

LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y PLANTAS MEDICINALES N-302

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO GENÉRICO:

“Evaluación citotóxica in vitro de *Salvia keerlii* en líneas celulares”

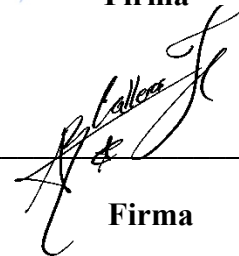
- Asesor: Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez.



Firma

- No. Económico: 17767

- Asesor externo: M.C.F. Raúl Calleros Flores



Firma

- Cédula profesional: 9953286

- Alumno: Cruz Lozano Brandon Omar



Firma

- Matricula: 2182031083

Fecha de inicio: 17 de octubre del 2022

Fecha de término: 17 de abril del 2023

Resumen.

Durante años el cáncer ha sido un tema de interés para la salud pública, ya que conforme pasa el tiempo cada vez es más común escuchar que las personas padecen de esta enfermedad, pese a los esfuerzos de los ciudadanos y médicos de todo el mundo por combatir dicha enfermedad no han tenido grandes frutos, principalmente porque los tratamientos convencionales suelen ser muy caros y con efectos secundarios, sin embargo los esfuerzos por encontrar nuevos tratamientos que ayuden a combatir el cáncer o que complementen a los tratamientos ya existentes continúan. Afortunadamente la medicina tradicional basada en productos naturales es una de las opciones más prometedoras ya que se han logrado obtener diversos medicamentos, es por eso que en este trabajo se plantea la experimentación del extracto etanólico de *Salvia keerlii* sobre líneas celulares cancerígenas, con dos diferentes ensayos que nos permiten determinar si el compuesto es citotóxico o no, según los resultados obtenidos tras la experimentación dicho extracto posee actividad antiproliferativa e interfiere con la viabilidad celular, lo cual expone un panorama donde el extracto etanólico de *Salvia keerlii*, puede ser una planta que posee metabolitos y compuestos de interés farmacológico para el tratamiento del cáncer.

Índice

1. Introducción.....	3
2. Marco teórico.....	3
2.1 ¿Qué es el cáncer?	3
2.2. ¿Cómo se desarrolla el cáncer?	4
2.3 Cáncer en el mundo.	4
2.4 Cáncer en México.....	4
2.5 Tratamientos contra el cáncer.	5
2.6 Tratamientos complementarios y medicina tradicional.	5
2.7 Género <i>Salvia</i> y sus propiedades.	6
2.8 <i>Salvia keerlii</i>	6
2.9 Cultivo en monocapa y líneas celulares.	7
2.9.1 A549 (CCL-185).....	7
2.9.2 H1975 (CRL-5908).....	8
2.10 Ensayo con cristal violeta para la determinación de la proliferación celular.	8
2.11 Ensayo con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difenil-2H-bromuro tetrazolio) (MTT) para la determinación de la viabilidad celular.....	9
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo general.	9
3.2 Objetivos específicos.	9
4. Material y métodos.....	9
4.1 Colecta.	9
4. 2 Extracción.	10
4.3 Marcha fitoquímica.....	10
4.4 Cultivo celular.....	10
4.5 Conteo celular.	10
4.6 Ensayo de Cristal violeta.....	11
4.7 Ensayo de MTT.....	12
5. Resultados y discusión.	12
5.1 Rendimiento del extracto etanólico de <i>S. keerlii</i>	12
5.2 Análisis fitoquímico de <i>S. keerlii</i>	12
5.3 Evaluación de la actividad citotóxica del extracto etanólico de <i>S. keerlii</i>	13
6. Conclusión.....	18
7. Recomendaciones.	19
8. Referencias	19

1. Introducción.

El cáncer ha sido un gran desafío en la salud pública, ya que esta enfermedad ha sido una barrera que impide el aumento de la expectativa de vida en la población. En México hay alrededor de 190,000 casos nuevos y más de 83,000 muertes a causa del cáncer al año, considerando así el cáncer como la tercera causa de mortalidad en el país (OMS, 2020).

