo 9.6 millones de muertas en el año 2018, ubicándose entre los primeros lugares de incidencia, el cáncer de pulmón, de mama y de próstata, los tratamientos actuales son invasivos, causan daño al organismo, disminuyen la calidad de vida y en algunos casos son poco eficientes en estadios avanzados de la enfermedad. (International Agency for Research on Cancer, 2018)

Es por esta situación que se buscan nuevas moléculas que posean actividad farmacológica y brinden nuevas posibilidades de tratamientos, que sean menos agresivas con el organismo del paciente, accesibles a la población y de fácil producción, una opción para la obtención de estas moléculas son las plantas.

A lo largo de la historia, se tienen registros del uso de las plantas como medicina para diversos padecimientos, ejemplo de esto es la Biblia, en ella están descritas al menos 200 plantas medicinales y sus aplicaciones, el papiro de Ebers, el cual tiene al menos 3,500 años describe enfermedades y tratamientos a base de plantas (Dominguez, 1979).

El estudio de las plantas medicinales involucra trabajo de campo, el acercamiento con las personas que tienen conocimiento sobre las especies vegetales utilizadas para el tratamiento de enfermedades, es crucial, ya que nos permite obtener el material de

estudio y derivado de las entrevistas, se obtiene información clave, para poder visualizar un probable método de extracción para los posibles compuestos activos de las especies vegetales.

Las plantas poseen metabolitos secundarios, los cuales son sustancias que pueden tener un efecto terapéutico para el ser humano, estos metabolitos también reciben el nombre de constituyentes químicos, los cuales pueden ser inertes, aquellos que solo brindan aromas, colores o sabores, mientras que los activos son aquellos que poseen actividad farmacológica y son responsables de efectos terapéuticos, por lo cual deben extraerse y purificarse (Valencia Ortiz, 1995).

2.1.- ¿Qué es el cáncer?

Cualquier crecimiento tisular producido por células anormales y con la capacidad de extenderse a otros tejidos es considerado un cáncer, (Society American Cancer, 2018) la teoría genética, propone que las mutaciones en el genoma del individuo, son las que ocasionan la enfermedad, a diferencia de la teoría epigenética sugiere que las alteraciones metabólicas son las causantes de inducir la expresión de genes que originan el cáncer (Boticario y Angosto, 2008). Se sabe que es una enfermedad genética, ya que puede ser rastreada hasta partes muy específicas en los genes en el individuo sin embargo, en la mayor parte de los casos la enfermedad no es heredada, ya que las mutaciones surgen principalmente en las células somáticas del sujeto afectado, estas alteraciones producen células con crecimientos totalmente descontrolados, los cuales producen tumores o formaciones celulares irregulares, estas afectan tejidos circundantes y ocasionando un mayor deterioro en el organismo (Karp, 2011).

Los cánceres son considerados crecimientos clonales, debido a que todas las células derivan de una sola célula ancestral, el tumor primario siempre comienza de esta única célula y llegará el momento en el cual alguna o algunas células escaparán y viajarán a través de la sangre o la linfa, produciendo la contaminación de otros tejidos en el paciente, produciéndose la metástasis (Boticario y Angosto, 2008).

Las células cancerosas, tienen características muy distintivas en comparación con las células normales que componen el organismo humano (Hanahan y Weinberg, 2011), las cuales son:

1. Mantenimiento de la señalización proliferativa.
2. Evasión de supresores del crecimiento.
3. Resistencia a la muerte celular.
4. Inmortalidad replicativa.
5. Inducción de la angiogénesis.
6. Activación de la invasión y la metástasis.
7. La reprogramación del metabolismo energético
8. La evasión del sistema inmune.

Las células no cancerosas tienen una excelente regulación en cuanto a sus mecanismos de crecimiento, asegurando de esta forma, una homeostasis celular en tiempo y forma, lo cual conlleva una correcta estructura, cantidad y función de tejidos normales, mientras que las células cancerosas se vuelven sus propios jefes y dueños de esta regulación, estas señales son transmitidas por factores de crecimiento, los cuales en su mayoría son sustancias de tipo proteica que conllevan funciones de suma importancia en la célula, como la comunicación intracelular y el ciclo celular, esto mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada a la fase (G1); Los cuales se unen a receptores en la membrana celular, que en su mayoría contienen dominios de tirosina-cinasa intracelular, estos se encargan de emitir señales a través de vías de señalización intracelular y así aumentar su crecimiento, alterando de igual forma su supervivencia celular y el metabolismo energético (Wertz, 2010).

Las células cancerosas pueden adquirir la capacidad de producir sus propios ligandos de factor de crecimiento, controlando de forma autocrina su crecimiento, de igual forma pueden enviar señales para estimular a células vecinas no cancerosas y de esta forma obtener factores de crecimiento, otra forma es elevando la cantidad de receptores en la membrana celular para poder captar factores de crecimiento en mayor medida (Lipinski, 1999).

2.2.- El cáncer en el mundo

La agencia internacional para la investigación en cáncer, indica que uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres, desarrollarán cáncer en alguna etapa de su vida, así mismo uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres morirán por esta afección (International Agency for Research on Cancer, 2018).

Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identifica que, a nivel mundial en 2017, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, pulmón, cuello del útero y estómago (OMS, 2017)

A nivel mundial, 63 % de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles (ENT) que son crónicas y progresan lentamente; los tipos principales de ENT son: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas, la diabetes y el cáncer, que juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año de las cuales 75 % se concentran en países de bajos y medios ingresos per cápita (OMS, 2017).

2.3.- El cáncer en México

En México el cáncer es la tercera causa de muerte, fallecen por esta enfermedad 14 de cada 100 mexicanos y la expectativa de vida de quienes la padecen es de alrededor de 63 años (Secretaría de Salud, 2018).

Durante el foro Cáncer, Desafíos en México y América Latina se indicó que los tumores malignos más frecuentes en México son: el cáncer de mama, con 20 mil casos, 14 mil de próstata y cervicouterino, y más de 8 mil casos de colon y pulmón (Secretaría de Salud, 2018), coincidiendo con las estadísticas reportadas a nivel mundial, al ser un problema que afecta a una parte importante de la sociedad; el desarrollo de tratamientos ha ido evolucionando y permitiendo que los pacientes tengan una mejor sobrevida ante esta enfermedad.

2.4.- Causas del cáncer

El organismo humano tiene la capacidad de lidiar con constantes mutaciones en el genoma, estas mutaciones son normales hasta cierto punto y su origen es debido a diversas situaciones a las que se ve expuesto el individuo en su día a día, ejemplo de esto es la comida que ingiere, la radiación del sol al cual se expone, la exposición a los equipos de su quehacer diario como celulares, hornos de microondas o radiaciones naturales como al volar en un avión.

Estas capacidades del organismo son: (Boticario y Angosto, 2008).

- La capacidad replicativa finita de las células, lo cual permite que estas siempre mantengan un número bien controlado y evitar formaciones de tumores.
- La gran cantidad de sistemas de detección y reparación de material genético dañado.
- La apoptosis o muerte celular programada.
- La eficacia de nuestro sistema inmune para detectar y erradicar la formación de tumores.

Cuando ocurre un desajuste en la célula, principalmente durante el proceso de división y crecimiento se tendrá como repercusión el surgimiento de cáncer en el organismo con esta condición, si las células, se dividen demasiado rápido y antes de haber logrado su tamaño ideal, las células serán demasiado pequeñas como para funcionar correctamente, por otra parte si estas no se dividen a un buen ritmo y alcanzan un tamaño superior al idóneo de igual forma operarán de forma incorrecta y por ende existirá una baja producción celular (Lodish, 2016).

En la mayoría de los casos el cáncer no es heredado, más bien las mutaciones ocurren a nivel somático en la célula del individuo con la afectación ya sea en el ciclo celular o en los procesos de regulación, estas mutaciones son de origen multifactorial, se desconoce aún cuál puede ser la causa detonante para esta afección.

La investigación en oncogenes ha permitido determinar que todos los cánceres provienen de la acumulación de mutaciones en el genoma del individuo, los cuales controlan la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular, a la vez, estos procesos se

agrupan en oncogenes y genes supresores de tumores, estas mutaciones son multifactoriales y variarán entre individuos (Boticario y Angosto, 2008).

El cáncer es causado mayormente por factores externos, tales como el tabaco, organismos infecciosos, dieta poco saludable y factores internos del organismo, tales como mutaciones genéticas, hormonas, y condiciones inmunes.

Estos factores pueden actuar juntos o en secuencia para producir cáncer. Diez años o más pueden transcurrir entre la exposición a los factores externos y la detección del cáncer (Society American Cancer, 2018). Por el contrario, existen diferentes tipos de cáncer, los cuales requieren de solo algunos meses para presentar sintomatologías clínicas en el paciente, por lo cual el tiempo es totalmente aleatorio cuando de cáncer se trata.

Se calcula que el consumo de tabaco se relaciona con 20 % de las muertes por cáncer a nivel mundial, por lo que se considera como la principal causa prevenible de esta enfermedad en el mundo; por otro lado, la quinta parte de los casos se deben a infecciones crónicas como el virus del papiloma humano, vinculado al cáncer de cuello de útero, y la hepatitis B relacionada al cáncer hepático (OMS, 2014).

Sea cual sea la causa del cáncer, este siempre seguirá tres fases, las cuales son iniciación, promoción y proliferación; en la primera etapa, el ADN sufre una mutación, posteriormente se activarán oncogenes, o en su caso a la desactivación de genes supresores de tumores los más comunes son Kras y p53, en la promoción, existe un aumento en la proliferación celular y un descenso en la apoptosis, esto sumado a procesos inflamatorios y a algunas citosinas que promueven el proceso se llega al último estadio, la progresión tumoral, en donde el tumor aumenta su tamaño y se lleva a cabo la invasión y metástasis (Boticario y Angosto, 2008).

2.5.- Tipos de cáncer

Se pueden identificar en tres grupos principales: los *sarcomas*, los cuales proceden de tejido conectivo como nervios, huesos, vasos sanguíneos, músculos, cartílagos y tejido adiposo, los *carcinomas*, los cuales proceden de tejido epitelial, como la piel o los epitelios, estos se caracterizan ya que tapizan las cavidades y los órganos así como los

tejidos glandulares, ejemplos de estos serían los tejidos glandulares de la próstata y las mama, y en último subtipo se encuentran las *leucemias* y *los linfomas*, los cuales surgen de los tejidos formadores de las células sanguíneas, estos son considerados los cánceres más agresivos, ya que invaden rápidamente los ganglios linfáticos, la medula ósea y desencadenan sobreproducción de células blancas inmaduras, estos sistemas de clasificación empleados para determinar y organizar los tipos de cáncer son planteados en reuniones periódicas de expertos en la materia, los principales sistemas de clasificación clínica de los tumores corresponden a la del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Valdespino, 2014). Esta clasificación incluye el avance de la enfermedad, el agrupamiento, los sitios u órganos específicos, así como los aspectos histopatológicos y en algunos casos biomarcadores celulares y moleculares.

Cualquier parte del cuerpo es susceptible de verse afectada, de forma tal que existen más de 100 tipos de cánceres, no hay una causa directa que origine su aparición (Plumer, 2012).

2.6.- Diagnóstico del cáncer

La patología, es el estudio de la naturaleza y las características de la enfermedad, de ella se pueden determinar, su morfología y sus alteraciones funcionales, por lo general la forma para la detección del cáncer son las biopsias.

La patología clínica es la rama de la anatomía humana encargada de determinar el tipo de procesos neoplásicos, en algunos casos, estas formaciones son benignas, aunque puede existir la posibilidad de que existan crecimientos malignos llamados cáncer.

Para analizar, este tipo de crecimientos es necesario que dicha lesión sea estudiada patológicamente, por lo cual es necesario extraer una pequeña muestra de dicho tejido para ser examinada por un patólogo experto en oncología, el cual determinará el tipo y estadio de la enfermedad (Villaseñor y Rogelio, 2009).

Este tipo de biopsias pueden ser de cuatro tipos: las biopsias de tipo incisional, en las cuales se retira una porción de la lesión para estudiarla y las biopsias de tipo excisionales, las cuales retiran en su totalidad la lesión, para ser examinadas por un patólogo, por lo general estos tejidos son fijados en cera y cortados en finas capas por medio de un

microtomo, para después ser fijadas en portaobjetos y analizadas en microscopio por un ojo experto, las biopsias de aspiración, en las cuales se aspira cierta cantidad de células o tejidos de un área dañada por medio de una aguja, así mismo la biopsia con aguja, la cual consiste en extraer un pedazo completo de tejido, al finalizar este estudio se obtiene una porción cilíndrica del tejido dañado el cual es analizado por un patólogo oncólogo.

2.7.- Tratamientos para el cáncer

Los tratamientos más utilizados en la medicina, son cirugía, radiación, quimioterapia debido a que son viables económicamente para los centros de salud en la mayoría de los países y sus expectativas son en algunos casos las mejores (Society American Cancer, 2018), sin embargo es importante aclarar que el tratamiento siempre dependerá de la etapa en la que se encuentre la enfermedad, la cirugía, siempre es el método idóneo para el tratamiento del cáncer, siempre que este se encuentre en las primeras etapas de su desarrollo, si el cáncer se encuentra en etapas avanzadas es imposible recurrir a la cirugía debido a la complejidad que involucra el retirar el tejido dañado sin lesionar órganos cercanos., por lo que la quimioterapia es el método más conveniente en estos casos (Public Healt England and Cancer Research UK, 2017).

2.7.1.- Radioterapia

La radioterapia es una rama de la medicina la cual usa radiación ionizante como tratamiento para erradicar el cáncer, esto mediante elementos naturalmente radiactivos o bien mediante aceleradores de partículas.

Este tipo de tratamientos deben seguir tres pautas fundamentales (Gaona, 1999).

1. Óptimo control del área o la zona a tratar con radiación.
2. Máxima preservación anatómica y funcional de los órganos y tejidos.
3. Mínima frecuencia de complicaciones y secuelas.

Estas terapias deben ser sumamente seguras para el paciente, a fin de reducir los efectos colaterales que pueden desarrollar debido a la exposición a estas radiaciones, es por lo que existen programas de garantía de calidad, las cuales aseguran que el paciente reciba $\pm 5\%$ de la dosis prescrita por el oncólogo esto mediante aceleradores de partículas y

unidades de cobalto 60; si la dosis excede el 5 % el paciente podría formar necrosis en las células que recibieron el tratamiento, mientras que si la dosis es menor al 5 % se pueden presentar recurrencias y metástasis, ambos errores en la dosis son graves (Gaona, 1999).

La medicina nuclear forma parte de estas estrategias contra el cáncer, este consiste en administrar al paciente vía oral, intramuscular o intravenosa un elemento radioactivo para emitir radiación desde el interior del paciente, se usan radioisótopos con una vida media muy corta, incluso de solo unas h, esto para llevar un control de la radiación a la que se someterá el paciente, el más común es el Yodo-131 (¹³¹I) y generalmente es usado para el tratamiento de cáncer de tiroides o hipertiroidismo (Gaona, 1999).

2.7.2.- Cirugía

La cirugía es el tratamiento más antiguo para el cáncer, gracias al mejoramiento de las técnicas con el pasar de los años, la cirugía se ha transformado de una mutilación a una cirugía conservadora y selectiva del padecimiento del paciente.

No todos los pacientes con cáncer son candidatos para la cirugía, esto debido a la localización y extensión de la enfermedad, si bien la cirugía es la forma predilecta para la eliminación del cáncer, esta puede llegar a ser sumamente riesgosa para el paciente; así mismo, esta debe coadyuvar con una serie de tratamientos paliativos como la quimioterapia y la radioterapia para asegurar la no reincidencia del cáncer en el paciente.

Existen metodologías clínicas antiguas, que aún son vigentes hasta la actualidad para algunos tipos de cirugías, esto debido a su complejidad y al daño que existe en el organismo del paciente, sin embargo, existen cirugías que han sido modificadas radicalmente debido a los avances en tecnología y en el conocimiento de la enfermedad (Villaseñor Rogelio, 2009)

2.7.3.- Quimioterapia

Las primeras quimioterapias surgen de los derivados del gas mostaza, la ciclofosfamida (CITOXAN), la cual forma un enlace covalente con el ADN, lo cual lleva a la apoptosis celular (Bradbury, 2007). Posteriormente el metrotexato, análogo del folato logrando

obtener así el metrotexato (Bradbury, 2007) y hasta la década de los años 50's que se descubre el 5-fluorouracilo (ADRUCIL) y en la década de los años 1960, una sal de platino derivada de los electrodos, el cual forma enlaces coordinados entre el complejo de platino y las bases de purina del ADN (Bradbury, 2007).

Es así como existen distintos tipos de tratamientos quimioterapéuticos frente al cáncer, algunos impiden que las células se reproduzcan dañando su ADN, tienen efecto en todas las etapas del ciclo celular mejor conocidos como agentes alquilantes, estos, estos medicamentos son muy utilizados en una gran variedad de cánceres, incluyendo cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de ovario, así como leucemia, mielomas múltiples y sarcomas.

Algunos ejemplos de los fármacos antineoplásicos más usados contra el cáncer se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Fármacos antineoplásicos (Villaseñor Rogelio, 2009)

Tipo y clase de agente	Fármaco	Acción
Antimetabolitos		
Antagonistas del ácido folínico	Metotrexato Trimetrexato Raltritexed	<p>Otro tipo de medicamentos son los llamados antimetabolitos, los cuales interfieren con la replicación del ADN, sustituyendo los elementos fundamentales de estas moléculas, estos medicamentos son ampliamente usados en leucemias, cáncer de mama, cáncer de ovario y cánceres de tipo gastrointestinales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Actúan directamente sobre la disponibilidad de los precursores requeridos para la síntesis del ADN. • Inhiben la dihidrofolato reductasa. • Actúan únicamente en la fase S del ciclo celular. <p>Bloquean la producción de N-metiltetrahidrofolato reducido, el cual es necesario para la síntesis de purinas y ácido timidílico.</p>
Análogos de la pirimidina	5-Fluorouracilo Capecitabina Floxuridina Citarabina Gemcitabina	
Análogos de purinas	Clabribina Fludarabina Mercaptopurina Pentostatina Tioguanina	

Continuación de Tabla 1.- Fármacos antineoplásicos (Villaseñor y Rogelio, 2009)

Tipo y clase de agente	Fármaco	Acción
Agentes alquilantes		
Mostaza nitrogenada	Ciclofosfamida Ifosfamida Melfalán Mecloretamina Clorambucilo Estramustina	<p>Estos medicamentos, al dañar el ADN pueden afectar a las células de la médula ósea, estas células son las formadoras de células sanguíneas y en algunos casos pueden ocasionar leucemia, este riesgo tiene una relación directa con la dosis y el tiempo en el que se administra al paciente, son ampliamente usados en distintos tipos de cáncer, como leucemias, mielomas y sarcomas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forman enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y moléculas nucleofílicas del ADN dañándolo. • Ejercen acción en todas las fases del ciclo celular.
Alquil sulfonato	Busulfán	
Derivado de la etilendiamina	Tiotepa	
Sal de metal (minerales)	Carboplatino Cisplatino Oxaliplatino	
Triazeno	Decarbazina	
Nitrosourea	Lomustina Semustina Carmustina Estreptozotocina	
Antibióticos antitumorales		
Antraciclinas	Daunorubicina Doxorrubicina Epirubicina Idarubicina Bleomicina Dactinomicina Mitomicina Mitoxantrona	<p>Estos fármacos modifican la expresión del ADN de las células cancerosas, impidiendo la reproducción de estas, un ejemplo claro de estos medicamentos son las antraciclinas, las cuales interfieren con las enzimas involucradas en la replicación del ADN durante su ciclo celular (American Cancer Society, 2019).</p> <p>Sin embargo, estos medicamentos tienen una reacción adversa muy característica, la cual es el daño cardíaco, si estos son administrados en concentraciones altas.</p>
Productos naturales		
Alcaloides de la vinca	Vinblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	Actúan inhibiendo la polimerización de los microtúbulos.
Antimicrotubulos	Docetaxel	Actúan impidiendo la despolimerización de los microtúbulos.
Enzimas	Asparaginasa	La asparaginasa, crea una deficiencia de L-asparagina la cual sirve como base para la síntesis de proteínas, por lo cual existe una inhibición en la síntesis de ADN y ARN.

Inhibidores de la topoisomerasa I	Irinotecán Topotecán	<ul style="list-style-type: none">• Impiden el desenrollamiento del ADN.
Inhibidores de la topoisomerasa II	Etopósido Tenipósido	<ul style="list-style-type: none">• Interfieren con las enzimas del mismo nombre, las cuales ayudan a separar las hebras del ADN para que no se puedan copiar, por lo general, estos fármacos son usados para leucemias, cáncer de pulmón, de ovarios, así como gastrointestinales.• Los inhibidores de la topoisomerasa II pueden aumentar el riesgo de la reaparición de un cáncer (leucemia mieloide aguda), en un plazo de 2 a 3 años después de administrado el medicamento (American Cancer Society, 2019).

2.8.- Las líneas celulares como herramienta para la investigación comprensión y tratamiento del cáncer

La búsqueda de nuevas moléculas de interés farmacológico frente al cáncer es un campo vigente y de interés. Para llevar a cabo la evaluación de estas moléculas, es indispensable recurrir a la valoración del efecto citotóxico *in vitro*, herramienta válida y útil en los inicios de una investigación cuando los compuestos son seleccionados para continuar con ensayos más elaborados y específicos. Estas evaluaciones son llevadas a cabo en líneas celulares, las cuales brindan resultados que sirven de apoyo a la investigación y dan un panorama con sustento científico sobre los compuestos que se prueban (León, Gómez, Morantes, Cordero, y Ancízar, 2006).

Para dar solidez a los resultados, es indispensable contar con un panel de líneas celulares que sea representativo y variado y de esta manera determinar la sensibilidad de las líneas celulares a los agentes citotóxicos lo que permitirá continuar con investigaciones más profundas, para seleccionar los compuestos con potencial actividad anticancerígena. El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) por sus siglas en inglés, estableció un programa de detección de agentes citotóxicos, el cual cuenta con un panel de 60 líneas celulares (NCI-60), las cuales funcionan como un modelo de cáncer *in vitro* (Takimoto, 2003).

Con este panel de cribado celular, se han probado un sinnúmero de compuestos para determinar si son o no de interés farmacológico contra el cáncer, generando así perfiles

de sensibilidad, los cuales permiten plantear hipótesis sobre sus mecanismos de acción, así mismo permiten contrastar actividades anticancerígenas entre los compuestos existentes y los posibles nuevos compuestos (Sausville y Johnson, 2000).

Estos modelos de líneas celulares han funcionado y han permitido obtener datos de interés como los posibles mecanismos de acción de los compuestos probados, generando información que puede ser útil para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer o bien, siendo terapias complementarias. (Yamori, 2003).