El tratamiento contra el cáncer se basa principalmente en la cirugía, quimioterapia y radioterapia sin embargo estos tratamientos tradicionales tienen efectos secundarios como náuseas, vómito, pérdida del cabello entre otros, es por ello que se busca encontrar algunas alternativas para el tratamiento del cáncer siendo los productos naturales una oportunidad significativa.

El uso de las plantas medicinales en México se remonta a nuestros ancestros, ya que usaban distintas partes de las plantas entre ellos principalmente las hojas y las flores, aunque también se usa el tallo y la raíz de manera menos frecuente (Guzmán, 2017).

Los productos naturales como las plantas poseen una gran variedad de sustancias que podrían tener alguna actividad terapéutica, las cuales se denominan metabolitos secundarios, pueden variar según la especie, temporada y la parte que se utilizó para extraer los productos bioactivos (Naranjo et al., 2013).

La investigación y desarrollo de tratamientos contra el cáncer ha rendido frutos, ya que los productos naturales ha sido el origen de agentes cancerígenos entre los cuales se encuentran los taxanos (paclitaxel, doxitacel), alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), podofilotoxina y sus derivados (etopósido, tenipósido), antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina), campotecina y sus derivados (topotecán, irinotecán) alrededor de la mitad de los tratamientos aprobados contra el cáncer son provenientes de los productos naturales o sus derivados (Khan, 2018), (Tilaoui, 2021), (Thompson, 2023), siendo las plantas una gran alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan como base para el desarrollo de nuevos fármacos y México tiene una fuente de recursos. por ejemplo, el uso de *R. chalepensis* planta cuyo extracto metanólico presentó actividad citotóxica sobre las células HEP-G2 sin afectar a las células Vero no tumorigénicas (Elizondo-Luévano et al., 2022).

2. Marco teórico.

2.1 ¿Qué es el cáncer?

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es un término general usado para describir una variedad de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo; también tiene el término "tumor maligno" o "neoplasias malignas". Una característica concluyente del cáncer es la rápida diseminación de células anormales que se propagan más allá de su rango normal y pueden invadir partes vecinas del cuerpo o diseminarse a otros órganos, un proceso llamado

"metástasis". La propagación de metástasis es la principal causa de muerte por la enfermedad (OMS, 2022).

2.2. ¿Cómo se desarrolla el cáncer?

El cáncer es una enfermedad genética, ya que, es ocasionada por cambios en los genes que controlan la forma en que funcionan las células, especialmente la forma en que crecen y se dividen.

Los cambios genéticos que causan cáncer pueden ocurrir por diferentes motivos como:

- Errores que ocurren cuando las células se dividen.
- Daño al ADN causado por sustancias nocivas en el medio ambiente, como los químicos o los rayos UV.
- Factores heredofamiliares.

El cuerpo normalmente elimina las células con ADN dañado antes de que se vuelvan cancerígenas. Pero la capacidad del cuerpo para hacerlo disminuye a medida que envejecemos. Esta es parte de la razón por la cual existe un mayor riesgo de cáncer más adelante en la vida (NIH, 2021).

2.3 Cáncer en el mundo.

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo: en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones (OMS, 2020).

Los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos en 2020 fueron los siguientes:

- Pulmón 1,8 millones de defunciones.
- Colorrectal 916,000 defunciones.
- Hepático 830,000 defunciones.
- Gástrico 769,000 defunciones.
- Mama 685,000 defunciones.

Aunque los tipos de cáncer más frecuentes varían en función del país, el de cuello uterino es el más común en 23 países (OMS, 2020).

2.4 Cáncer en México.

El cáncer es la tercera causa de muerte en México, con 12% de todas las defunciones y las principales neoplasias causantes de muerte en nuestro país son: cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago.

En el 2021, Ciudad de México, Colima, Veracruz de Ignacio de la Llave, Sonora, Chihuahua y Morelos fueron las entidades con la tasa de defunción por tumores malignos más alta del país.

En el 2021, en México se registraron 1,122,249 defunciones, de las cuales 8 % fue por tumores malignos (90 123). La tasa de defunciones por esta causa aumentó de

forma constante, al pasar de 6.09 defunciones por cada 10 mil personas en 2010, a 7.06 en 2021 (INEGI, 2023).