Las líneas celulares HeLa las cuales corresponden a células humanas epiteliales de cérvix; son el linaje celular más antiguo de la humanidad y las más usadas en los laboratorios de investigación, si bien no pertenece al catálogo NCI-60, han sido de suma importancia para un sinnúmero de investigaciones, una de las más importantes fue el desarrollo de la vacuna contra la poliomielitis realizado por el doctor, Jonas Salk (Turner, 2012)

La línea DU-145 pertenece al catálogo NCI-60 y es procedente de células epiteliales humanas de próstata, derivadas de metástasis cerebral, son ampliamente usadas en el campo de la investigación debido a su capacidad metastásica y debido a que no expresan antígenos específicos de próstata, sin embargo poseen un receptor androgénico positivo, la función principal del receptor de andrógenos es el de unirse a factores de transcripción que regulan la expresión genética de diversas proteínas (Alimirah, Chen, Basrawala, Xin, y Choubey, 2006); (Stone, Mickey, Wunderli, Mickey, y Paulson, 1978)

La línea SK-LU-1 de células epiteliales humanas de pulmón, SW620 células epiteliales humanas provenientes de colon y pertenece al catálogo NCI-60, la línea celular C6 fibroblastos murinos de cerebro, permiten de alguna manera establecer un panorama frente a los distintos tipos de cáncer que afectan mayormente a la población mexicana según la (Secretaría de Salud, 2018)

2.9.- Las plantas como uso medicinal

A lo largo de la historia las plantas han proporcionado al ser humano una cantidad innumerable de beneficios, como son la alimentación, la prevención e incluso el tratamiento de ciertas enfermedades, las plantas han estado con el ser humano a lo largo

de toda su existencia y gracias a esta convivencia el hombre ha logrado sacar ventaja de todas las propiedades de estos materiales vegetales, es por lo que organizaciones internacionales e innumerables investigadores, han puesto clasificaciones y definiciones de estas.

Desde 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió como plantas medicinales a cualquier vegetal que contenga sustancias que puedan ser empleadas para propósitos terapéuticos o de las cuales se pueden aislar compuestos que sirvan como modelos precursores para la síntesis de nuevos fármacos, concepto que sigue en la actualidad (Cañigüeral, Dellacassa, y Bandoni, 2003).

La mayoría de las plantas poseen metabolitos secundarios en su composición química, estos son usados por las mismas para un sinnúmero de funciones, como protectores contra depredadores, ya sea por el color que presentan, el mal sabor o la toxicidad al ser ingeridas, el aroma que emiten, entre otros, ejemplo de estos metabolitos secundarios pueden ser alcaloides, glucósidos, enzimas, hormonas, vitaminas, etc.

Estos metabolitos secundarios son los responsables de diferentes efectos terapéuticos en el ser humano y a lo largo de la historia ha sido posible dilucidar la estructura e incluso sintetizar moléculas con actividad farmacológica (Durán Palma, et al, 2014)

Las plantas usadas para aprovechar estos metabolitos son llamadas plantas medicinales, las cuales nos brindan beneficios gracias al conocimiento heredado de generación en generación, han sido veneradas y utilizadas en rituales, la gran mayoría de las cuales no necesariamente tiene un sustento científico comprobado (Rossato, Budó, Alvim, Zanetti, y Heisler, 2012).

Se han logrado importantes avances en las metodologías de aislamiento, purificación y elucidación de compuestos, lo cual ha permitido estudiar con mayor profundidad los beneficios que pueden aportar en el campo de la salud. También ha existido un desarrollo en los ensayos que permiten detectar una gran gama de actividades biológicas, lo que ha llevado a estandarizar los extractos con base en los compuestos presentes en la planta que pueden ser identificados y que pueden o no ser los responsables del efecto farmacológico en el organismo (Chiriboga, 2003).

2.9.1.- *Cuphea aequipetala* Cav.

Es una planta perenne, herbácea o subfrutescente, hasta de 1 m de largo, aunque por lo común 40 cm de altura. Es la especie más común, ampliamente distribuida en el Valle de México en altitudes entre 2,250 y 3,200 m en variados hábitats: matorrales, pastizales, bosques, con preferencia en lugares perturbados, en ocasiones comportándose decididamente como maleza arvense o ruderal en Coahuila y Nuevo León hasta Honduras (Rzedowski, 2005).

Sus tallos están cubiertos por vellosidad, de igual manera, en la cara inferior de las hojas, estas son en forma ovalada, acuminadas, cortamente pecioladas y opuestas, casi dísticas, las flores se producen en racimos solitarios con un cáliz ventrudo y veloso, surcado longitudinalmente, corola irregular, y de color violáceo (Martínez M. , 1967).

Se le denomina popularmente entre otros nombres, como: “alcancer, alfilerrillo, apancholoa (náhuatl), atlanchán, cachanchillo, cordón de San Francisco guinda, hierba del ángel, hierba del cáncer, flor morada calavera, miel de abeja, mirto, mirto morado, moyote, pantillo, pelatito, percha del abejorro, petalito, rama roja, topo de indias, tripa de tuza, nochleb vonon, tzoyleb vonon, tzojob vonon (maya), violeta, x’cuan de la (zapoteca) (Waizel, Martínez, Villarreal, Alonso, y Pliego, 2003)

C. aequipetala es ampliamente usada en México como un antidiarreico, así mismo, para dolores estomacales y en algunas partes para el tratamiento del cáncer, de ahí que uno de sus nombres sea hierba del cáncer o “Tozancuitlacxolli” en náhuatl, también es usada para tratar condiciones dermatológicas, inflamación, problemas gastrointestinales, paperas y heridas (Martínez M. , 1994).

De *C. aequipetala* se han realizado estudios para demostrar la eficacia esta planta en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, reportando una concentración mínima inhibitoria frente a *Helicobacter pylori* del extracto acuoso de 125 µg/mL y del extracto metanólico mayor de 500 µg/mL (Castillo-Juárez, et al, 2009).

Se han reportado concentraciones muy altas de compuestos fenólicos y flavonoides en la *C. aequipetala*, 62.79 mg equivalentes de ácido gálico y 196.83 mg equivalentes de quercetina en hojas secas (Cárdenas, et al. 2012).

Martínez, 1967 reporta para *C. aequipetala*, la presencia de ácido tánico en un 5.35 %, glucosa, principios pécticos, dextrina y sus análogos, así como almidón. Estudios preliminares demuestran que la planta posee glicósidos y lactonas sesquiterpénicas, estas últimas mostraron una ligera acción citotóxica sobre la línea celular de cáncer de cérvix (cuello uterino) (UISOSQC1). (Waizel, et al, 2003)

2.9.2.- *Verbena carolina* L.

Es una planta que tiene varios nombres comunes como verbena, hiervena, ajeno grande, hierba de San José, hierba de San Juan, nardo de campo, Santa María, y verbena del perro, así mismo, existen sinonimias científicas *Verbena biserrata* Kunth, *Verbena caroliniana* Willd, *Verbena mollis* Mart. et Galeotti, *Verbena polystachya* Kunth, *Verbena varonicaefolia*. Se encuentra ampliamente distribuida en el Valle de México, con excepción de la parte noreste, donde parece ser esporádica (Peralta, 2008).

Es una planta hispida con pelos largos combinados con pubescencia tomentosa, o bien, glabrada; raíz generalmente gruesa, leñosa; tallo por lo común ramificado, ascendente, rastrero o procumbente en ocasiones sarmentoso, de color rojo oscuro o morado; hojas opuestas, flores interpeciolares, pedicelos de 1 a 6 mm de largo, con un par de bracteolas pequeñas cerca de su ápice; tubo calicinal morado o verdoso, de 1.3 a 2.3 mm de largo, con 6 dientes cortos en el borde superior, poco giboso en la base; tiene 6 pétalos, unguiculados, de color morado oscuro, desiguales, de alrededor de 0.5 cm de largo los pequeños y de 0.8 a 1 cm de largo los más grandes, aunque en ocasiones los 6 pétalos son subiguales y miden 0.5 a 1 cm de largo; estambres 11, filamentos glabros o algunos un poco pubescentes, óvulos 10 a 15; cápsula elipsoide, de unos 8 mm de largo, conteniendo alrededor de 5 semillas desarrolladas, ovoides, más bien aplanadas, de unos 2 mm de largo (Rzedowski y Calderón, 1992).

En el caso de la familia Verbenaceae es una de las más importantes en cuanto a la medicina tradicional en México, ya que presentan en su mayoría fenoles y flavonoides. *Verbena carolina* tiene reportados niveles de flavonoides de 17.89 ± 0.54 mg de apigenina en tejido seco, así como niveles fenólicos de 32.45 ± 0.61 mg de ácido gálico, presenta poder reductor de metales de 3.84 ± 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una capacidad antioxidante total de 4.25 ± 0.22 mg de equivalentes de ácido ascórbico (Ávila-Reyes, et al, 2016).

Las hojas de *Verbena carolina* son ampliamente usadas en regiones de México para el tratamiento de enfermedades biliares, y se reporta que protege parcialmente la actividad de la gamma-glutamyl-transpeptidasa en un modelo murino de daño hepático inducido con CCl₄ (Favari-Perozzi, Nava-Álvarez, y Meléndez-Camargo, 2007), así mismo (Castro, Pérez-Guil, y Madrigal, 1991) reportan las siguientes características de la planta en base seca: un 19% de proteína cruda, 3.6% de extracto etéreo, 10% de fibra cruda, 10.2% de cenizas y 57.2% de extracto libre de nitrógeno, reporta concentraciones de calcio, fósforo y hierro de 1686 mg/100 g, 206 mg/100 g y 21 mg/100 g, respectivamente; en cuanto al contenido en riboflavina de 1.24 mg/100 g; de lignina 10.53%; así mismo reporta digestibilidad in vitro de 72.12 %. No detectaron factores tóxicos excepto taninos en una concentración de 1.24 mg/100 gramos, por lo anterior *V. carolina* puede considerarse para la alimentación de rumiantes en la zona donde crece esta planta.

(Lara-Issasi, y otros, 2019) reportan la presencia de ácido ursólico, hispidulina, verbenanina, hastatósido, verbascósido, hispidulina 7-O-β-D-glucopiranosido y pectolinarigenina-7-O-α-D-glucopiranosido.

C. aequipetala y *V. carolina* son ampliamente usadas en el estado de México, esto se sabe gracias a la investigación de campo llevada a cabo durante la recolección de los ejemplares vegetales, en la cual los habitantes, refieren que *V. carolina* “Hierbena” y *C. aequipetala* “flor morada” como ellos las nombran, poseen actividad contra el cáncer, estas plantas son recolectadas por los habitantes y se administran en té o como agua de día.

3.- Hipótesis

Los extractos metanólico y clorofórmico de las plantas *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina* presentarán actividad citotóxica en líneas celulares, y evaluando la actividad citotóxica de las fracciones cromatográficas se obtendrá el o los compuestos con la mayor actividad, que podrán ser aislados y posteriormente identificados estructuralmente por medio de técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

4.- Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica de los extractos clorofórmico y metanólico de *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina* en líneas celulares de cáncer y realizar el estudio fitoquímico de los extractos para identificar la fracción o los componentes más activos.

5.- Objetivos específicos

1. Obtener los extractos clorofórmico y metanólico de las partes aéreas de las plantas *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina*.
2. Realizar una marcha fitoquímica para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las plantas.
3. Realizar el estudio biodirigido de los extractos vegetales, evaluando el efecto citotóxico en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa, SK-LU-1, SW620.
4. Separar los componentes de los extractos con actividad citotóxica, utilizando la cromatografía en columna abierta.
5. Identificar las fracciones cromatográficas que contienen compuestos con mayor actividad citotóxica.

6.- Material y métodos

6.1.- Material Vegetal

Las partes aéreas (tallos y hojas), de *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina* se colectaron el 31 de julio del 2017 en la localidad de "San Antonio Pueblo Nuevo" 19°32'26.8"N 100°02'59.1"W que está situada en el Municipio de Ixtlahuaca, estado de México y se autentificaron por el taxónomo M. en C. Santiago Xolalpa con el número 16402 y 16404 respectivamente; los especímenes se depositaron en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del Centro Médico Siglo XXI. Las partes aéreas de las plantas se secaron a la sombra y posteriormente se tritularon.

6.2.- Análisis fitoquímico de las plantas *C. aequipetala* y *V. carolina*

El material vegetal, se sometió a pruebas fitoquímicas para determinar la presencia de grupos hidroxilo, así como de metabolitos secundarios, siendo estos, compuestos fenólicos, carbohidratos, terpenos y alcaloides de acuerdo con lo descrito por (Harbone, 1998). Se colocaron 5 g de planta molida y se adicionaron 10 mL de una solución de HCl 1 N, posteriormente se dejaron macerar por 15 minutos, se filtró en papel Walkman 0.5 mm; de esta solución se tomó 1 mL y se adicionaron 5 gotas de cada reactivo por cada prueba, los reactivos se prepararon de la siguiente manera:

6.3.- Preparación de soluciones.

Alcaloides:

Reactivo de Wagner: se disolvió en un matraz volumétrico de 100 mL. 1.27 g de yodo más 2 mg de yoduro de potasio, con 20 mL de agua, la solución se llevó a volumen de 100 mL con agua destilada, las reacciones positivas a alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.

Reactivo de Dragendorff: se preparó, disolviendo 8 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 al 30 % y 27.2 g de KI en 50 mL de agua, se mezclaron las dos soluciones aciduladas y se dejaron reposar por 24 h. Se decantó la solución y se llevó a volumen con agua a 100 mL. Las reacciones positivas a alcaloides forman precipitados anaranjados-marrones.

Reactivo de Hager: fue una solución saturada de ácido pícrico en agua destilada.

Reactivo de Bertrand: Se disolvieron 12 g de ácido silicotúngstico en agua destilada y se aforó a 100 mL.

Reactivo de Mayer: se preparó realizando dos soluciones, la primera adicionando 1.36 g de cloruro mercúrico en 60 mL de agua, la segunda se preparó adicionando 5 g de yoduro de potasio, se mezclaron ambas soluciones y se llevaron a volumen de 100 mL con agua destilada.

Reactivo de Ehrlich: Se preparó disolviendo *p*-dimetilamino benzaldehído al 1 % en etanol y se adicionó cloruro de hidrógeno, en presencia de alcaloides, se forma una coloración naranja.

Azúcares reductores:

Para la determinación de azúcares reductores, se utilizaron los reactivos de Fehling, los cuales se prepararon adicionando 35 g de sulfato de cobre y aforando con 1 L de agua destilada. La segunda solución, se preparó adicionando 150 g de sal de Seignette o tartrato mixto de potasio y sodio a una solución de hidróxido de sodio al 40 % y aforando a 1 L con agua destilada.

El ensayo de Benedict permitió el reconocimiento de carbohidratos reductores, al igual que el reactivo de Fehling, el de Benedict contiene ion cúprico en medio alcalino.

Fenoles:

Para la determinación de fenoles, se usó una solución de cloruro férrico.

El reactivo de Jones se preparó mediante una mezcla de trióxido de cromo, ácido sulfúrico acetona y agua destilada.

Reactivo de Lucas: se preparó disolviendo 68 g de cloruro de zinc anhidro en 52.5 g de ácido clorhídrico concentrado.

El reactivo de Baljet constó de dos soluciones, la primera se preparó disolviendo 1 g de ácido pícrico y aforando a 100 mL con etanol, en la segunda se disolvieron 10 g de hidróxido de sodio y se aforó a 100 mL con agua destilada.

6.4.- Obtención de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Se colocaron 500 g de planta en un matraz balón, se realizaron extracciones seriadas con disolventes de polaridad creciente, comenzando con hexano, cloroformo y terminando con metanol, se utilizaron 3 L de cada disolvente. La mezcla fue calentada a temperatura de reflujo en mantilla durante 4 h, posteriormente los extractos se dejaron enfriar, se filtraron, el disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio, el residuo se colocó en una estufa de vacío a temperatura ambiente durante 24 h para eliminar totalmente el disolvente y se repitió el procedimiento de extracción de forma exhaustiva (Zavala, 1998).

6.5.- Preparación de las fracciones clorofórmicas de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Para evaluar la actividad biológica de los extractos y las fracciones clorofórmicas, se pesaron 5 mg de extracto o de sólido precipitado de las fracciones de cada planta y se disolvieron en la mínima cantidad del mismo disolvente con el cual se extrajo, esta disolución se mezcló con 20 mg de polivinilpirrolidona (PVP) disuelta en la mínima cantidad de metanol requerido para solubilizar el PVP, se homogeneizó y se evaporaron los disolventes a presión reducida, el residuo sólido, se colocó en una estufa de vacío para la eliminación total de disolvente. La mezcla extracto-PVP o fracción-PVP se suspendió en 1 mL de medio DMEM enriquecido con antibióticos y suero fetal bovino antes de cada experimento (Solución stock). Se filtró mediante membranas de 0.22 µm.

6.6.- Líneas celulares cancerígenas

Para evaluar la actividad citotóxica se utilizaron las siguientes líneas celulares, HeLa las cuales corresponden a células humanas epiteliales de cérvix, C6 fibroblastos murinos de cerebro, DU-145 células epiteliales humanas de próstata, derivadas de metástasis cerebral, SK-LU-1 células epiteliales humanas de pulmón, SW620 células epiteliales humanas provenientes de colon como se puede observar en la tabla 2. Estas líneas celulares se obtuvieron de ATCC y se preservaron en congelación a -70 °C en un ultra congelador marca Revco.

Tabla 2 Características de las líneas celulares

Características de las líneas celulares					
Línea celular	C6	DU-145	HeLa	SK-LU-1	SW620
Organismo de origen	<i>Rattus norvegicus</i> , rata	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido de origen	Cerebro	Próstata, derivado de metástasis de cerebro	Cérvix	Pulmón	Colon derivado de metástasis de ganglio linfático
Tipo de célula	Células gliales	Células epiteliales	Células Epiteliales	Células Epiteliales	Células Epiteliales
Morfología	Fibroblastos	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Propiedades de cultivo	Adherentes	Adherentes	Adherentes	Adherentes	Adherentes
Enfermedad de origen	Glioma	Carcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma colorrectal
Tiempo de replicación	22 h (Fan Uzman, 1977)	36 h (Stone, Mickey, Wunderli, Mickey, y Paulson, 1978)	18 – 20 h (Puck, Marcus, y Cieciura, 1956)	79.2 ± 0.4 h (Goldsmith,, Listinsky, y Garver Jr, 1991)	28.8 h (Kim, Tsao, Siddiqui, Whitehead, y Arnstein, 1980)

6.7.- Crecimiento celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), se suplementaron con antibióticos al 1 % (penicilina, estreptomina) y con 10 % de suero fetal bovino, se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada y 5 % de dióxido de carbono (CO₂)

Las células se lavaron con PBS (1X) y se despegaron utilizando una solución de 100 µL de tripsina 1X en 2,000 µL de PBS, dejándose incubar de tres a cinco minutos y ayudando al proceso con un ligero golpe sobre las cajas de cultivo, posterior a esto se tomó el volumen total y se colocó en microfugas para centrifugar a 3,000 rpm por cinco min.

Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular, con cuidado de no dañar las células, estas se colocaron en una caja de cultivo con medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino y antibióticos, procurando contar con un mínimo de 2x10⁴ células en cada cambio, para tener una confluencia mayor al 80% al día siguiente.

6.8.- Conteo celular

Se tomaron de 10 μ L de la suspensión de células y se colocaron en una cámara de Neubauer, se contó la totalidad de las células presentes en los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara de Neubauer como se observa en la fig. 1.

El número total de células se determinó utilizando la siguiente formula:

$$\left(\frac{(\text{No. total de células contadas})(10,000)}{4} \right) (\text{volumen total de células en mL.}) = \text{Número total de células por mL.}$$

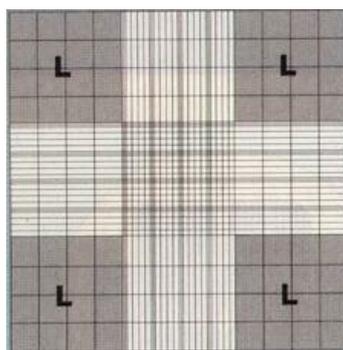


Figura 1. Cámara de Neubauer, el conteo se realizó en los cuadrantes marcados con la letra (L).

6.9.- Evaluación del efecto citotóxico de los extractos clorofórmico y metanólico de *C. aequipetala* y *V. carolina*.

El efecto citotóxico se evaluó en dos etapas, en la primera se trabajó con los extractos metanólicos y clorofórmicos de ambas plantas, en la segunda etapa, se evaluó el efecto de las fracciones del extracto que presentó mayor actividad citotóxica. El efecto se evaluó por medio del ensayo MTT, reconocido como un sistema de medida indirecta de masa celular, el cual es útil para evaluar la viabilidad y supervivencia en tratamientos de citotoxicidad (Escobar, Rivera, y Aristizabal, 2010), esta prueba se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), la reducción la realiza la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa generando el producto colorido azul-violeta formazán. La producción de formazán es proporcional al número de células vivas, células que se encuentran metabólicamente activas. Para el ensayo se utilizaron los siguientes grupos de estudio:

-
-
- Grupo control: Células sin tratamiento, únicamente contaron con vehículo (PVP + Medio DMEM).
 - Grupo de prueba: Células tratadas con los extractos metanólicos, clorofórmicos, así como las fracciones de las plantas del estudio a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL.
 - Grupo positivo: Células con cisplatino a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, y 6.25 µg/mL.

Se colocaron 2×10^4 células en placas de Elisa de 96 pozos, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada, durante 48 h, subsecuente a la incubación, se retiró el medio y se lavó con solución buffer PBS, se colocaron los extractos o fracciones de extractos a probar por triplicado, en concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL.

Una vez concluida la adición de los compuestos a probar, se incubaron las placas de Elisa por 24 h y posterior a esto se adicionaron 10 µL de MTT (Bromuro 3-4,5dimetilnitiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (5 mg/mL) en cada pozo, más 100 µL de medio enriquecido con suero fetal bovino y antibióticos, en las células previamente incubadas con las muestras a probar.

Una vez adicionado el MTT se incubaron las placas de Elisa durante 4 h, transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante de la placa de Elisa por medio de vacío con pipetas Pasteur estériles y se adicionaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán y así poder determinar el porcentaje de viabilidad por densidad óptica (Mosmann, 1983).

Las placas se leyeron en un lector de placas de Elisa a 575 nm, estos ensayos se realizaron por triplicado.

6.10.- Porcentaje de inhibición

Para determinar el % de inhibición se calculó primeramente el % de viabilidad de la siguiente forma:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{DO \text{ de células tratadas}}{DO \text{ de células control}} \times 100$$

Mientras que el % de inhibición celular se calculó de la siguiente forma:

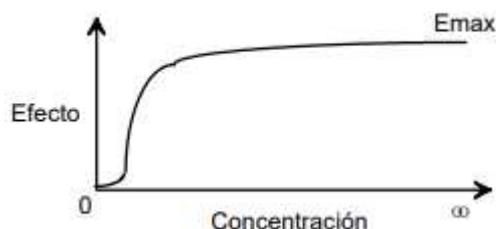
$$\% \text{ de inhibición de crecimiento celular} = 100 - \% \text{ de viabilidad}$$

6.11.- Determinación de la IC₅₀ de los extractos obtenidos

La IC₅₀ se calculó mediante los valores de las densidades ópticas, obteniendo así la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50 % de la población celular mediante una regresión no lineal ajustado a un modelo sigmoideo de la ecuación de Hill.

$$E = \frac{(E \text{ max})(C^\alpha)}{(IC_{50}^\alpha)(C)}$$

En donde: *E max* = efecto máximo observado; *C* = concentración (eje X), *C^α* = concentración elevada a la razón de cambio y la *IC₅₀^α* = concentración inhibitoria media máxima elevada al coeficiente de Hill.



En este modelo, las curvas dosis-concentración describen la relación entre la respuesta a un tratamiento mediante compuestos con actividad citotóxica y la concentración de dicho compuesto. Estos tipos de curva suelen ser semilogarítmicas y log (concentración del compuesto) se encuentra en el eje X. En el eje Y se muestran las mediciones del efecto observado en estos ensayos.

6.12.- Fraccionamiento del extracto clorofórmico de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Para llevar a cabo el estudio biodirigido, se llevó a cabo el fraccionamiento de los extractos clorofórmicos de las plantas antes mencionadas, por medio de técnicas cromatográficas en columna abierta, empacada con sílica gel 60 (fase estacionaria),

como fase móvil se usó hexano y se incrementó la polaridad con acetato de etilo. Se colectaron fracciones de aproximadamente 200 mL las cuales se compararon por cromatografía en capa fina, se juntaron aquellas que presentaron similitudes en los factores de retención y se evaluó la actividad biológica sobre las líneas celulares.

Estas fracciones fueron preparadas para su evaluación sobre las líneas celulares, de la misma forma que los extractos clorofórmicos y metanólicos.

6.13.- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Otra evaluación realizada a los compuestos extraídos de las plantas fue la actividad antioxidante. La capacidad antioxidante de los extractos crudos de *C. aequipetala* y *V. carolina* se realizó utilizando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH), en este caso se preparó una disolución 0.2 mM (7.8 mg) del reactivo (DPPH) aforando en 100 mL de metanol, colocándolo en un matraz aforado ámbar.

La evaluación se realizó en una placa de ELISA de 96 pozos, los extractos se evaluaron por triplicado a concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/mL, se utilizó quercetina disuelta en metanol, a una concentración de 6.25 µg/mL (2.06×10^{-5} M) como antioxidante de referencia y se utilizó metanol como blanco.

Para el ensayo se mezclaron 100 µL de la solución de DPPH y 100 µL de la muestra a evaluar (extractos metanólicos y clorofórmicos disueltos en metanol), se incubó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia a 520 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antioxidante mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad} = \left[\frac{(\text{Control A} - \text{Muestra A})}{\text{Control A}} \right] \times 100$$

6.14.- Evaluación de toxicidad aguda de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Se llevó a cabo un análisis de toxicidad aguda siguiendo el método modificado de Lorke, 1983. Se emplearon 72 ratones macho adultos de la cepa CD1, con un peso promedio de 25 - 30 g, los cuales se mantuvieron a temperatura y humedad regulada (21 ± 1 °C y 40 – 60 %, respectivamente), ciclos de luz / oscuridad de 12/12 h, con alimento para roedores (rat chow) y agua de la llave *ad libitum*. Los animales se dividieron aleatoriamente en 8 grupos experimentales (Extractos metanólicos y clorofórmicos de *C. aequipetala* y *V. carolina*) a los cuales se les administró los extractos por vía oral, en las siguientes dosis 10, 100, 1000, 1600, 2900 y 5000 mg/Kg, cada dosis fue probada con tres animales.

Se pesaron 150 mg de los extractos de cada planta y se disolvieron en el mismo disolvente en el cual se llevó a cabo su extracción, posteriormente se pesaron 600 mg de polivinilpirrolidona (PVP) disuelta en metanol, se juntaron las dos soluciones y se evaporaron a presión reducida, el residuo se colocó en una estufa de vacío para la eliminación total de disolvente. La mezcla se suspendió en 5 mL de agua destilada (Solución stock), de esta solución se realizaron las disoluciones correspondientes para obtener las seis concentraciones de ensayo mencionadas anteriormente.

El grupo control recibió por esta vía, únicamente el vehículo (agua destilada + PVP). Los animales se mantuvieron en observación durante 15 días, tiempo en el cual se determinaron alteraciones físicas y motoras, piloerección, irritación ocular, convulsiones o muerte.

6.15.- Análisis estadísticos de la actividad citotóxica de los extractos y las fracciones de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica están expresados como la media aritmética de los valores \pm el error estándar de la media, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para determinar diferencias significativas entre los grupos, así como la prueba complementaria de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron significativos.

7.- Resultados y Discusión

7.1.- Análisis fitoquímico de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Los resultados del análisis fitoquímico de *C. aequipetala* y *V. carolina* se muestran en la tabla 3. Se evaluaron alcaloides, azúcares reductores, fenoles, terpenos y compuestos hidroxilados y carboxilados. Se determinó la presencia de alcaloides en ambas plantas, así como terpenos y fenoles, estos resultados confirman los estudios previos de estas plantas informados en la literatura. Se determinó que ambas plantas poseen alcaloides, aun considerando que *C. aequipetala* dio negativo para cuatro de las seis pruebas de alcaloides, la causa puede ser el nivel de concentración. Las pruebas eran positivas por el cambio de coloración o por la aparición de precipitados, de acuerdo con lo descrito por Harbone, 1998, en el caso del reactivo de Wagner las reacciones positivas a alcaloides forman precipitados floculentos color marrón, con el reactivo de Dragendorff las reacciones positivas a alcaloides forman precipitados anaranjados-marrones y con el reactivo de Ehrlich se forma una coloración naranja en la solución.

Para azúcares reductores, la prueba se basa en el poder reductor del grupo carbonilo de los aldehídos, este se oxida a ácido y reduce la sal de cobre en medio alcalino a óxido de cobre, formando un precipitado de color rojo; para la prueba de Benedict, este contiene un ion cúprico en medio alcalino que se reduce hasta óxido cuproso en presencia de azúcares con el hidroxilo hemiacetálico libre.

En la prueba para detectar fenoles la solución de cloruro de hierro se comporta como un oxidante fuerte que transforma los alcoholes secundarios en cetonas.

Tabla 3. Resultados de las pruebas del análisis fitoquímico, las cuales se interpretan de la siguiente forma: Presencia: Abundante (+++) Moderada (++) Escasa (+) Negativa (-)

	<i>Cuphea aequipetala</i>	<i>Verbena carolina</i>	
Prueba realizada	Resultado	Resultado	Determinación de:
Wagner	-	+++	Alcaloides
Dragendorff	-	+++	Alcaloides
Hager	+	+++	Alcaloides
Bertrand	-	+++	Alcaloides
Mayer	-	+++	Alcaloides
Ehrlich	++	+	Alcaloides
Benedict	+	+	Azúcares reductores
Fehling	++	+	Azúcares reductores
FeCl₃	+++	+	Fenoles
Jones	-	+	Compuestos hidroxilados y Ac. carboxílicos
Lucas	-	-	Hidroxiilos
Baljet	+	++	Terpenos

7.2.- Rendimiento de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. aequipetala* y *V. carolina*

En el proceso de extracción de 500 gr de material vegetal, se obtuvieron los siguientes rendimientos: extracto metanólico de *Cuphea aequipetala* 10.38 % (51.9 gr) y extracto clorofórmico 4 % (20 gr); por otra parte, de *Verbena carolina* se obtuvo un rendimiento del 10.29 % (51.45 gr) de la extracción metanólica y 0.90 % (4.5 gr) de la extracción clorofórmica.

Con base en los rendimientos obtenidos, para proseguir con el fraccionamiento de los extractos, fue necesario repetir los procesos de extracción de forma exhaustiva.

7.3.- Obtención de manitol a partir del extracto metanólico de *C. aequipetala*

En el extracto metanólico de *C. aequipetala* se obtuvo un precipitado de color amarillento que se recuperó filtrando con un embudo sinterizado y lavando con metanol frío, se obtuvo un polvo blanco al que se le determinó su punto de fusión, resultando un valor de 164-168 °C, también se determinó su espectro de infrarrojo (IR) el cual se muestra en la fig. 2.

Con base en el punto de fusión y el espectro de infrarrojo se determinó que el compuesto aislado corresponde al manitol, este compuesto fue reportado con anterioridad por Aguilar, et al. 2012. El punto de fusión de 167 °C es característico de este compuesto en estado puro y así como las bandas de transmitancia para los enlaces C-O, -OH y C-H.

El compuesto obtenido se evaluó en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa, SK-LU-1 y SW620 y no se encontró actividad citotóxica.

Espectro infrarrojo de manitol de referencia y manitol aislado de *C. aequipetala*.

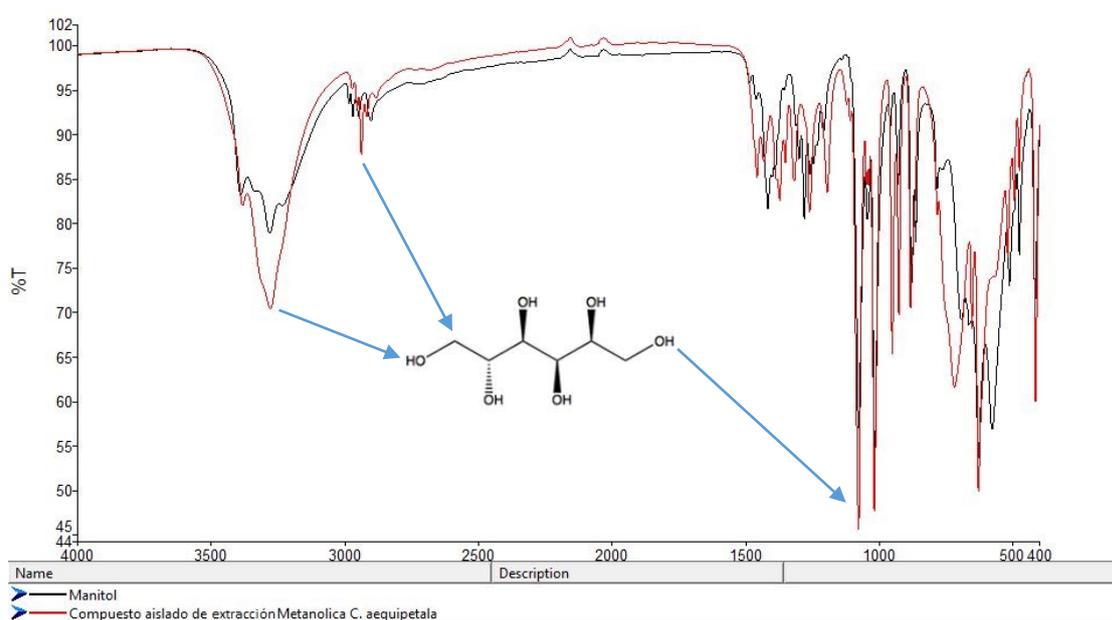
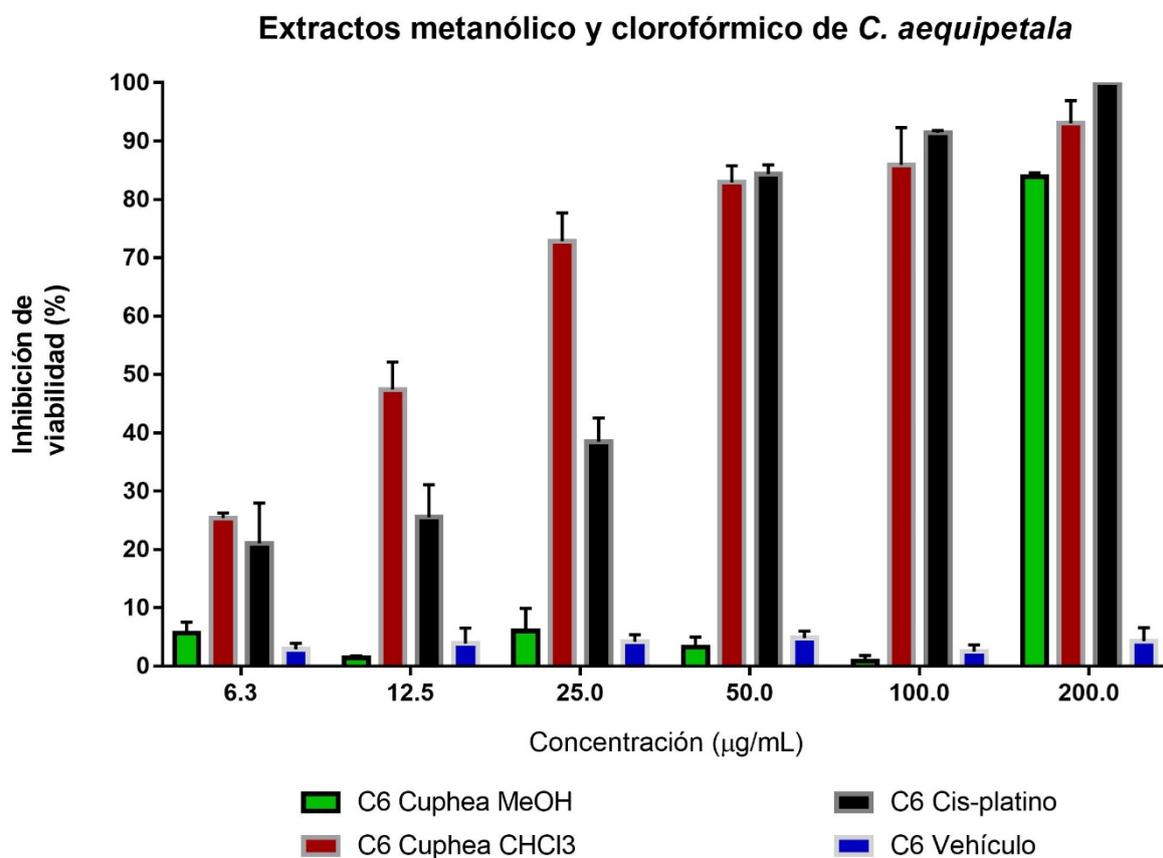


Figura 2. Infrarrojo de comparación entre manitol de referencia y compuesto aislado de extracción metanólica de *C. aequipetala*, se observa la señal característica del grupo OH de 3,200 a 3,650 cm⁻¹, a 2,900 cm⁻¹ se observa la señal C-H y dos señales intensas a 1,000 cm⁻¹ correspondientes a enlaces de tipo C-O.

7.4.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. aequipetala*

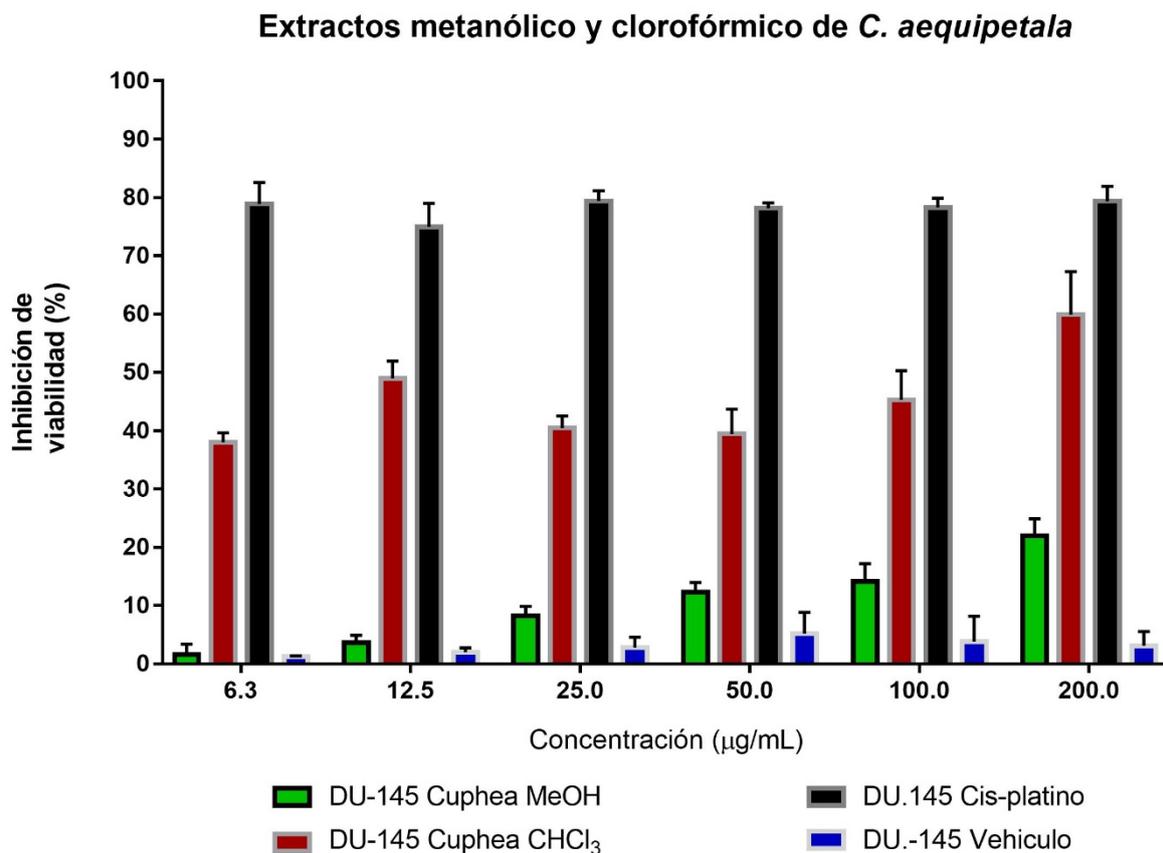
Los resultados de la actividad citotóxica se presentan a continuación por cada línea celular en las gráficas 1, 2, 3 y 4, se compara la actividad con respecto al cisplatino, agente utilizado en pruebas *in-vitro* debido a su bajo costo, su facilidad de adquisición en comparación con otros fármacos de referencia, así también se considera uno de los quimioterapéuticos más efectivos (M. Price, et al, 2006).



Gráfica 1. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los extractos clorofórmico y metanólico de *C. aequipetala*, así como el control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

En la gráfica 1 se presenta el efecto citotóxico sobre la línea celular C6. El efecto del extracto metanólico es menor al observado con el cisplatino en todo el intervalo de concentraciones trabajado. En el caso del extracto clorofórmico se presenta una actividad

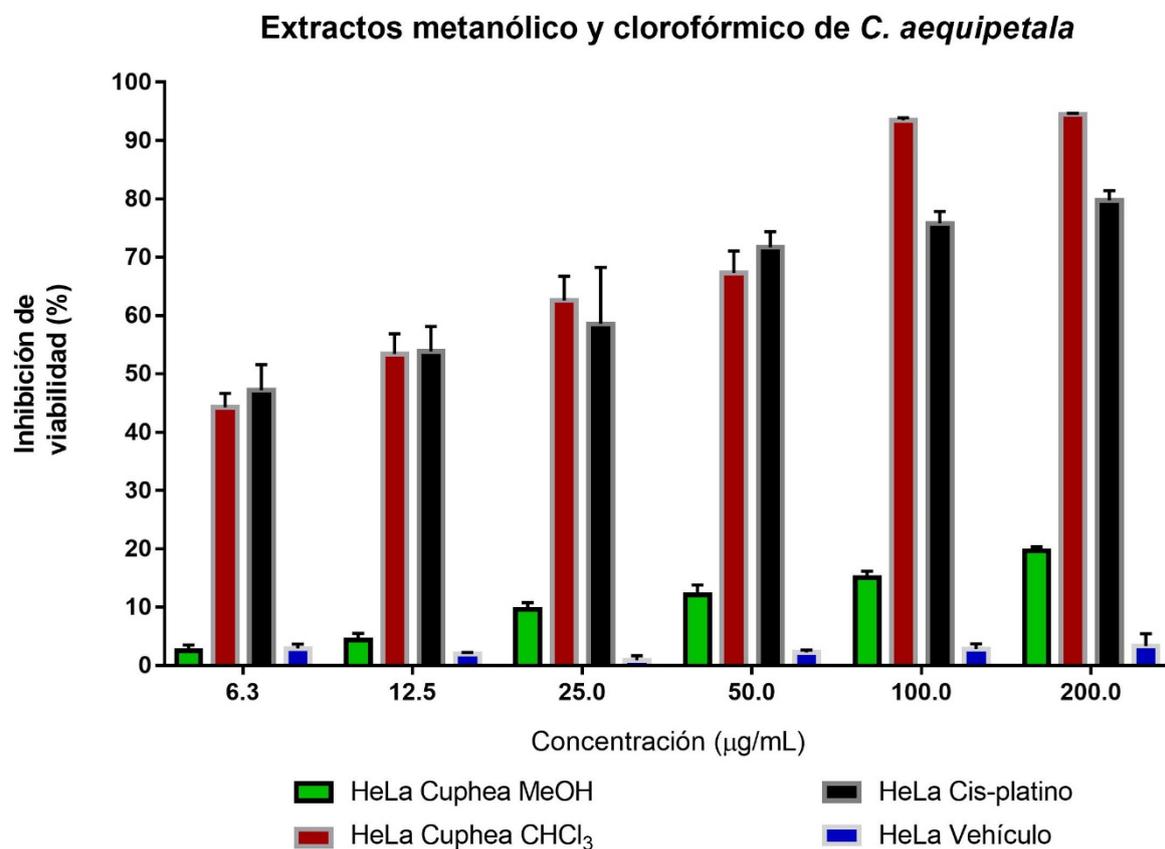
mayor a la del fármaco de referencia a concentraciones menores a 50 $\mu\text{g/mL}$. Por ejemplo, se observa que el extracto clorofórmico presenta un porcentaje de inhibición celular de 72.86 % a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el cisplatino tiene una inhibición de 38.45 %. A las concentraciones utilizadas no existe una diferencia estadísticamente significativa entre actividad del control positivo (cisplatino) y el extracto clorofórmico, por lo que se propuso continuar con el estudio del efecto del extracto clorofórmico sobre la línea celular C6.



Gráfica 2. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de los extractos clorofórmicos y metanólicos de *Cuphea aequipetala*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

Se estudió el efecto de los extractos sobre la línea celular DU-145, el extracto metanólico presentó una actividad citotóxica mucho menor a la del extracto clorofórmico, como se observa en la gráfica 2. El extracto clorofórmico, presentó porcentajes de inhibición de 40 a 50 % a concentraciones de 6.25 a 25 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a las mismas

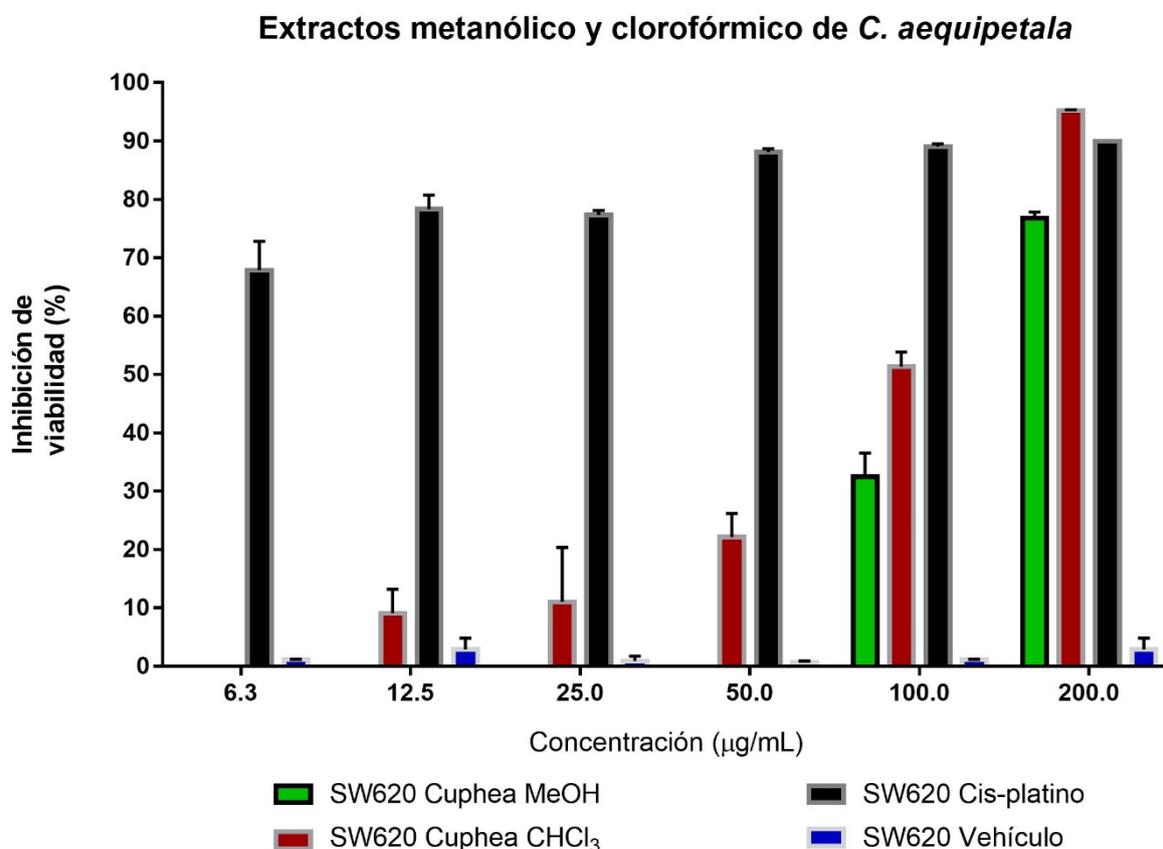
concentraciones los porcentajes de inhibición del extracto metanólico fueron del 10 %, el cual mostró diferencia estadísticamente significativa respecto al control positivo. De forma general se puede observar que el cisplatino presenta la mayor actividad citotóxica en todo el intervalo de concentraciones, en el extracto clorofórmico no se encontró diferencia estadísticamente significativa respecto al cisplatino.



Gráfica 3. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de los extractos clorofórmico y metanólico de *Cuphea aequipetala*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. $^{**}p < 0.01$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

En la gráfica 3 se presenta el efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa, se puede observar que la actividad del extracto metanólico de *Cuphea aequipetala* en esta línea celular es menor a la del extracto clorofórmico. El extracto clorofórmico y el control positivo presentan actividad citotóxica similar en el intervalo de concentraciones de 6.25 a 25 µg/mL y muestran inhibiciones de la viabilidad celular entre el 40 y 60 %, incluso se observa que el extracto clorofórmico presenta mejor actividad que el cisplatino a

concentraciones altas, llegando a inhibiciones del 93.46 % a una concentración de 100 µg/mL, cuando la del cisplatino es del 75.78 % a la misma concentración.



Gráfica 4 Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de los extractos clorofórmico y metanólico de *Cuphea aequipetala*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. ****** $p < 0.001$ ***** $p < 0.05$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

Cuando se evaluó el efecto citotóxico sobre la línea celular SW620, grafica 4, se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad citotóxica de los extractos y el cisplatino. El efecto de inhibición celular de ambos extractos tiene un comportamiento similar, sin embargo, para el extracto metanólico no se observó actividad citotóxica a concentraciones inferiores a 50 µg/mL. En el caso del extracto clorofórmico la actividad citotóxica fue dependiente de la concentración, igualándose a la actividad del control positivo a concentraciones cercanas a los 200 µg/mL de extracto.

Se determinaron los valores de la IC₅₀ de los dos extractos de *C. aequipetala* sobre las cuatro diferentes líneas celulares, los resultados se presentan en la tabla 4.

Líneas celulares	Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de los extractos de <i>C. aequipetala</i> .		IC ₅₀ Cisplatino
	Metanólico	Clorofórmico	
C6	141.2 ± 2.15 µg/mL	18.29 ± 1.06 µg/mL	34.97 ± 1.04 µg/mL
DU-145	> 200 µg/mL	110.4 ± 1.25 µg/mL	4.14 ± 18.79 µg/mL
HeLa	> 200 µg/mL	38.78 ± 1.10 µg/mL	31.04 ± 1.12 µg/mL
SW620	148.9 ± 2 µg/mL	83.67 ± 1.06 µg/mL	20.42 ± 1.14 µg/mL

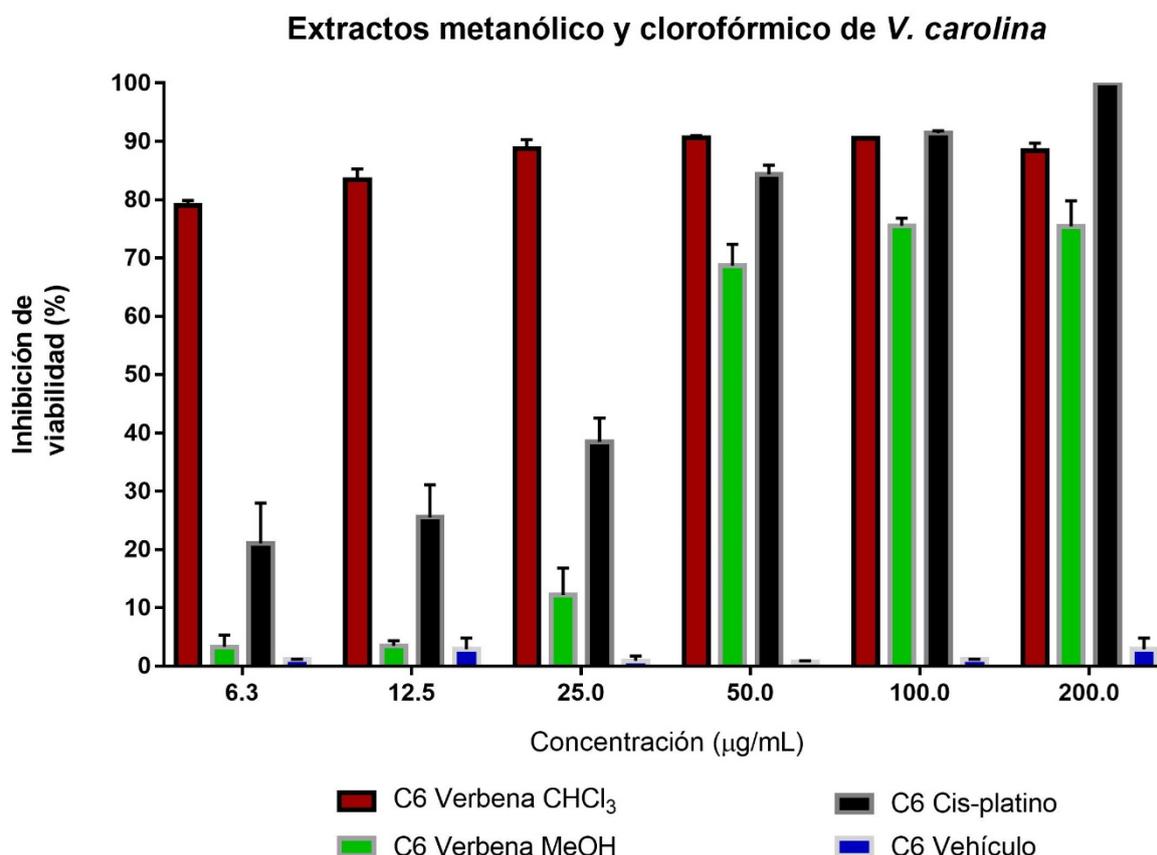
Tabla 4. IC₅₀ de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. aequipetala*, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa y SW620.

A partir de los valores de las IC₅₀ de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. aequipetala*, se puede establecer que para la línea celular C6 la IC₅₀ del extracto clorofórmico es menor a la observada con el extracto metanólico. Para la línea celular DU-145 la concentración requerida para inhibir al 50 % de la población celular fue menor utilizando el extracto clorofórmico en comparación con el metanólico, misma situación que se observa en la línea HeLa, en la cual existió una marcada diferencia entre el extracto metanólico y el extracto clorofórmico.

Por último, en la línea SW620 se observa que el extracto clorofórmico requiere de una concentración menor para inhibir al 50 % de la población celular en comparación con el extracto metanólico. En general estos resultados dejan clara una diferencia de actividad citotóxica entre ambos extractos en todas las líneas celulares, por lo que se decidió seguir trabajando con el extracto más activo (extracto clorofórmico) y se llevó a cabo el fraccionamiento para tratar de aislar y purificar el o los compuestos activos involucrados en el efecto citotóxico.

7.5.- Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico de *V. carolina*.

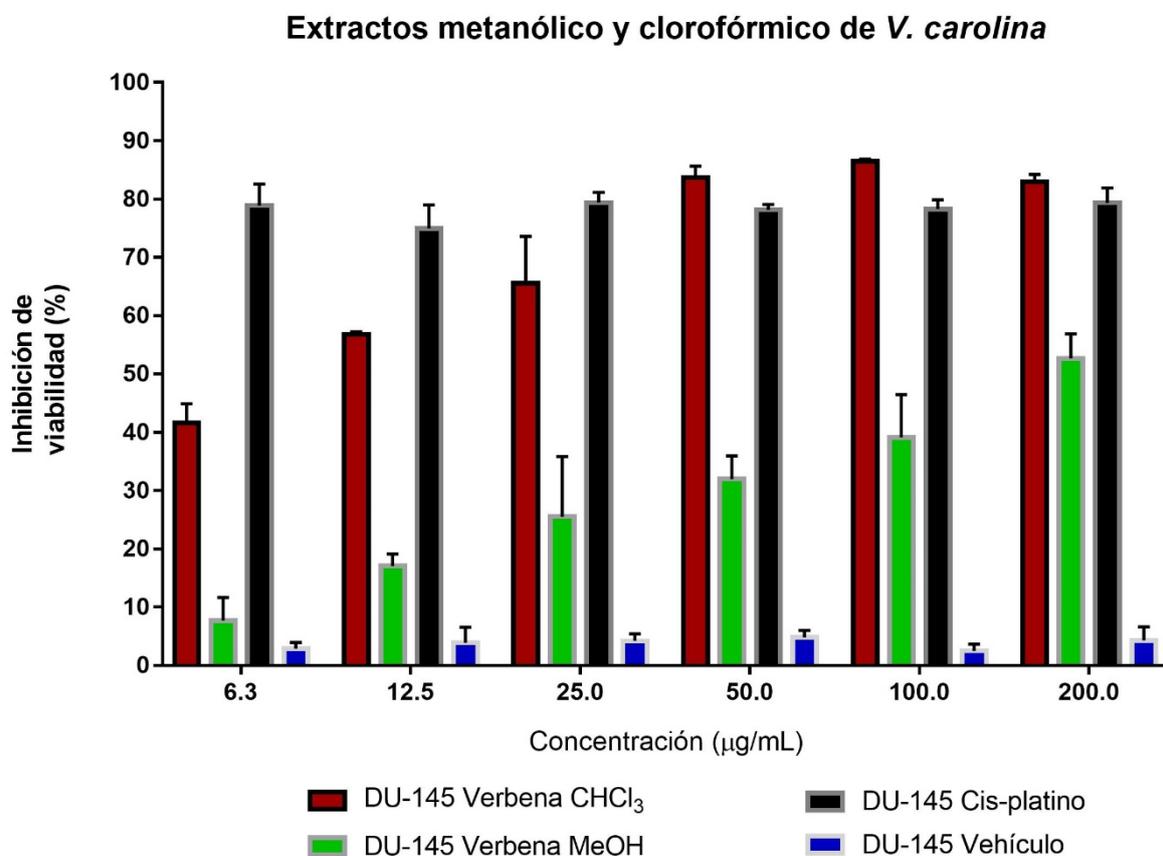
La evaluación de los extractos fue llevada a cabo sobre las líneas celulares, C6, DU-145, HeLa y SW620 se muestran en la gráfica 5, 6, 7 y 8.



Gráfica 5. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los extractos clorofórmico y metanólico de *Verbena carolina*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. n/s no hay diferencia significativa con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones (n=3) ± error estándar.

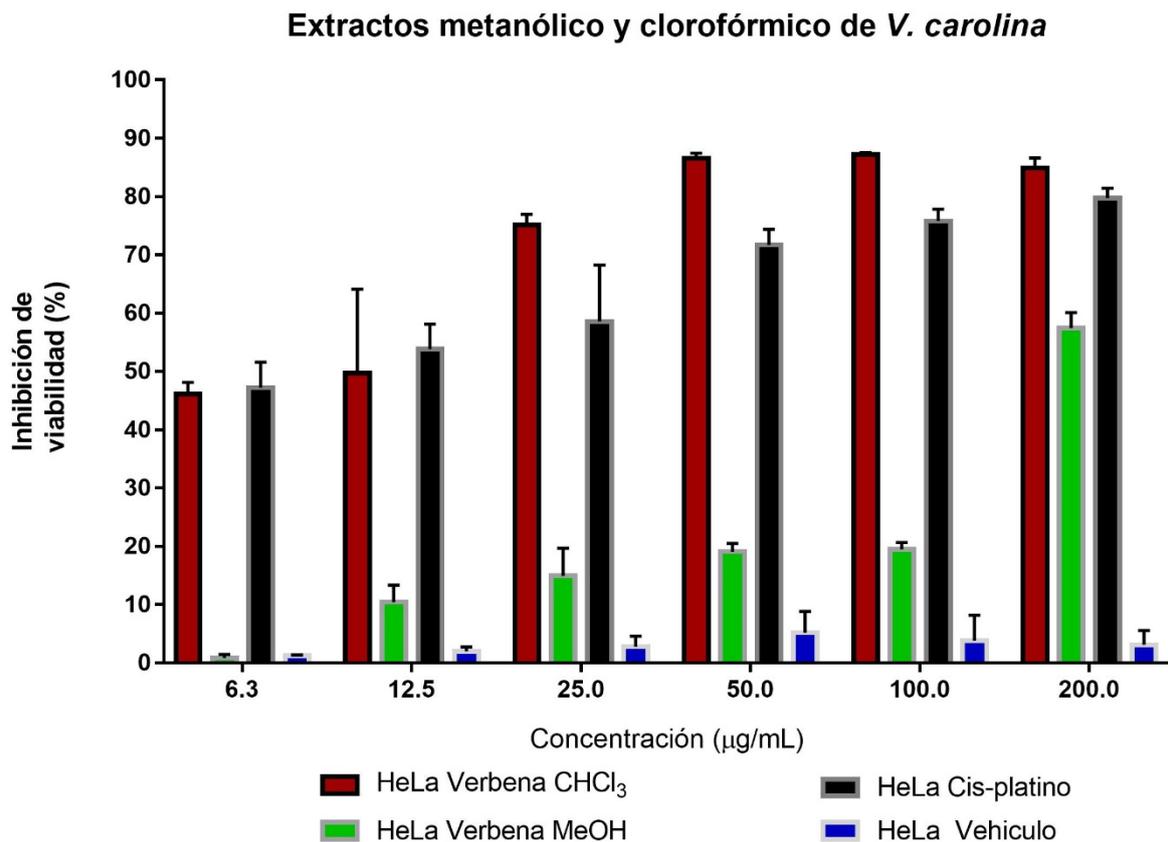
De los resultados de la evaluación del efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los extractos clorofórmico y metanólico de *Verbena carolina*, gráfica 5 se observa que el extracto clorofórmico, tiene un mayor porcentaje de inhibición en comparación con el extracto metanólico a bajas concentraciones. El análisis estadístico mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de ambos extractos a concentraciones entre 50 y 200 µg/mL, lo cual indica que ambos extractos presentan una

buena actividad citotóxica; sin embargo, como se observa en la gráfica 5, el extracto clorofórmico presentó mayores porcentajes de inhibición a concentraciones menores a 50 µg/mL, lo que nos permitió continuar con el estudio de este extracto.



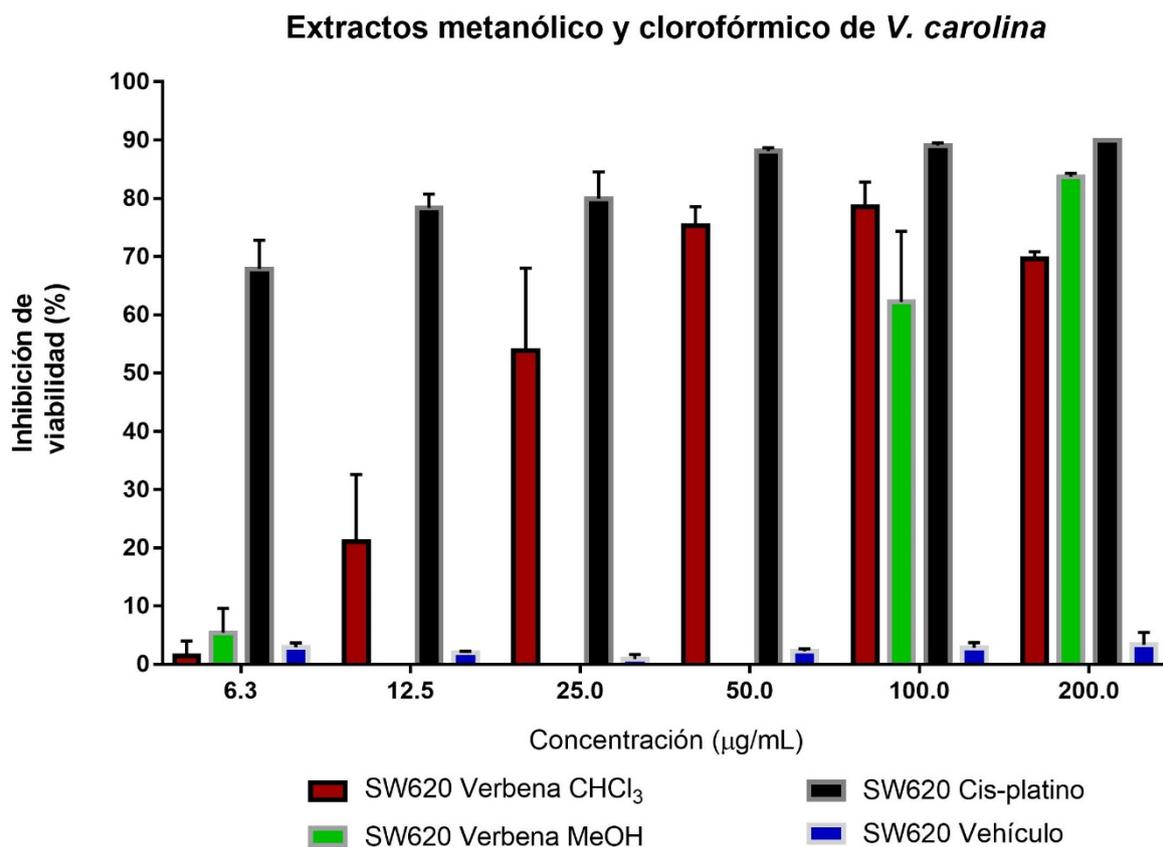
Gráfica 6. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de los extractos clorofórmico y metanólico de *Verbena carolina*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

En el caso de la línea celular DU-145, se puede observar en la gráfica 6, que el extracto clorofórmico tiene porcentajes de inhibición semejantes a los del control positivo a concentraciones superiores a 50 µg/mL y no existe una diferencia estadísticamente significativa entre este extracto y el cisplatino, el extracto metanólico mostró una actividad citotóxica mucho menor a la observada con el extracto clorofórmico.



Gráfica 7. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de los extractos clorofórmico y metanólico de *Verbena carolina*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. ****p<0.01** con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones (n=3) ± error estándar.

En la gráfica 7 se observan los resultados de la evaluación sobre la línea celular HeLa. El extracto clorofórmico presentó una actividad (75.09 % de inhibición) mayor que el control positivo cisplatino a partir de concentraciones de 25 µg/mL, mientras que el extracto metanólico presentó actividades mayores al 20 % a partir de 100 µg/mL, por lo que el extracto clorofórmico, representa una opción viable para continuar con su análisis, ya que se observan porcentajes de inhibición mucho mayores a concentraciones bajas del extracto.



Gráfica 8. Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de los extractos clorofórmico y metanólico de *Verbena carolina*, así como control positivo (Cisplatino + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$ con respecto al grupo de control positivo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

En la gráfica 8, se observa que existe diferencia entre la actividad de ambos extractos y el cisplatino, sin embargo, el extracto clorofórmico presentó actividad significativa a concentraciones entre 25 y 100 µg/mL, mientras que el extracto metanólico no presentó actividad a concentraciones menores de 50 µg/mL.

Como se observó en todas las gráficas anteriores, el extracto clorofórmico, presenta actividad a concentraciones menores en comparación al extracto metanólico, por lo que se decidió continuar con el estudio de este extracto.

Para determinar las diferencias entre la actividad de ambos extractos, se decidió determinar las IC₅₀. cómo se observa en la tabla 5.

Líneas celulares	Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de los extractos de <i>V. carolina</i>		IC ₅₀ Cisplatino
	Metanólico	Clorofórmico	
C6	34.53 ± 1.02 µg/mL	14.78 ± 1.08 µg/mL	34.97 ± 1.04 µg/mL
DU-145	> 200 µg/mL	20.34 ± 1.08 µg/mL	4.14 ± 18.79 µg/mL
HeLa	183.79 ± 1.17 µg/mL	20.71 ± 1.08 µg/mL	31.04 ± 1.12 µg/mL
SW620	96.89 ± 1.98 µg/mL	18.86 ± 1.07 µg/mL	20.42 ± 1.13 µg/mL

Tabla 5. IC₅₀ de los extractos metanólico y clorofórmico de *V. carolina*, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa y SW620.

En el caso de las líneas celulares C6, DU-145, HeLa y SW620, la concentración inhibitoria requerida por el extracto clorofórmico es menor a la requerida por el cisplatino, así como con el extracto metanólico, únicamente en la línea DU-145 el extracto clorofórmico, presentó una IC₅₀ mayor en comparación con el cisplatino.

Con base en los resultados anteriores y considerando que la actividad citotóxica observada en todas las líneas celulares es mayor en el extracto clorofórmico de *V. carolina* en comparación con el extracto metanólico, se decidió continuar con el análisis del extracto clorofórmico para tratar de separar el o los compuestos activos involucrados.

7.6.- Estudio fitoquímico biodirigido

De *C. aequipetala* por cromatografía en columna abierta se obtuvieron 10 fracciones, de las cuales las fracciones 3, 4 y 5 presentaron similitud en su factor de retención obtenido por cromatografía en capa fina, así como las fracciones 9 y 10 como se observa en la tabla 6.

Se probaron las fracciones 6, 8 y la combinación de 9 y 10 de *Cuphea aequipetala* como se observa en el diagrama 1.

Tabla 6. Número de fracciones obtenidas de la separación cromatográfica en columna abierta de *C. aequipetala*, así como sus respectivas polaridades de elución, con punto las fracciones con factor de retención similar.

Extracto clorofórmico de <i>C. aequipetala</i>	
Número de fracción obtenida	Relación Hexano – Acetato de etilo
1	95 % - 5 %
2	90 % - 10 %
• 3	85 % - 15 %
• 4	80 % - 20 %
• 5	70 % - 30 %
6	70 % - 30 %
7	60 % - 40 %
8	50 % - 50 %
• 9	40% - 60 %
• 10	100 % Acetato de etilo

Del extracto clorofórmico de *Verbena carolina* se obtuvieron 14 fracciones (tabla 7), de las cuales las fracciones 6 y 7 así como la 13 y 14 presentaron similitud en sus factores de retención, esto se determinó por medio de cromatografía en capa fina.

Tabla 7. Número de fracciones y sus respectivas polaridades a las que se obtuvieron, de la separación cromatográfica del extracto clorofórmico de *Verbena carolina*, con punto las fracciones con factor de retención similar.

Extracto clorofórmico de <i>V. carolina</i> .		
Número de fracción	Relación Hexano – Acetato de etilo	
1	100 % Hexano	
2	95 % - 5 %	
3	90 % - 10 %	
4	85 % - 15 %	Precipitado
5	85 % - 15 %	Cristales
• 6	80 % - 20 %	
• 7	70 % - 30 %	
8	60 % - 40 %	
9	50 % - 50 %	
10	40 % - 60 %	Precipitado
11	40 % - 60 %	Precipitado
12	20 % - 80 %	Precipitado
• 13	10 % - 90 %	Precipitado
• 14	100 % Acetato de etilo	Precipitado

Las fracciones obtenidas de *C. aequipetala* y *V. carolina* se colocaron por dos semanas dentro de frascos cerrados, con la finalidad de observar la formación de algún precipitado, en las fracciones del extracto de *C. aequipetala* no se observó ningún precipitado.

En el caso de *V. carolina* se observaron precipitados en las fracciones 4, 10, 11, 12, 13 y 14. Se evaluaron las fracciones recuperadas y sus precipitados de forma independiente, las fracciones que se probaron sobre líneas celulares fueron la 8, 9 y 12 y los precipitados de las fracciones 4, 10 y 12 como se observa en el diagrama 1.

Del fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto clorofórmico de *V. carolina*, se observaron cristales en forma de agujas en la fracción 5, estos cristales se recuperaron por filtración con un embudo sinterizado y se lavaron con hexano frío, se evaluó el punto de fusión de los cristales obtenidos en la fracción 5, obteniendo un valor de 142-143 °C, se analizaron por espectroscopias IR (fig. 3).

La espectrometría de masas (EM) determinó un peso molecular de 486 g/mol para el compuesto derivatizado con trimetilsilano correspondiente a un peso molecular de 414 g/mol, así como RMN (anexo 1). Con los resultados obtenidos se determinó que el compuesto aislado corresponde al β -sitosterol, ya que el punto de fusión de este compuesto reportado en la bibliografía, según U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, 2019, es de 143.5 °C y el espectro de IR mostró las señales correspondientes figuras 3 y 4.

Como se puede observar en la figura 3, las señales corresponden con el β -sitosterol, estas fueron comparadas con espectros del mismo compuesto reportados en la literatura (figura 4), confirmando la presencia de este compuesto en la fracción 5.

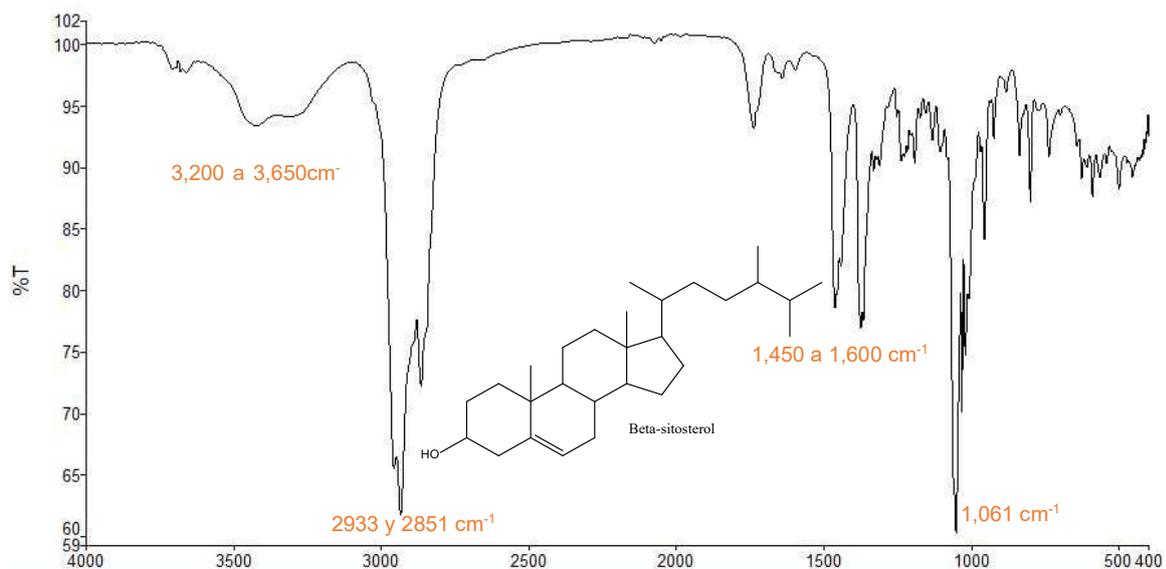


Figura 3. Infrarrojo de la fracción número 5, del compuesto en forma de cristales de aguja, aislado de extracción clorofórmica de *V. carolina*, se observa la señal característica del grupo OH de 3,200 a 3,650 cm^{-1} , los picos que se observan a 2,933 cm^{-1} y 2,851 cm^{-1} corresponden a señales de enlaces de tipo C-H, las señales de 1,500 a 1,600 cm^{-1} corresponden a un enlace de tipo C=C y los picos por debajo de 1,000 cm^{-1} corresponden a señales de tipo de grupos alifáticos -C-H

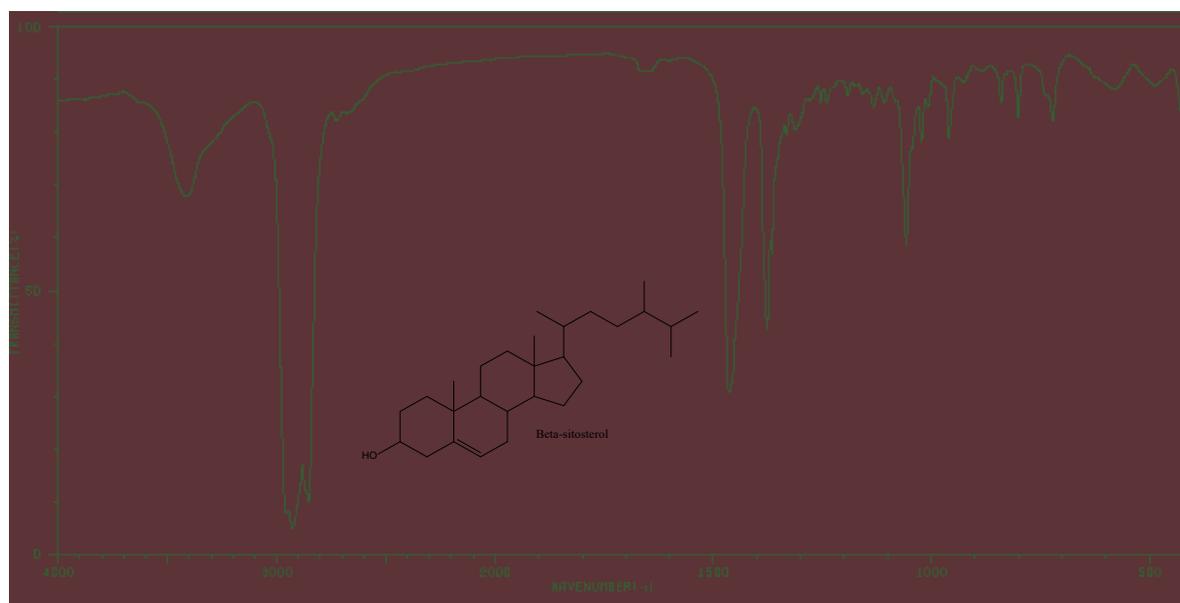


Figura 4. Infrarrojo de β -sitosterol reportado en la literatura (Prabakaran, Kim, Sasireka, Hemapriya, y Chung, 2017).

En el espectro de ^1H RMN se observó una señal en la zona de hidrógenos vinílicos en δ 5.32, seis señales de metilos, las cuales aparecen a δ 0.73, 1.02, 0.97, 0.86, 0.84 y 0.87, los cuales corresponden a los carbonos, 18, 19, 21, 26, 27 y 29 respectivamente, por último una señal a δ 3.39 correspondiente al protón conectado al carbono 3, esto se puede observar en el anexo 1 y figura 5, estas señales fueron contrastadas con estudios previos de elucidación del β -sitosterol (Sai & Indra, 2012), cabe mencionar que no se tienen registros, reportados de este compuesto en estudios previos de esta planta.

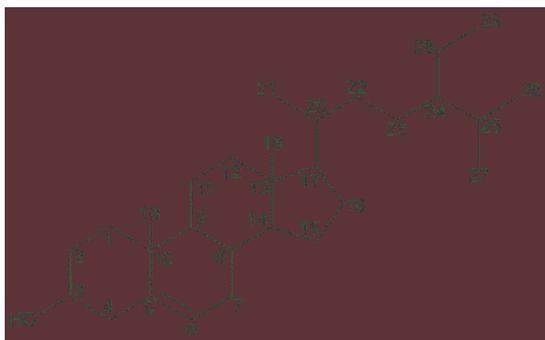


Figura 5. Asignación de números de carbonos a la estructura de β -sitosterol.

Se llevó a cabo una cromatografía en placa fina de las 14 fracciones obtenidas de *V. carolina*, la cual se eluyó con una polaridad 50 % hexano y 50 % acetato de etilo y fue revelada con el reactivo p-anisaldehído en ácido sulfúrico y calentadas a 100 °C en una parrilla de calentamiento de 5 a 10 minutos.

Al analizar la placa, se logró la identificación de β -sitosterol en la fracción 5 y de compuestos terpénicos en las fracciones de menor polaridad, como se puede observar en la figura 6, esto debido a la presencia de coloración violeta intensa, según lo descrito por (Wagner y Bladt, 1996).

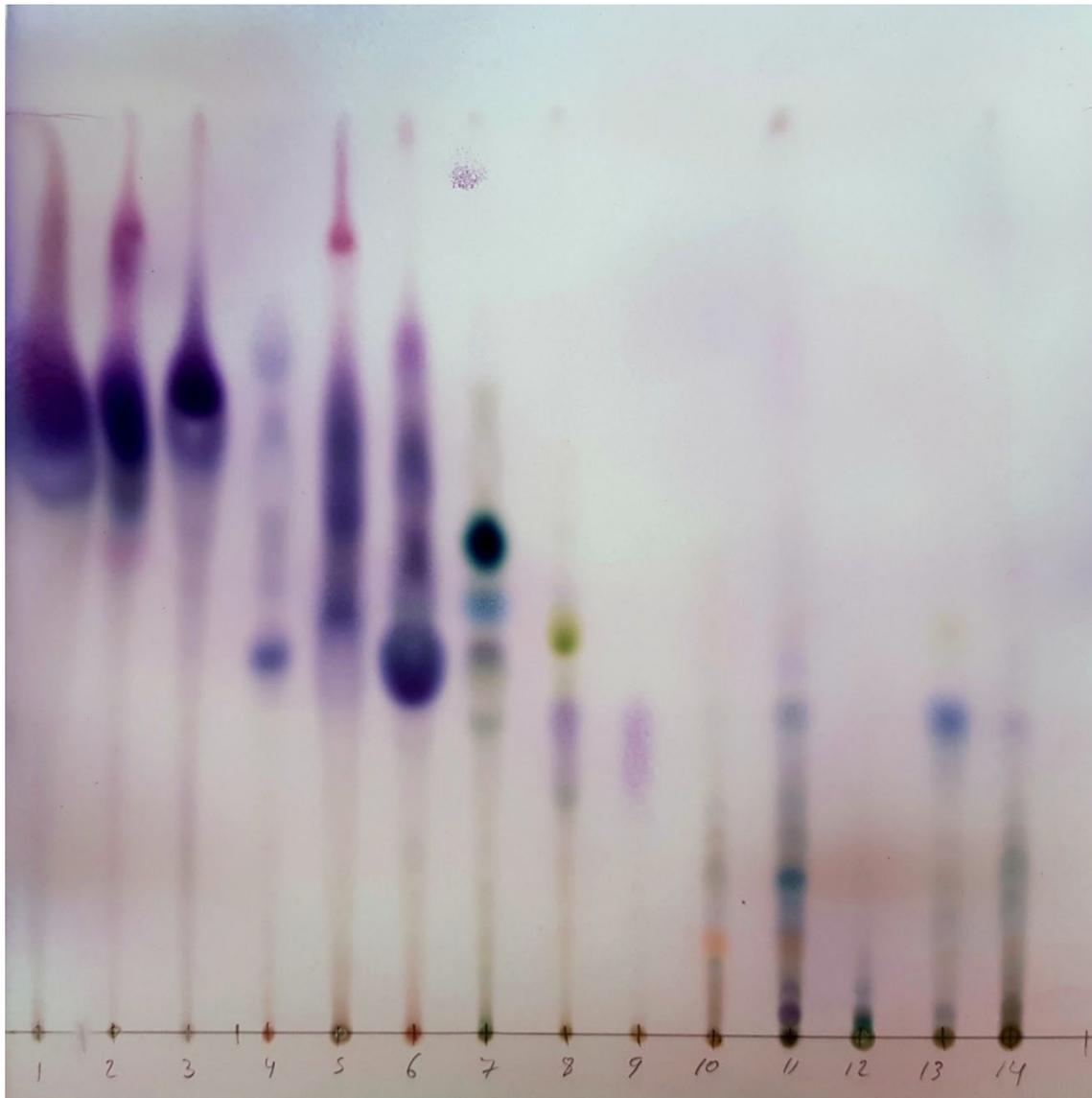


Figura 6. Cromatografía en capa fina de las 14 fracciones obtenidas de *V. carolina* y revelada mediante el reactivo *p*-anisaldehído, la polaridad de cada fracción se puede observar en la tabla 7.

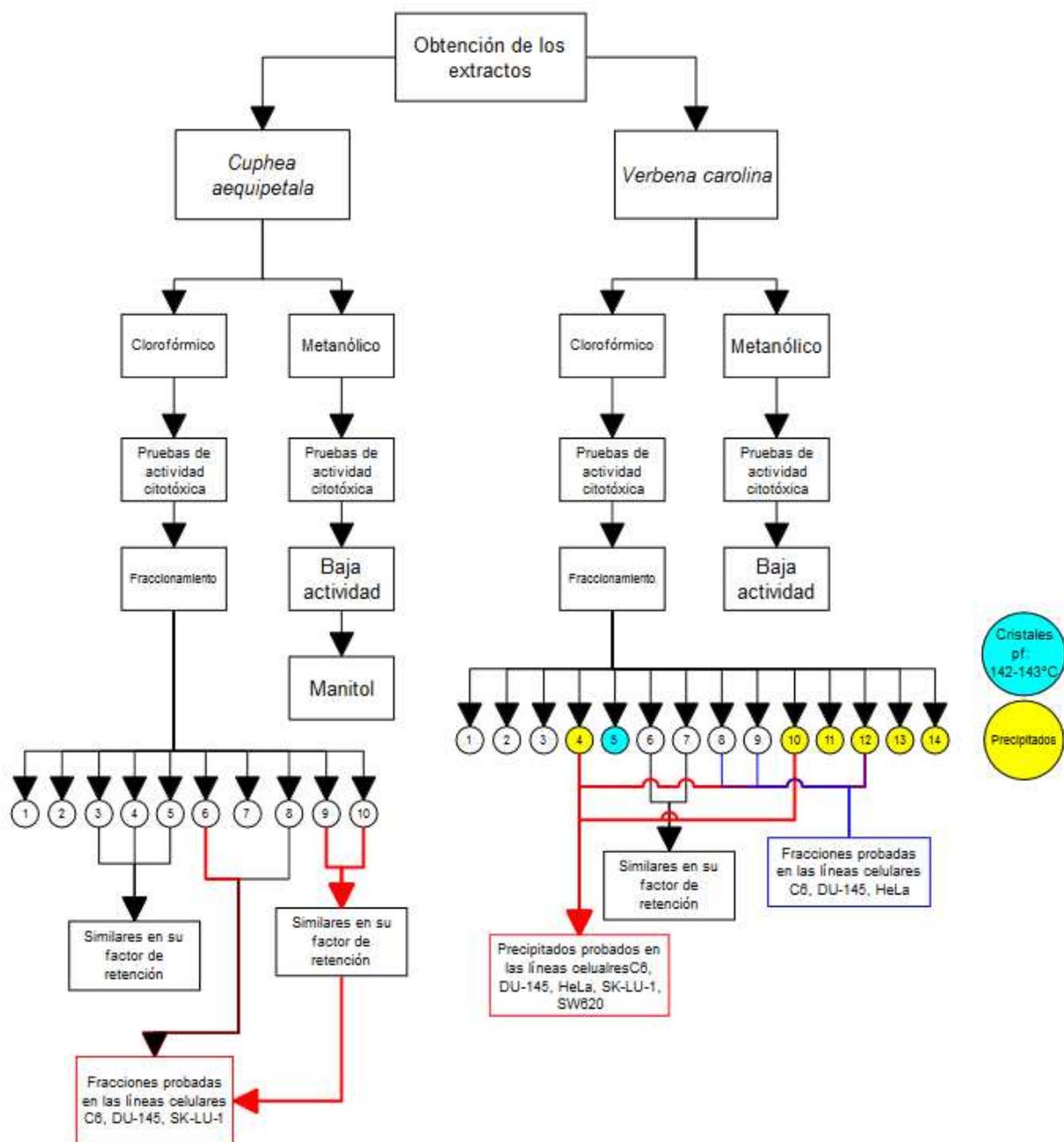


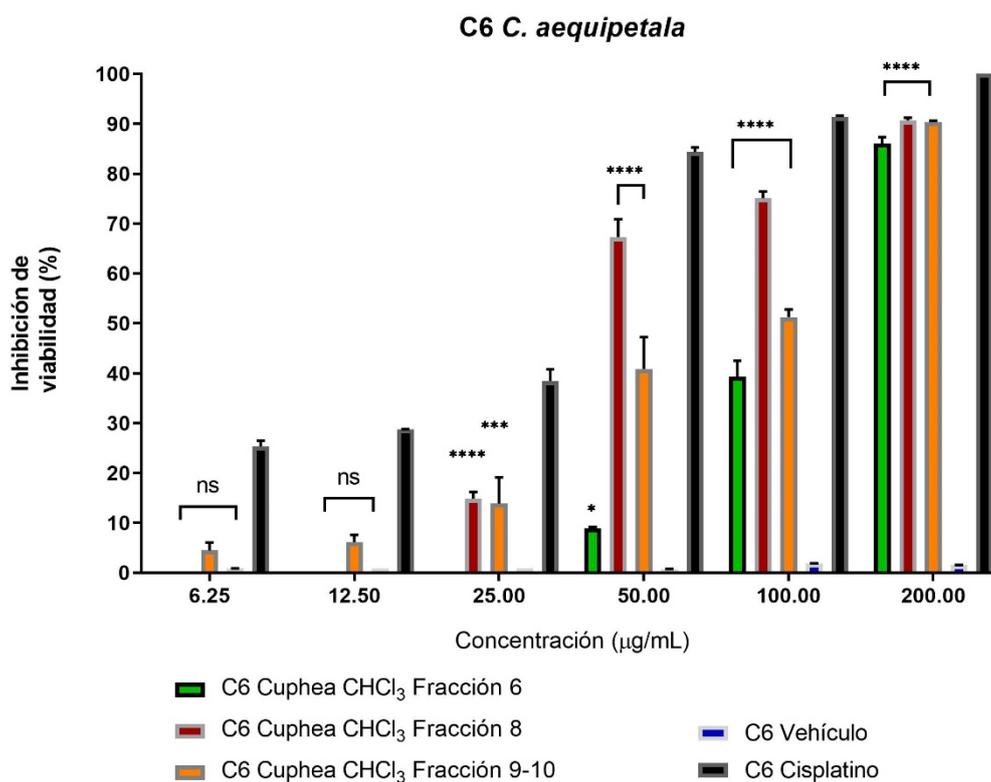
Diagrama 1. Número de fracciones obtenidas de ambas plantas, en rojo y azul las fracciones que se evaluaron, en amarillo las fracciones que presentaron algún precipitado y en azul cielo la fracción que presentó precipitado en forma de cristales en agua.

A las fracciones obtenidas de los extractos clorofórmicos se les debía evaluar su actividad sobre las líneas celulares, sin embargo, se observó que presentaban baja solubilidad en el medio de crecimiento celular DMEM, por lo cual se utilizó polivinilpirrolidona como codisolvente. Para demostrar la inocuidad de este compuesto en las líneas celulares, se

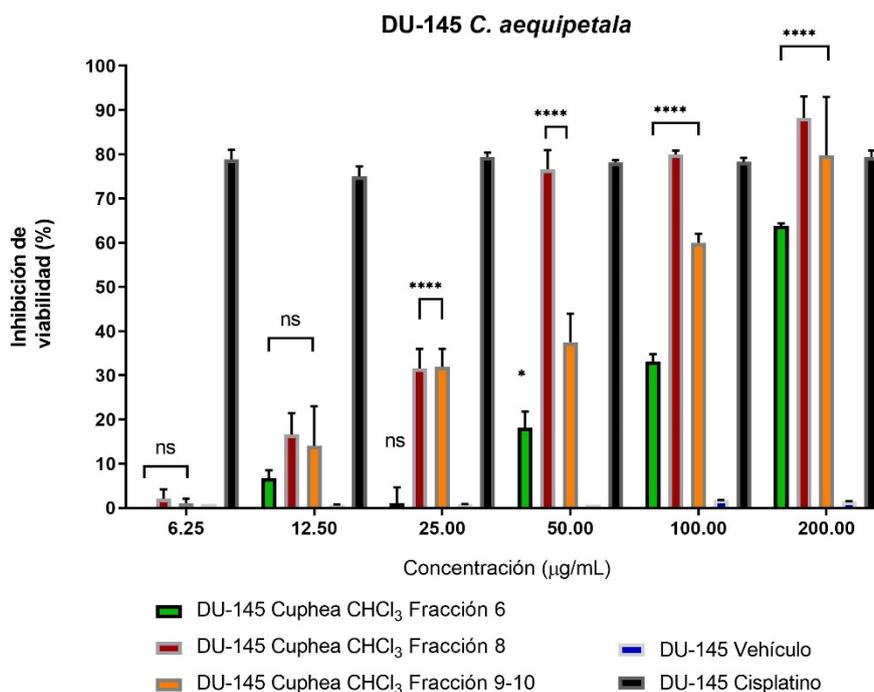
comprobó de forma independiente su efecto y también en cada ensayo se evaluó como vehículo (PVP más medio DMEM). Una vez lograda la disolución de los solutos recuperados del fraccionamiento cromatográfico del extracto cloroformico, se evaluó el efecto de estas disoluciones en medio DMEM sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares y posteriormente se calcularon las IC₅₀.

7.7.- Efecto citotóxico de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de *C. aequipetala*

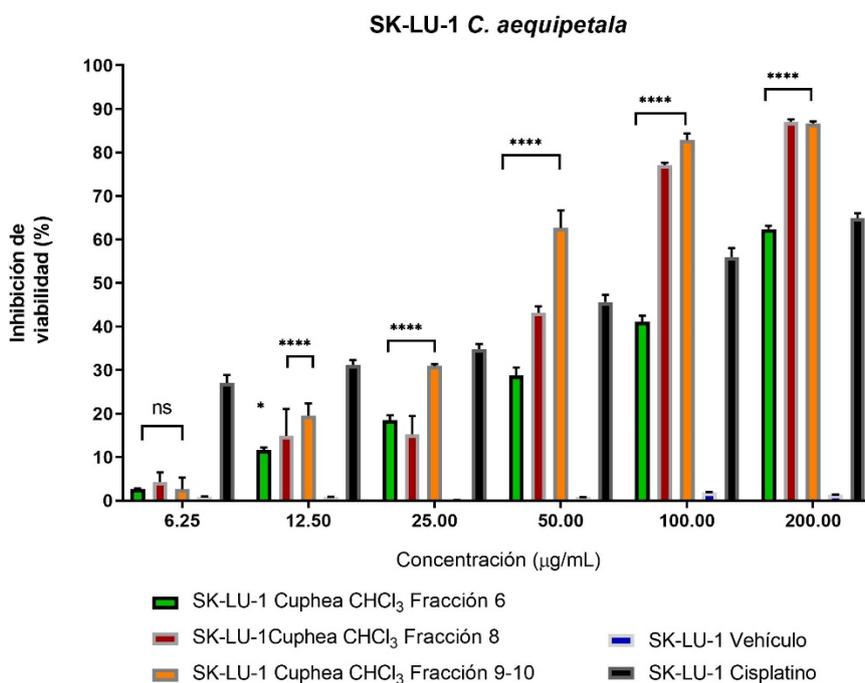
Se determinó el porcentaje de inhibición de las fracciones de los extractos clorofórmicos de *C. aequipetala*, frente a las líneas celulares C6, DU-145, SK-LU-1, para determinar cuál era la fracción con mejor actividad citotóxica, sin embargo, no existió diferencia estadísticamente significativa en la actividad de las fracciones 6, 8 y 9-10 y el vehículo en la línea C6, mientras que en la línea DU-145 se encontró diferencia entre la fracción 6, 9-10 y el vehículo, mientras que en la línea SK-LU-1, las fracciones 8 y 9-10 no presentaron diferencia con el vehículo, esto se puede observar en las gráficas 9, 10 y 11



Gráfica 9. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de *C. aequipetala* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones (n=3) ± error estándar.



Gráfica 10. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9.10 de *C. aequipetala* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. * $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



Gráfica 11. Efecto citotóxico sobre la línea celular SK-LU-1 de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de *C. aequipetala* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. * $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

Se calculó la IC₅₀ de las fracciones, encontrando que la fracción 8 posee los valores más bajos, en comparación con las fracciones 6 y 9-10, esto se puede observar en la tabla 8.

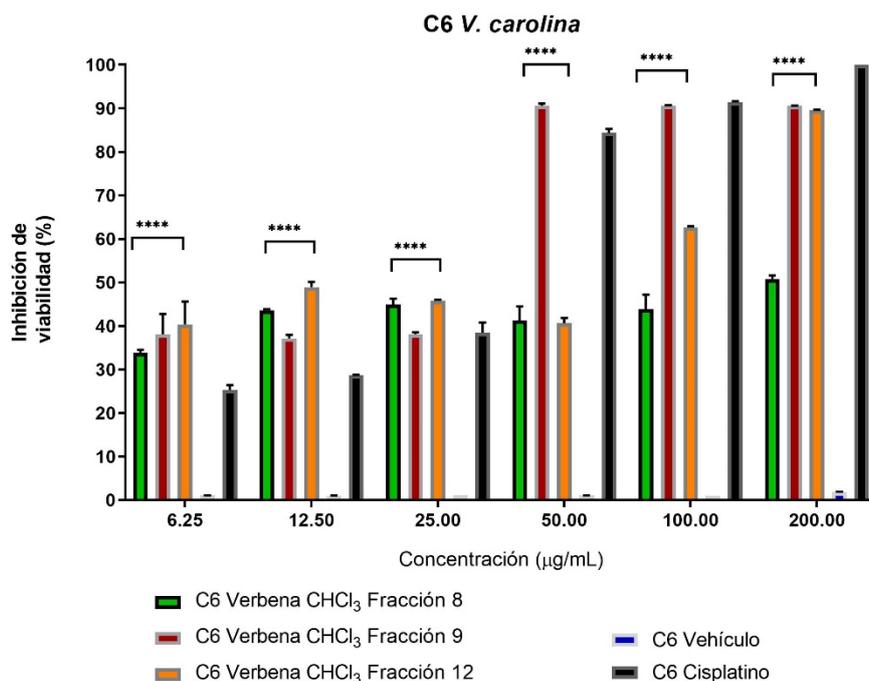
Tabla 8. IC₅₀ de las fracciones clorofórmicas 6, 8 y 9-10 de *C. aequipetala*, en las líneas celulares C6, DU-145 y SK-LU-1.

<i>C. aequipetala</i> extracto clorofórmico			
Línea celular	IC₅₀	IC₅₀	IC₅₀
	Fracción 6	Fracción 8	Fracción 9-10
C6	102.1 ± 1.02 µg/mL.	38.89 ± 1.04 µg/mL.	69.55 ± 1.09µg/mL.
DU-145	83.91 ± 1.07 µg/mL.	29.23 ±1.06 µg/mL.	43.4 ± 1.16 µg/mL.
SK-LU-1	54.55 ±1.07 µg/mL.	50.50 ± 1.05 µg/mL.	31.79 ± 1.05 µg/mL.

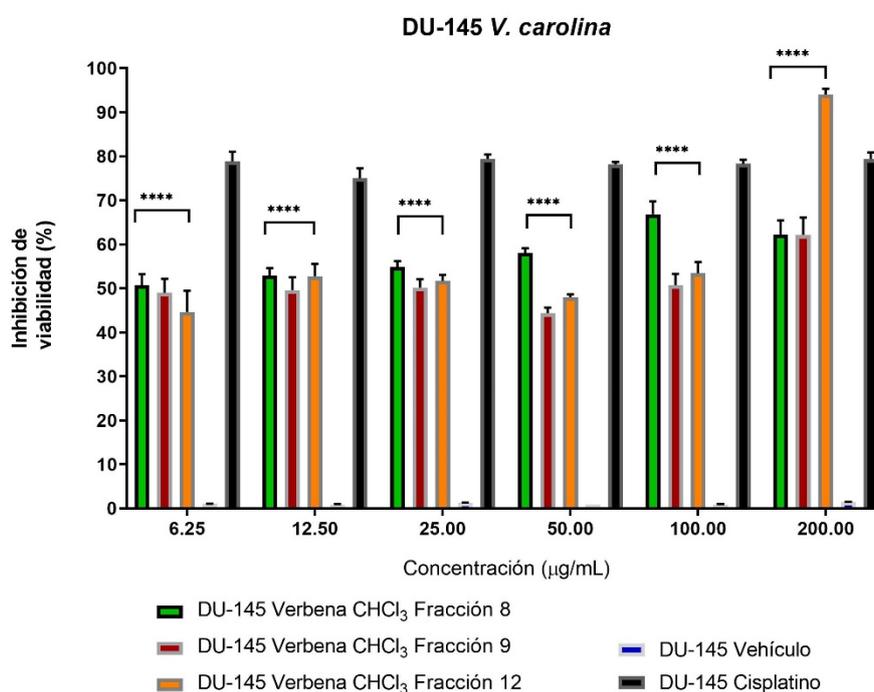
7.8.- Efecto citotóxico de las fracciones 8, 9 y 12 de *V. carolina*

Se probaron los extractos clorofórmicos de *V. carolina* frente a las líneas celulares C6, DU-145, HeLa para determinar cuál era la fracción con mayor actividad citotóxica, los tres extractos presentaron diferencia estadísticamente significativa, esto se puede observar en las gráficas 12, 13 y 14.

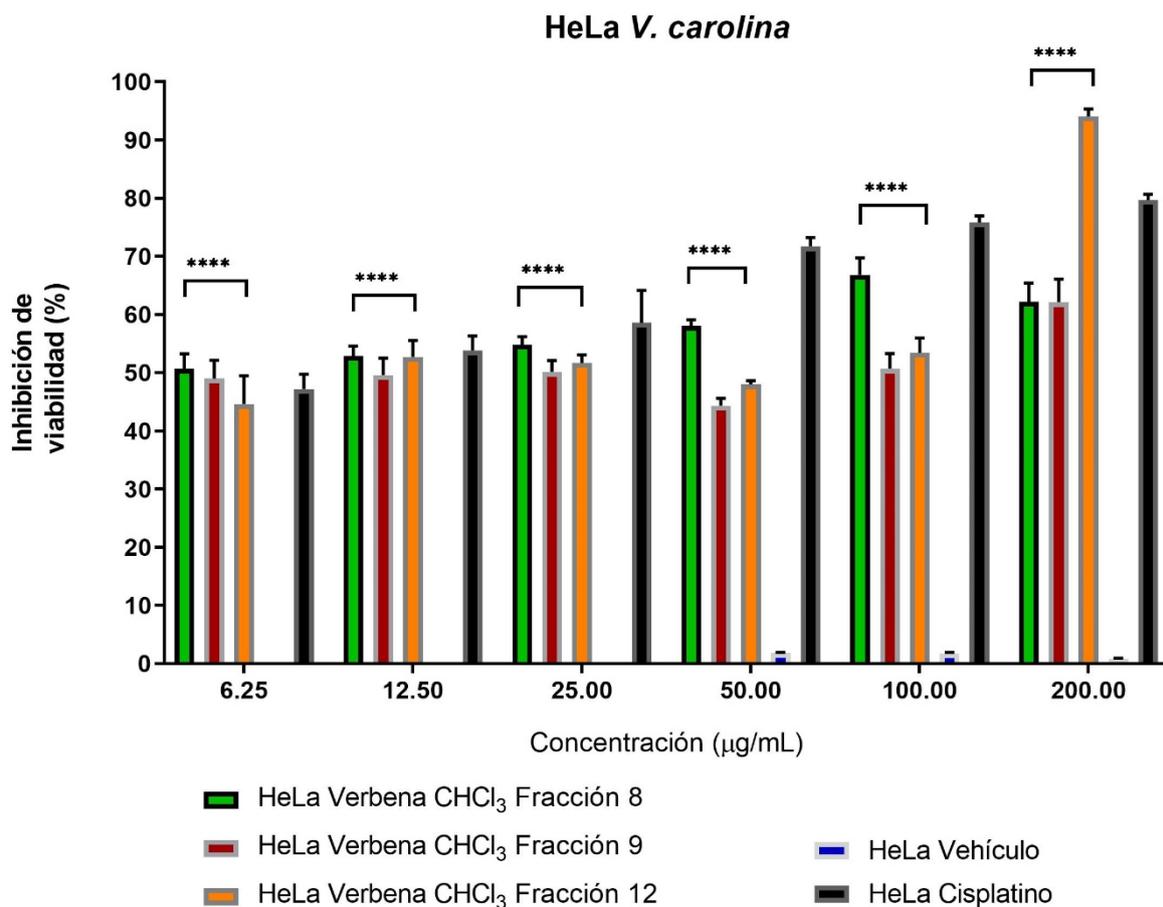
Se calculó la IC₅₀ de las fracciones, encontrando que la fracción 8 posee los valores más bajos, en comparación con las fracciones 9 y 12, esto se puede observar en la tabla 9, si bien la fracción 12 presenta un efecto citotóxico mayor, solo es a concentraciones mayores a los 100 µg/mL.



Gráfica 12. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



Gráfica 13. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$, con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



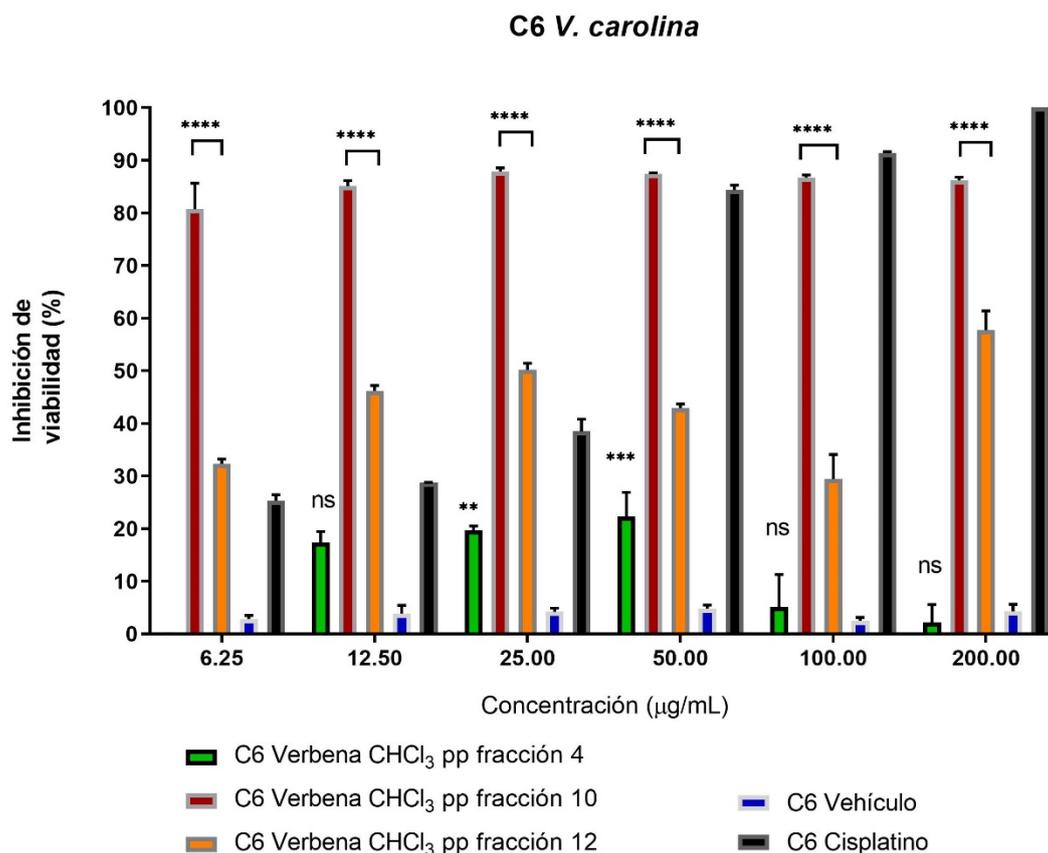
Gráfica 14. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado) mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$, con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

Tabla 9. IC_{50} de las fracciones clorofórmicas 8, 9 y 12 de *V. carolina*, en las líneas celulares C6, DU-145 y HeLa.

<i>V. carolina</i> extracto clorofórmico			
Línea celular	IC_{50} Fracción 8	IC_{50} Fracción 9	IC_{50} Fracción 12
C6	>200 $\mu\text{g/mL}$.	30.62 \pm 1.48 $\mu\text{g/mL}$.	102.1 \pm 1.09 $\mu\text{g/mL}$.
DU-145	45.58 \pm 1.25 $\mu\text{g/mL}$.	102.8 \pm 2.01 $\mu\text{g/mL}$.	115.7 \pm 1.58 $\mu\text{g/mL}$.
HeLa	44.62 \pm 1.37 $\mu\text{g/mL}$.	90.56 \pm 1.17 $\mu\text{g/mL}$.	119.8 \pm 2.07 $\mu\text{g/mL}$.

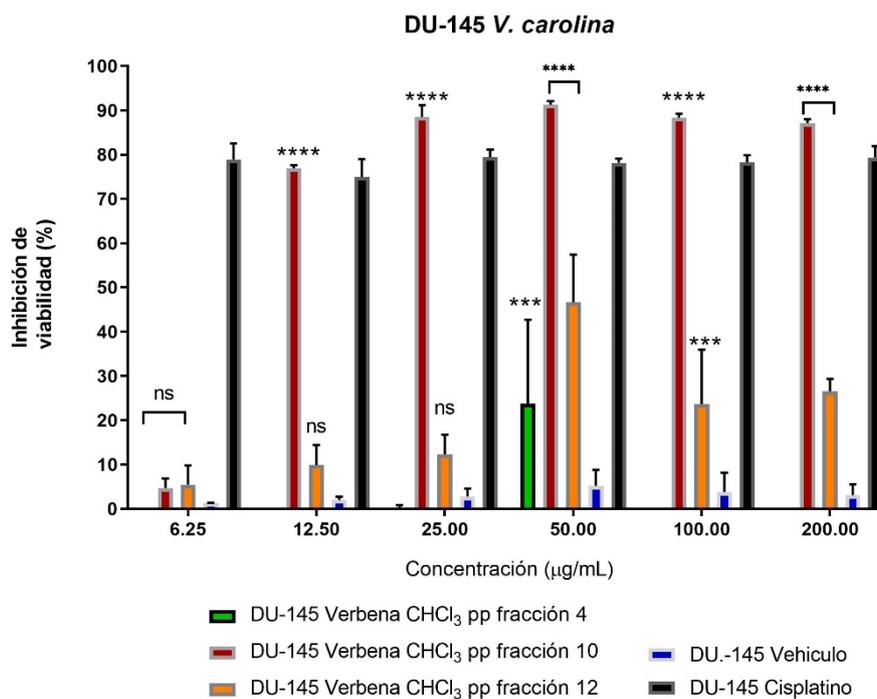
7.9.- Efecto citotóxico de los precipitados (pp) de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de *V. carolina*

Se analizaron los precipitados de las fracciones obtenidos de los extractos clorofórmicos de *V. carolina*, frente a las líneas celulares C6, DU-145, HeLa, SK-LU-1 y SW620 para determinar cuál es el precipitado con mejor actividad citotóxica.

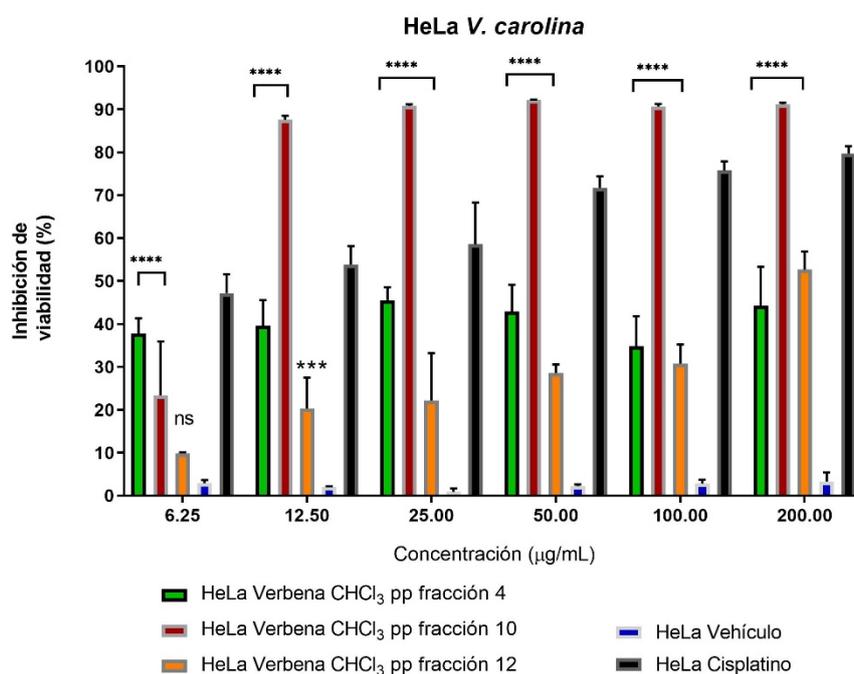


Gráfica 15. Efecto citotóxico sobre la línea celular C6 de los precipitados de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

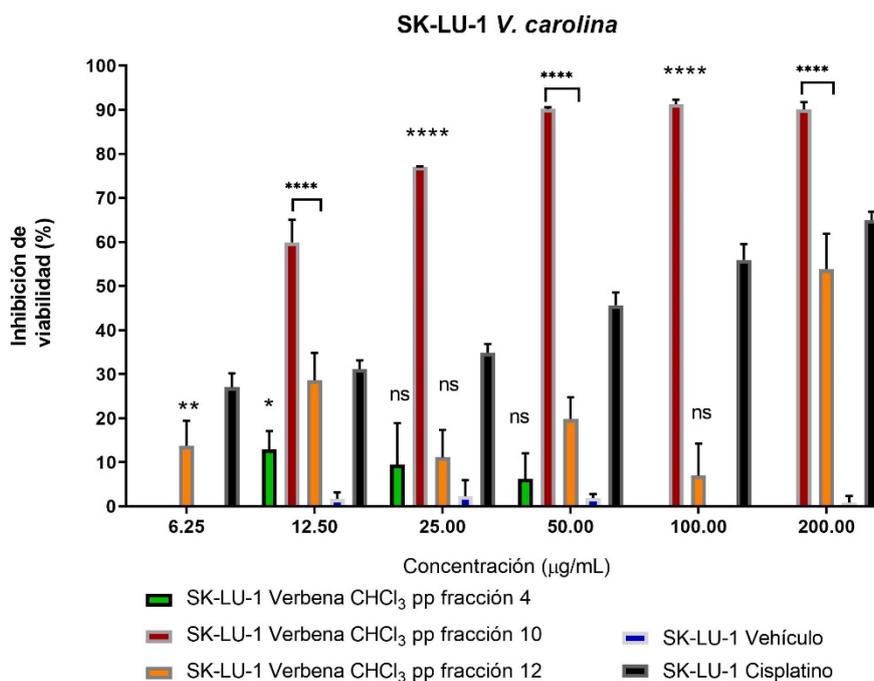
En la línea celular C6, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de los pp de las fracciones 10, 12 y el vehículo, por lo cual se consideran pp con actividad citotóxica, la fracción 10 tiene una IC_{50} de 12.22 µg/mL, mientras que los pp de la fracción 4 no poseen actividad al no existir diferencia con el vehículo como se observa en la gráfica 15.



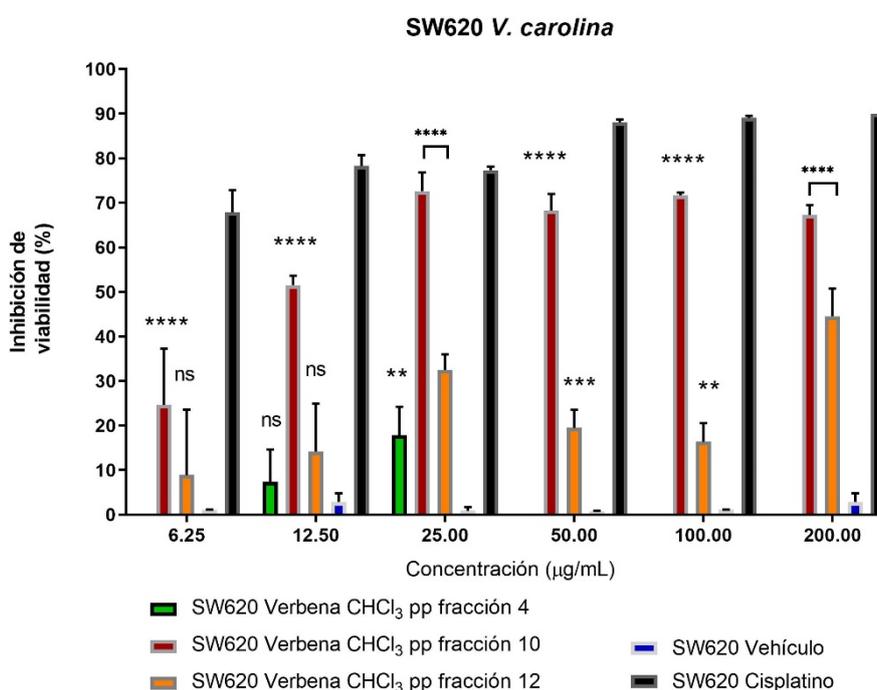
Gráfica 16. Efecto citotóxico sobre la línea celular DU-145 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



Gráfica 17. Efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de Verbena carolina y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



Gráfica 18. Efecto citotóxico sobre la línea celular SK-LU-1 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.



Gráfica 19. Efecto citotóxico sobre la línea celular SW620 de las fracciones clorofórmicas 4, 10 y 12 de *Verbena carolina* y vehículo (PVP + Medio Eagle suplementado), mediante el ensayo de MTT. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo. Los valores corresponden a la media obtenida de 3 repeticiones ($n=3$) \pm error estándar.

En la línea celular DU-145, los pp de las fracciones 4 y 12 de *Verbena carolina* no presentan diferencia con el vehículo, mientras que el pp de la fracción 10 es diferente y tiene una IC₅₀ de 10.92 µg/mL, como se observa en la gráfica 16.

Al analizar el efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa, el pp de la fracción 12 no presenta diferencia con el vehículo, mientras que los pp de las fracciones 4 y 10 son diferentes, el pp de la fracción 10 tiene una IC₅₀ de 19.72 µg/mL, como se observa en la gráfica 17.

Así mismo, en la línea celular SK-LU-1 (grafica 18), los pp de las fracciones 4 y 12 no presentan diferencia con el vehículo, mientras que el pp de la fracción 10 es diferente y tiene una actividad citotóxica con una IC₅₀ de 11.2 µg/mL.

Por último, en la línea celular SW620 (grafica 19), el pp de la fracción 4 de *Verbena carolina*, no presenta diferencia con el vehículo, por lo cual carece de actividad de interés, mientras que los pp de las fracciones 10 y 12 si tienen actividad con diferencia estadística respecto al control, el pp de la fracción 10 presenta una menor IC₅₀, siendo ésta de 12.37 µg/mL.

En general, se presenta en la tabla 10, que el pp de la fracción 10 del extracto clorofórmico de *Verbena carolina* presenta concentraciones inhibitorias menores que el control positivo, en este caso cisplatino, por lo cual es importante continuar el fraccionamiento bidirigido para aislar el o los compuestos. En esta etapa del proyecto el rendimiento obtenido al obtener esta fracción fue muy bajo, por lo cual no fue posible continuar hasta la caracterización por técnicas espectroscópicas para lograr determinar la estructura química de sus componentes.

Tabla 10. IC₅₀ de la fracción 10 clorofórmica de *V. carolina*, así como del cisplatino en las líneas celulares C6, DU-145, HeLa, SK-LU-1 y SW620

V. carolina extracto clorofórmico			
Línea celular	pp fracción	IC₅₀	IC₅₀ cisplatino
C6	10	12.22 ± 12.08 µg/mL	34.97 ± 1.04 µg/mL
DU-145	10	10.92 ± 1.27 µg/mL	4.14 ± 18.79 µg/mL
HeLa	10	19.72 ± 1.03 µg/mL	31.04 ± 1.12 µg/mL
SK-LU-1	10	11.2 ± 1.03 µg/mL	9.17 ± 1.12 µg/mL
SW620	10	12.37 ± 1.09 µg/mL	20.42 ± 1.13 µg/mL

14.10.- Análisis de toxicidad aguda

Como se observa en la tabla 11, la administración por vía oral de los extractos no presentó toxicidad aguda a las dosis evaluadas, ya que no se observaron alteraciones físicas o motoras, piloerección, irritación ocular, convulsiones o muerte.

Tabla 11. Resultados obtenidos del análisis de toxicidad aguda en ratones CD1 por el método de Lorke.

Extracto	1ª parte de la investigación		2ª parte de la investigación		Total
	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	
C. aequipetala metanólico	10	0/3	1,600	0/3	0/6
	100	0/3	2,900	0/3	0/6
	1,000	0/3	5,000	0/3	0/6
C. aequipetala clorofórmico	10	0/3	1,600	0/3	0/6
	100	0/3	2,900	0/3	0/6
	1,000	0/3	5,000	0/3	0/6
V. carolina metanólico	10	0/3	1,600	0/3	0/6
	100	0/3	2,900	0/3	0/6
	1,000	0/3	5,000	0/3	0/6
V. carolina clorofórmico	10	0/3	1,600	0/3	0/6
	100	0/3	2,900	0/3	0/6
	1,000	0/3	5,000	0/3	0/6

7.10.- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico y metanólico de *C. aequipetala* y *V. carolina*

Cada vez existen más evidencias que sugieren que los mecanismos oxidativos, juegan un papel de suma importancia en el desarrollo de patologías crónicas, como el cáncer, esto puede deberse al estrés oxidativo, el cual es un desajuste entre el oxígeno reactivo, las especies de nitrógeno y defensas antioxidantes, las cuales estarán atenuadas (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

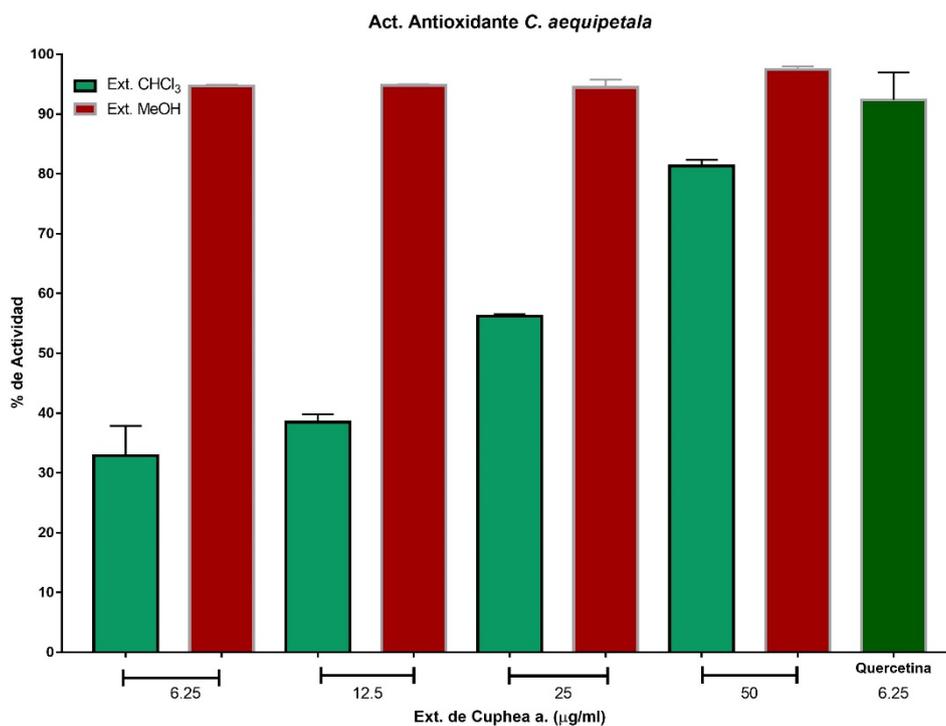
Si estas especies reactivas, no se eliminan de inmediato por las vías antioxidantes, estas podrían acumularse en las células, dañando lípidos, proteínas y ADN.

Estos sistemas de protección oxidante son enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, así como numerosos agentes no enzimáticos como las vitaminas A, C, E y carotenoides (Baierle, et al, 2015).

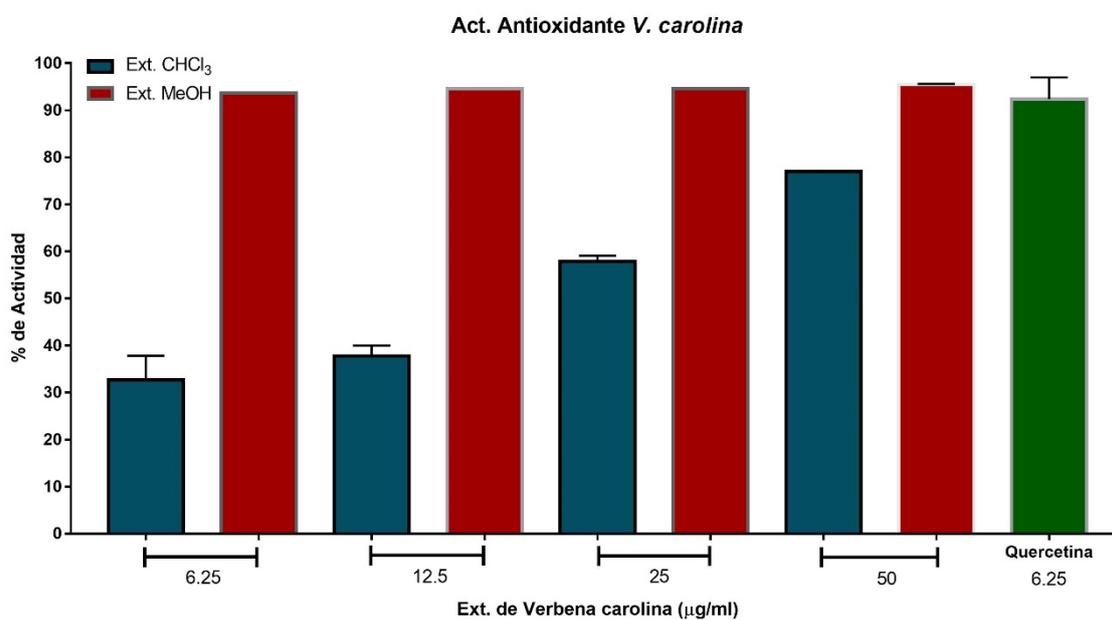
Es por lo anterior que realizar pruebas de actividad antioxidante a nuestros compuestos, nos brinda un panorama más amplio de su posible capacidad de uso frente a patologías como el cáncer, tema de este estudio. Se sabe que la acción de eliminación de radicales es uno de los mecanismos importantes para medir la actividad antioxidante.

Este ensayo permitió determinar la eliminación de especies de radicales por los compuestos antioxidantes presentes en los extractos. Los resultados mostraron la mayor actividad de los extractos metanólicos en comparación con los extractos clorofórmicos, esto se puede observar en las gráficas 20 y 21, probablemente debido a la presencia de un alto contenido de metabolitos secundarios, como pueden ser compuestos fenólicos. Sin embargo, es de hacer notar que el extracto clorofórmico presentó actividad antioxidante dependiente de la concentración.

La quercetina es un flavonoide abundante en vegetales con propiedades de eliminación de radicales bien conocidas que se utiliza a menudo como un compuesto de referencia en muchas pruebas de antioxidantes debido a la presencia de grupos OH en su estructura molecular, que se oxidan para formar grupos carbonilo (Poonam y Pratima, 2018). Su reacción con 2,2-difenil-1-picrihidracilo (radical DPPH artificial) es rápida y estequiométrica. Por lo que se utilizó como referencia para este estudio. (Casanova, 2012)



Gráfica 20. Actividad antioxidante de los extractos de *C. aequipetala*, así como de quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).



Gráfica 21. Actividad antioxidante de los extractos de *V. carolina*, así como de quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).

8.- Conclusiones

Se analizaron las partes aéreas (tallo y hojas) de *C. aequipetala* y *V. carolina*, logrando determinar la presencia de metabolitos secundarios mediante un análisis fitoquímico del material vegetal, así como técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

Se obtuvieron los extractos metanólicos y clorofórmicos de ambas plantas y se realizó el estudio biodirigido de los extractos vegetales.

Se evaluó el efecto citotóxico y determinó que los extractos clorofórmicos son los que presentan un mayor efecto citotóxico en comparación con los extractos metanólicos.

Al llevar a cabo la separación biodirigida de los extractos clorofórmicos de ambas plantas, por medio de cromatografía en columna abierta, en el caso de *Cuphea aequipetala*, se obtuvieron 10 fracciones, y de *Verbena carolina* se obtuvieron 14 fracciones, las cuales fueron evaluadas para determinar su actividad citotóxica, logrando identificar aquellas que presentaron una mayor actividad, la fracción con mayor actividad citotóxica de *C. aequipetala* fue la fracción número 8, mientras que de *V. carolina*, la fracción 8 y el precipitado de la fracción 10 fueron los que mostraron un mayor efecto citotóxico frente a las líneas celulares.

Del extracto metanólico de *C. aequipetala* se logró aislar un compuesto que se identificó como manitol, el cual fue probado en distintas líneas celulares para evaluar su actividad citotóxica, sin embargo, no presentó actividad alguna.

Se logró aislar un compuesto, del extracto clorofórmico de *V. carolina* el cual fue identificado mediante diversas técnicas espectrométricas y espectroscópicas como β -sitosterol.

Se requiere obtener una mayor cantidad del compuesto aislado para determinar su actividad citotóxica, frente a diversas líneas celulares.

Así mismo, los resultados de la cromatografía en capa fina de las 14 fracciones obtenidas del extracto clorofórmico nos indican la presencia de compuestos terpénicos en las fracciones menos polares, sin embargo, no podemos descartar la presencia de compuestos fenólicos en las fracciones, esto debido a la presencia de actividad

antioxidante en el extracto clorofórmico, la cual se puede atribuir a compuestos de tipo fenólico.

Finalmente, las plantas motivo de este estudio poseen actividad citotóxica sobre las líneas celulares utilizadas, lo que las hace potencialmente útiles para tratar de aislar los compuestos responsables de su actividad farmacológica; sin embargo, dado el rendimiento obtenido, será necesario buscar alternativas para la producción de las plantas y asegurar su reproducción.

9.- Perspectivas

- Determinar la composición de las fracciones obtenidas de *C. aequipetala* y *V. carolina* que mostraron actividad farmacológica.
- Se requiere una mayor cantidad de material vegetal para continuar con el estudio.
- Estandarizar el extracto activo.
- *Cuphea aequipetala* y *Verbena carolina* representan una alternativa en la búsqueda de moléculas para tratamiento del cáncer, por lo que es necesario continuar el estudio de las plantas como fuente de fitofármacos
- Se debe aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad farmacológica del precipitado de la fracción 10 de *Verbena carolina*.

10.- Referencias

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 1324–1337.
- Aguilar, R. S., Echeveste, R. N., López, V. E., Aguilar, C. A., Vega, Á. E., & Reyes, C. R. (2012). Etnobotánica, micrografía analítica de hojas y tallos y fitoquímica de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae): una contribución a la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 316-330.
- American Cancer Society. (28 de 09 de 2019). *Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia*. Obtenido de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
- Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Chaidez-Ayala, A., Ramírez-Noya, D., Delgado-Alvarado, E., Torres-Ricario, R., . . . Alanís-Bañuelos, R. (2016). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenacea as antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian Journal of Biology*, 98-107.
- Badke Rossato, M., Denardin Budó, M. d., Titonelli Alvim, N. A., Dolejal Zanetti, G., & Vanessa Heisler, E. (2012). Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. . *Rev. Texto Contexto Enferm*, 363-370.
- Baierle, M., Nascimento, S. N., Moro, A. M., Brucker, N., Freitas, F., Gauer, B., . . . Garcia, S. C. (2015). Relationship between Inflammation and Oxidative Stress and Cognitive Decline in the Institutionalized Elderly. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Boticario Boticario, C., & Cascales Angosto, M. (2008). *Innovaciones en cáncer*. España: Librería UNED.
- Bradbury, R. H. (2007). *Topics in medicinal chemistry*. United Kingdom: Springer.
- Burkhart, D. S. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev.*, 671–682.

-
-
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Lat. Am. J. Pharm*, 265-78.
- Cardenas, S. B., López-Laredo, A., Martínez-Bonfil, B., Bermúdez-Torres, K., & Trejo-Tapia, G. (2012). Avances en la fitoquímica de *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* y *C. lanceolata*: extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 401 - 413.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 402 - 405.
- Castro, G. M., Pérez-Guil, R. F., & Madrigal, A. L. (1991). Composición Química, Factores Tóxicos y Digestibilidad de la Planta Arvense *Verbena carolina* L. *Turrialba*, 289-292.
- Chiriboga, X. N. (2003). *Tesis Del Diplomado Superior, Investigación y Gestión de Proyectos en Ciencia y Tecnología*. Centro de Desarrollo e investigación de plantas medicinales.
- de la Garza, S. J., & Juárez, S. P. (2014). *El cáncer*. Monterrey: Publicaciones, UANL.
- Devita, V. T., Hellman, S., & Rosenberg, S. A. (2008). *Cancer: Principles and Practice of Oncology 8th edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Dominguez, A. X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa.
- Durán Palma, Melissa Hidekel, Martínez Cruz, N. K., Miranda López, A., Rola Aburto, A., & Rosas López, R. (2014). Investigación preliminar etnobotánica y colección de la flora terapéutica de Villa Nueva, Teopoxco. *SNIB-CONABIO*, 627.
- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizabal, G. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 67-74.

-
-
- Fan, K., & Uzman, B. G. (1977). Rat glioma cells (C,) cultured in serum-free defined medium. *Experimental Cell Research*, 397-401.
- Fatouma Alimirah, Jianming Chen, Zane Basrawala, Hong Xin, & Divaker Choubey. (2006). DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters*, 2294–2300.
- Favari-Perozzi, L., Nava-Álvarez, R., & Meléndez-Camargo, M. E. (2007). Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata. *Revista mexicana de ciencias farmaceuticas*, 19-25.
- Gaona, E. (1999). *Cáncer, radiación y seguridad radiológica*. CDMX: Edilibros, S. A.
- Geffrey A. , C. (2000). Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Pergamon*, 463-480.
- Goldsmith,, K. T., Listinsky, C. M., & Garver Jr, R. I. (1991). Serum Response Heterogeneity Among Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines. *American Journal of Pathology*, 939-947.
- Hanahan, D. A., & Weinberg, R. (2011). *Cancer: The Next Generation*. Elsevier.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 353–364.
- Harbone, J. B. (1998). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plan analysis* (Vol. 3). United Kingdom: Chapman & Hall.
- International Agency for Research on Cancer. (12 de 09 de 2018). *New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018*. Obtenido de <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>
- Jhoana León, C., Milena Gómez, S., Johanna Morantes, S., Patricia Cordero, C., & Ancízar, F. (2006). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica*, 161-168.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill .

-
-
- Kim, Y. S., Tsao, D., Siddiqui, B., Whitehead, J. S., & Arnstein, P. (1980). Effects of Sodium Butyrate and Dimethylsulfoxide on Biochemical Properties of Human Colon Cancer Cells. *American Cancer Society*, 1185- 1192.
- King, J. B. (2006). *Cancer Biology*. England: Pearson Education Limited.
- Lara-Issasi, G., Salgado, C., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N., Morales, A., Águila, M. A., . . . Aguilar, M. I. (2019). Antimicrobial, Antioxidant Activities, and HPLC Determination of the Major Components of *Verbena carolina* (Verbenaceae). *molecules*, 1-17. doi:10.3390/molecules24101970
- Lipinski, M. J. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, 7873–7882.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial.
- Lodish, H. (2016). *Biología celular y molecular* (7 ed.). Ciudad de Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Lorke , D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology*, 275-287. doi:10.1007/bf01234480
- M. Price, P., Yu, F., Kaldis, P., Eiman , A., Grażyna , N., L. Safirstein, R., & Megyesi, J. (2006). Dependence of Cisplatin-Induced Cell Death In Vitro and In Vivo on Cyclin-Dependent Kinase 2. *J Am Soc Nephrol*, 2434–2442.
- Mans, D. R., Da Rocha, A. B., & Schwartzmann, G. (2000). Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist*, 185-198.
- Martínez, M. (1967). *Las plantas medicinales de México*. México DF: Ediciones Botas.
- Martínez, M. (1994). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*. México: Fondo de cultura economico.
- Mayakrishnan Prabakaran, Seung-Hyun Kim, Asokan Sasireka, Venkatesan Hemapriya, & Ill-Min Chung . (2017). b-Sitosterol isolated from rice hulls as an efficient

-
-
- corrosion inhibitor for mild steel in acidic environments. *The Royal Society of Chemistry*, 3900--3907.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 55-63.
- N. Farnsworth, O. A. (1985). *Medicinal plants in therapy*. *Who Bulletin of World Health Organization*. World Health Organization,.
- OMS. (Febrero de 2014). *10 datos sobre el cáncer*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2016, de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>
- OMS. (Febrero de 2015). *Cáncer*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OMS. (Marzo de 2017). *Cada año, las enfermedades no transmisibles provocan 16 millones de defunciones prematuras, por lo que la OMS insta a redoblar esfuerzos*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2016, de <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/noncommunicable-diseases/es/>
- Peralta, S. (2008). *Verbenáceas (Dicotiledóneas)*. *Catálogo taxonómico de especies de México*. *Capital natural de México* (Vol. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad). México: Capital natural de México.
- Poonam, M. S., & Pratima, S. J. (2018). Comparative study of antioxidant activity, polyphenolics, content and FTIR analysis, of various extracts, from different parts of *Excoecaria agallocha*. *Global Journal For Research Analysis*, 60-62.
- Public Health England and Cancer Research UK. (26 de 10 de 2017). *Cancer Research UK*. Obtenido de <https://scienceblog.cancerresearchuk.org/2017/10/26/cancer-patients-diagnosed-at-an-earlier-stage-are-more-likely-to-have-surgery-than-chemotherapy/>
- Puck, T. T., Marcus, P. I., & Cieciura, S. J. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro. *Journal of experimental medicine*, 273-284.

-
-
- Quackenbush, J. (2006). *Microarray análisis and tumor clasificación*. England: N Eng J Med.
- Romero, C. R., & Nora, O. (2013). *Biología Celular y Humana*. Bogotá: Ecoe.
- Rzedowski Rotter, J., & Calderón de Rzedowski, G. (Septiembre de 1992). Flora del bajo y de regiones adyacentes. Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Ecología, A.C.
- Rzedowski, G. C. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México* (2da. ed.). Pátzcuaro Michoacán: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad . *Revista de Investigación Médica Sue México*, 161-168.
- Sausville, E., & Johnson, J. (2000). Molecules for the millennium: how will they look? New drug discovery year 2000. *British Journal of Cancer*, 1401–1404. doi:10.1054/bjoc.2000.1473
- Secretaría de Salud. (22 de Octubre de 2018). *Secretaría de salud Prensa*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
- Singh, S. P. (2003). Importance and bibliography. *Applied Botany Abstracts*, 60-75.
- Society American Cancer. (21 de 01 de 2018). *Cancer Facts and Figures 2018*. Obtenido de American Cancer Society: <https://www.cancer.gov>
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., & Paulson, D. F. (1978). Isolation of human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int. J. Cancer*, 274-281.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, H. G., & Paulson, D. F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int. J. Cancer*, 274-281.
- Takimoto, C. H. (2003). Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. *Cancer Chemother Pharmacol*, 29-33. doi:DOI 10.1007/s00280-003-0623-y
- Talmadge, J. F. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.*, 5649–5669.

-
-
- Turner, T. (2012). Development of the Polio Vaccine: A Historical Perspective of Tuskegee University's Role in Mass Production and Distribution of HeLa Cells. *J Health Care Poor Underserved*, 5-10.
- Tyler, V. E. (2000). Herbal medicine: from the past to the future. *Public Health Nutrition*, 447-452.
- U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information. (02 de 11 de 2019). *Pub Chem*. Obtenido de beta-Sitosterol: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-sitosterol>
- Valdespino, V. (2014). *Biología celular-molecular del cáncer*. Mexico: UAM-X, Ciencias Biológicas y de la salud.
- Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de fitoquímica*. Ciudad de México: Trillas.
- Valencia, O. C. (1995). *Fundamentos de fitoquímica*. Ciudad de México: Trillas.
- Venegas Casanova, E. A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV - Scientia*, 161-175.
- Venkata Sai, P. C., & Indra, P. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 239-242.
- Villaseñor, M. E., & Rogelio, M. M. (2009). *Fundamentos de oncología*. Mexico D.F.: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM,.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. Munich Alemania: Springer.
- Waizel, B. J., Martínez, P. G., Villarreal, O. M., Alonso, C. D., & Pliego, C. A. (mayo de 2003). Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae). *Polibotánica*(15), pp. 99-108.
- Wertz, I. D. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ*, 14-24.

Yamori, T. (2003). Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74-79. doi:10.1007/s00280-003-0649-1

Zavala, S. M. (1998). Estudio Químico - Farmacológico de platas con actividad antidiarreica. *Tesis doctoral UAM-X*.

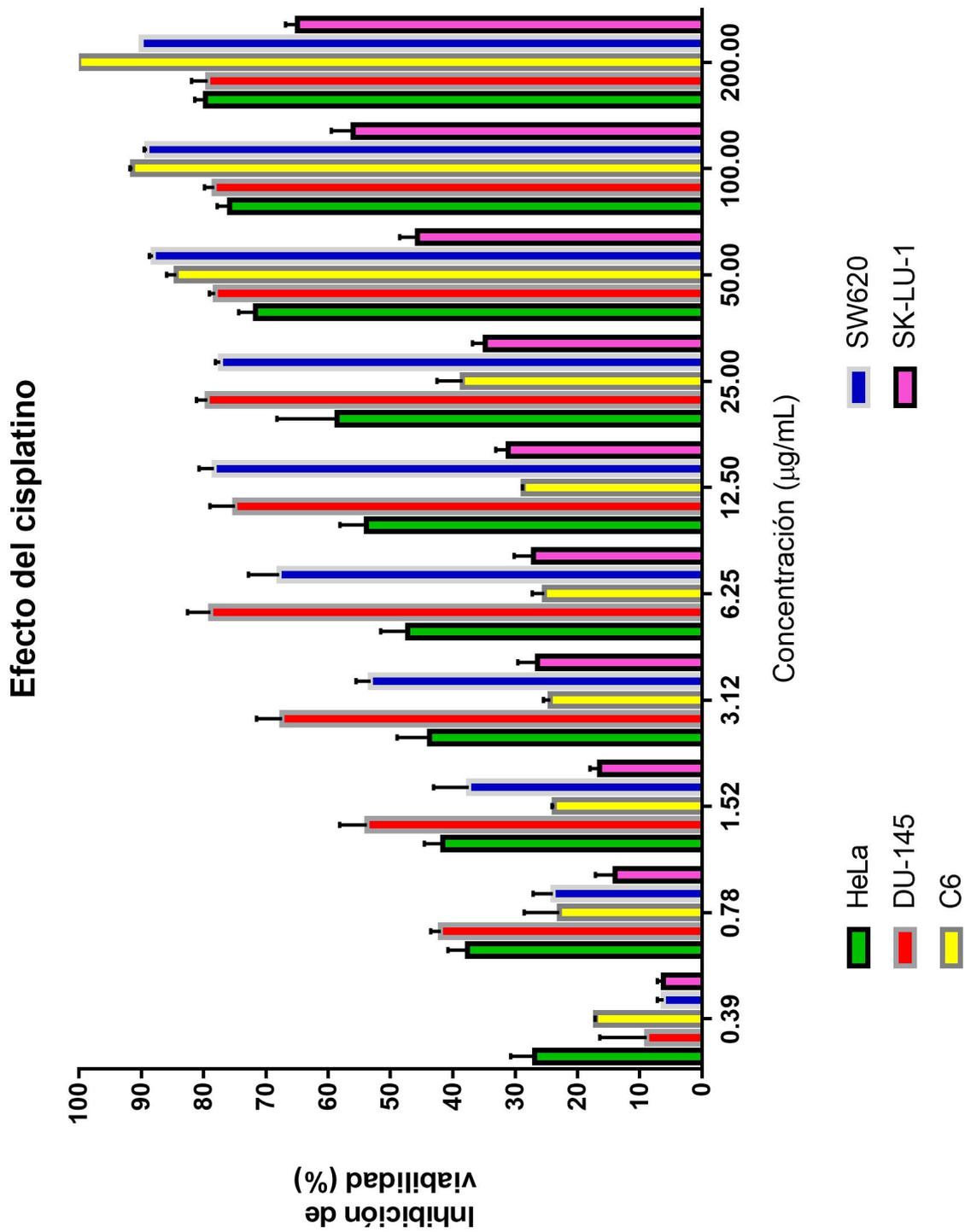
11.- Anexos

11.1.- Valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C para β -sitosterol

Posición	Experimental		Literatura (Venkata Sai & Indra, 2012)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	37.3	1.84, 1.06	37.5	
2	31.6	1.47, 1.77	31.9	
3	70.7	3.39, 3.69 _{OH}	72.0	3.53 (tdd, 1H, J=4.5, 4.2, 3.8 Hz)
4	42.4	2.20	42.5	
5	141.4		140.9	
6	120.6	5.32	121.9	5.36 (t, 1H, J= 6,4 Hz)
7	31.7	1.96, 1.56	32.1	
8	31.9	1.48	32.1	
9	50.3	0.95	50.3	
10	36.4		36.7	
11	20.9	1.52	21.3	
12	39.7	2.05, 1.20	39.9	
13	42.1		42.6	
14	56.7	1.05	56.9	
15	24.0	1.37	26.3	
16	28.0	1.32	28.5	
17	56.0	1.16	56.3	
18	11.3	0.73	12.0	1.01 (s,3H)
19	18.9	1.02	19.0	0.68 (s, 3H)
20	36.0		36.3	
21	18.3	0.97	19.2	0.93 (d, 3H, J=6.5 Hz)
22	33.7	1.13, 1.24	34.2	
23	25.8	1.23	26.3	
24	45.8	0.98	46.1	0.82 (t, 3H, J=7.2 Hz)
25	29.0		29.4	
26	19.2	0.86	20.1	0.83 (d, 3H, J=6.4 Hz)
27	18.4	0.84	19.6	0.81 (d, 3H, J=6.4 Hz)
28	22.8	1.29	23.3	
29	11.38	0.87	12.2	0.84 (t, 3H, J=7.2 Hz)

Anexo 1. Valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C para β -sitosterol, la asignación de señales interpretadas se llevó a cabo mediante experimentos bidimensionales como COSY HSQC y correlaciones HMBC y H2BC, los valores de desplazamiento químico están reportados en δ (ppm).

11.2.- Curva concentración respuesta del cisplatino.



Anexo 2. Curva concentración respuesta del cisplatino.

11.3.- Constancia de participación congreso internacional, Roma Italia.



Natural Products Medicinal Plants & Marine Drugs

June 11-12, 2018 | Rome, Italy

Evaluation of the cytotoxic effect of extracts of *Cuphea aequipetala* Cav. and *Verbena carolina* L. on cancer cell lines

Calleros F R, Gomez H M, Gonzales L A and Zavala S M A
Universidad Autónoma Metropolitana, México

Cancer is itself a chronic degenerative disease, which has a greater incidence in adults than in younger people. It is the growth and uncontrolled spread of abnormal cells. The current therapy against cancer, causes severe effects and reactions in patients; however, treatments with new molecules could reduce these effects. Plants are an important source of molecules that can function as antitumor agents and help fight cancer. The purpose of this work is to propose a therapeutic alternative to the existing compounds for the cancer treatment looking forward to reduce the side effects. Therefore, in the present work, the cytotoxic effect of the chloroformic extracts of *Cuphea aequipetala* and *Verbena carolina*, on HeLa, C6, and DU-145 cell lines was studied, the separation of the active extracts was carried out, and the responsible fraction of biological activity was determined. The phytochemical test showed that the plants possess compounds that could reach pharmacological activity such as alkaloids, phenols, and terpenes among others, confirming the previous studies that these plants have. Inhibition of growth cell was observed with the chloroformic extract of *V. carolina* at concentrations of 6.25 µg/ml on HeLa, inhibition of 46.13±1.15% on the DU-145 66.25±0.26% and on the C6 line of 13.17±0.47; while for the chloroform extract of *C. aequipetala*, was observed a percentage of inhibition at concentration of 6.25 µg/ml on the HeLa of 36.47±4.04%, while on DU-145 was 23.16±9.21% and C6 line was not tested.

Biography

Calleros F R obtained his Bachelor's Degree in 2015 and is a Chemist. He is currently pursuing his Master's Degree in Pharmaceutical Sciences at the UAM in Mexico City. He has worked for the Mexican Academy of Sciences, has attended multiple conferences and seminars, has collaborated with the Faculty of Chemistry at the National Autonomous University of Mexico, working on synthesis of hormones with therapeutic activity.

siltecalleros@hotmail.com

Notes:

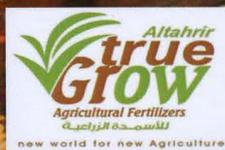
4th International Conference and Exhibition on

NATURAL PRODUCTS, MEDICINAL PLANTS & MARINE DRUGS

June 11-12, 2018 | Rome, Italy



Exhibitor



Day 1 June 11, 2018

08:30-09:30 Registrations

Hall - Olimpica 2

conference**series.com** 09:30-09:50

Opening Ceremony

Keynote Forum

09:50-10:00 Introduction

Title: Arsenicin A from the marine sponge *Echinochalina bargibanti* as a drug lead:

10:00-10:30 Synthesis and antitumor evaluation of related arsenicals

Ines Mancini, University of Trento, Italy

10:30-11:00 Title: Anti-diabetic and anti-obesity effects of natural flavonoids

Hitoshi Ashida, Stanford University School of Medicine, USA

Networking & Refreshment Break: 11:00-11:20 @ Foyer

11:20-11:50 Title: New and bioactive compounds from Hawaiian microorganisms

Shugeng Cao, University of Hawaii, USA

11:50-12:20 Title: Sustainable development and the future of marine natural products in Egypt: SMIAF-Prototype project

Mohamed Ashour Fikry Metwally, National Institute of Oceanography and Fisheries, Egypt

Group Photo 12:20-12:35

Sessions: Natural Products | Marine Biotechnology | New Sources and Approaches to Natural Products
Development of Marine Drugs and Natural Products | Natural Products Chemistry | Natural Products
Drug Discovery | Phytomedicine and Phytochemistry | Medicinal Natural Products | Anti-cancer
agents in Medicinal Plants | Therapeutic Drugs and Personalized Medicines

Session Chair: Ines Mancini, University of Trento, Italy

Session Chair: Hitoshi Ashida, Stanford University School of Medicine, USA

Session Introduction

12:35-13:00 Title: Natural sesquiterpene lactones as potential Trypanocidal and Leishmanicidal agents

Liliana V Muschietti, University of Buenos Aires, Argentina

Lunch Break: 13:00-13:40 @ Hotel Restaurant

13:40-14:05 Title: Study of acute oral toxicity and evaluation of the nephroprotective, hepatoprotective and cardioprotective properties of *Gomphrena celosioides*, *Cola nitida* and *Entandrophragma angolense* - three plants of Ivorian traditional medicine

Bamba Abou, Université Félix Houphouët-Boigny, Ivory Coast

14:05-14:30 Title: Trichiliasinenoids A-C, three novel 6,7-secomexicanolide limonoids with a 7,29-linkage from *Trichilia sinensis*

Donghua Cao, Chinese Academy of Sciences, China

14:30-14:55 Title: Herb-drug interaction of *Andrographis paniculata* (Nees) extract and andrographolide on pharmacokinetic and pharmacodynamic of Etoricoxib, Nabumetone and Naproxen in rats

Aishwarya Balap, PES Modern College of Pharmacy, India

14:55-15:20 Title: Cytotoxic effect of peptides isolated from sea cucumber, *Holothuria parva*, muscle protein hydrolysis on the breast cancer cell line (4T1)

Samira Besharati, Tarbiat Modares University, Iran

15:20-15:45 Title: Comparison of conventional and microwave assisted acid mediated pectin extraction from peels of *Manilkara zapota*

Nausheen Hameed Siddiqui, University of Karachi, Pakistan

Page 3

Networking & Refreshment Break: 15:45-16:05 @ Foyer

- 16:05-16:30** **Title: Solid state culture and metabolites analysis of white *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies**
Yuh Shan Chung, Development Center For Biotechnology, Taiwan
- 16:30-16:55** **Title: Some biochemical parameters and their relation with elevation of ovary tumor marker – our experience**
Slobodan Dunjić, Center for Integrative Procedures and Supplements, Serbia
- 16:55-17:20** **Title: Presence of high blood pressure and level of some biochemical parameters – our experience**
Dušan Vešović, VISAN - Sanitary Medical School of Applied Sciences, Serbia
- 17:20-17:45** **Title: Identification and optimization of lead compound obtained from *Celosia argentea***
Rukhsana A Rub, Smt Kashibai Navale College of Pharmacy, India

Panel Discussion

Day 2 June 12, 2018

Hall - Olimpica 2

Keynote Forum

- 09:50-10:00** **Introduction**
Title: Bioactive biomasses in food and not food application-the case study of Brassicales
- 10:00-10:30** **Luca Lazzeri**, Council for Agricultural Research and Economics–Cereal and Industrial Crop Research Centre, Italy
Title: Stability enhancement of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* with respect to their application as food colorant
- 10:30-11:00** **Santosh Bhujbal**, Dr D Y Patil Institute of Pharmaceutical Sciences and Research, India

Networking & Refreshment Break: 11:00-11:20 @ Foyer

- 11:20-11:50** **Title: A research pipeline for the discovery of bioactive small molecules with anti-aging activity from the Marine Mesophotic Zone**
Ioannis P Trougakos, National and Kapodistrian University of Athens, Greece
- 11:50-12:20** **Title: Aquatic, semi-aquatic medicinal plants used as food and remedy in Iran**
Mohammadbagher Rezaee, Research Institute of Forest and Rangelands, Iran

Sessions: Natural Products as Anti-Cancer Drugs | Marine: The Ultimate Source of Bioactives and Drug Metabolites | Marine Natural Products Drug Discovery | Bioactive Natural Products | Bioactive Natural Products from Marine Bacteria | Marine Probiotics and Prebiotics | A Promising Future for Marine Drugs and Natural Products | Medicinal Chemistry & Drug Discovery

Session Chair: Shugeng Cao, University of Hawaii, USA

Session Chair: Mohammadbagher Rezaee, Research Institute of Forest and Rangelands, Iran

Session Introduction

- 12:20-12:45** **Title: Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of γ -keto ester derivatives of carvacrol and thymol**
Geneive E Henry, Susquehanna University, USA

Lunch Break: 12:45-13:30 @ Hotel Restaurant

- 13:30-13:55** **Title: An investigation of compounds and their bioactivities from Jamaican *Gracilaria mammillaris*, *Clavelina picta* and *Plexaurella nutans***
Doleasha Davis, The University of the West Indies–Mona, Jamaica
- 13:55-14:20** **Title: Anti-inflammatory activity of Lupalbigenin from *Derris scandens* in Raw 264.7 cells**
Sriklung K, Srinakharinwirot University, Thailand
- 14:20-14:45** **Title: Oxodolastanes from the Jamaican brown alga, *Canistrocarpus cervicornis***
Sanjay Campbell, The University of the West Indies–Mona, Jamaica
- 14:45-15:10** **Title: Improvement of secondary metabolites from *Phyllanthus odontadenius* against malaria by mutagenesis**
Rufin Kikakedimau Nakweti, Regional Center for Nuclear Studies of Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

- 15:10-15:35 **Title: Natural products with aromatic structure and their influence in vegetable systems**
Corneliu Tanase, University of Medicine and Pharmacy, Romania
- 15:35-16:00 **Title: Evaluation of the hepatoprotective activity of the ethanol extract of *Gomphrena celestioides***
Bamba Abou, Université Félix Houphouët-Boigny, Ivory Coast

Networking & Refreshment Break: 16:00-16:15 @ Foyer

Poster Presentations 16:15-17:15

Poster Judge : Santosh Bhujbal, Dr D Y Patil Institute of Pharmaceutical Sciences and Research, India

- NP-01 **Title: N-acetyldopamine dimers with anti-platelet aggregation activity from *Oxya chinensis sinuosa***
InWha Park, Chungnam National University, South Korea
- NP-02 **Title: Cucurbitane Triterpenoids derived from *Momordica charantia* inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells**
DaYoung Kim, Chungnam National University, South Korea
- NP-03 **Title: Discorhabdin alkaloids from *Antarctic Latrunculia* spp. sponges as a new class of cholinesterase inhibitors**
Ines Mancini, University of Trento, Italy
- NP-04 **Title: Comparative *in vivo* antidiabetic evaluation of Glimepiride, Fenugreek and their combination in Streptozotocin induced diabetic rats**
Hala H Zaatout, Alexandria University, Egypt
- NP-05 **Title: Total phenolic content, antioxidant activity and cytotoxicity on *Vibrio fischeri* of herbal blends infusions from Greek flora: A synergism evaluation**
Elpida Giorgi, University of Athens, Greece
- NP-06 **Title: Screening British Columbia (BC) wild mushrooms for anti-cancer properties**
Bryan Chu Chwen LIM, University of Northern British Columbia, Canada
- NP-07 **Title: Evaluation of the cytotoxic effect of extracts of *Cuphea aequipetala* Cav. and *Verbena carolina* L. on cancer cell lines**
Calleros F R, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico
- NP-08 **Title: Chemical-Pharmacological study of *Centaurea americana***
Jimenez P E, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

Panel Discussion

Award & Closing Ceremony

Bookmark your dates

6th International Conference and Exhibition on

Natural Products, Medicinal Plants & Marine Drugs

June 24-25, 2019 Vienna, Austria

E-mail: naturalproducts@conferenceseries.net

Website: naturalproducts.pharmaceuticalconferences.com

Page 5

FPN0050



"INNOVACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO
CON IMPACTO EN LA SALUD Y BIENESTAR DE LA POBLACIÓN"

LI Congreso Nacional de CIENCIAS FARMACÉUTICAS



La Asociación Farmacéutica Mexicana. A.C.
otorga el presente

RECONOCIMIENTO a:

Miguel Angel Zavala Sanchez, Raul Calleros Flores, Martín Gómez
Hernández, Aída Hamdan Partida, Jaime Amadeo Bustos Martínez

**Por la presentación del trabajo:
Efecto citotóxico de Cuphea aequipetala Cav. y Verbena carolina L. en líneas
celulares**

Septiembre 2018, Puerto Vallarta, Jalisco.

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Presidencia de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

Dra. Verónica Rodríguez López
Dirección de Ciencia y Tecnología de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

Constancia

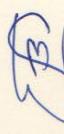
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Otorgan la Presente a:

QFB. Raúl Calleros Flores
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Por haber impartido el seminario de actualización: **"Evaluación del efecto citotóxico de extractos de Cuphea aequipetala y Verbena carolina sobre líneas celulares cancerígenas"**, celebrado el día miércoles 29 de mayo de 2019, dentro del Ciclo de Seminarios del trimestre 19-Invierno de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.


Dr. Martín Gómez Hernández
Coordinador


Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe Depto. Sistemas Biológicos