2.5 Tratamientos contra el cáncer.

El tratamiento del cáncer se basa principalmente en tres pilares que se consideran ortodoxos, los cuales son: la cirugía, quimioterapia y radioterapia, aunque existen otras opciones, como la inmunoterapia, la terapia hormonal, el trasplante de médula ósea, entre otras (Garza, 2014). El tratamiento puede ser multidisciplinario entre diferentes profesionales certificados en oncología, sin embargo los tratamientos convencionales tienen efectos secundarios como: neutropenia, linfedema, pérdida de cabello, náuseas, vómitos, problemas de pensamiento y memoria, dolor por cáncer, trombosis, entre otros. A partir de esta situación se busca encontrar alternativas para el tratamiento complementario del cáncer y una de las propuestas es la medicina tradicional mediante los productos naturales, como lo son las plantas.

2.6 Tratamientos complementarios y medicina tradicional.

Los tratamientos complementarios se utilizan junto con los tratamientos médicos tradicionales para brindar apoyo adicional. No se consideran un tratamiento directo para el cáncer, pero se usan para reducir los síntomas del cáncer y los efectos secundarios del tratamiento (American Cancer Society, 2021).

La medicina tradicional es un conjunto de conocimientos y prácticas que ha existido desde los albores del hombre y es un sistema de organización comunitaria de creencias y prácticas que se transmite de generación en generación. Este sistema de salud, que se basa en la medicina tradicional, es equiparable al sistema de salud convencional, por lo que ha aumentado la demanda para legitimar debido a que la medicina tradicional es una alternativa para mejorar los tratamientos convencionales (Gallegos, 2017).

La organización mundial de la salud (OMS) muestra que el 80% de la población de los países dependen de la medicina tradicional para sus necesidades primarias de salud y alrededor del 85% de la medicina tradicional involucra el uso de extractos de plantas (Gallegos, 2017).

El interés por encontrar fármacos anticancerígenos más eficaces se ha centrado en el estudio de plantas que puedan contener moléculas o grupos de moléculas con potencial anticancerígeno. Estudios realizados en productos de plantas en México demuestran que son bioactivos contra diversas líneas celulares de cáncer (LC) (Vidal et al., 2020).

La investigación y desarrollo de tratamientos contra el cáncer ha rendido frutos, ya que se han desarrollado medicamentos que tienen actividad farmacológica en células cancerosas, algunos medicamentos como la vincristina, paclitaxel y etopósido, se derivaron de plantas, siendo las plantas una gran alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan como base para el desarrollo de nuevos medicamentos (Schlaepfer, 2010).

2.7 Género *Salvia* y sus propiedades.

Las *Salvias* son un grupo de plantas silvestres y a veces cultivadas, que presentan flores tubulares labiadas de colores muy vistosos de cáliz y corola. Las corolas pueden variar en tonos azul, morado, rosa, rojo, naranja, violeta, blanca, café-naranja, rojo-vino, entre otros. Estas coloraciones hacen que puedan considerarse como de uso ornamental y por tradiciones locales también como de uso medicinal. Este género de plantas ha llamado la atención por sus componentes bioactivos, la *Salvia* proviene de la palabra latina *salvaré*, que significa curar. México posee varias plantas de esta familia *Labiatae* (*Lamiaceae*) es uno de los géneros más numerosos y diversos de la familia, incluyendo alrededor de 900 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales del país (Mendoza, 2020).

El estudio de los metabolitos secundarios del género *Salvia* ha presentado gran interés, ya que algunas especies de este género se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades estomacales, circulatorias y cardíacas o como agente antiparasitario, sedante, antibacteriano, antipirético, diurético, antihepatotóxico así como efectos antiinflamatorios y antitumorales (Mendoza, 2020).

El género *Salvia* varía en composición dependiendo de factores genéticos, climáticos, estacionales y ambientales. Ciertos compuestos como flavonoides, triterpenos y aceites esenciales están presentes en diferentes especies de *Salvia* y estos son una fuente importante para el uso en pruebas antibacterianas, antioxidantes, de radicales libres relacionados con pruebas anticancerígenas (Hamidpour et al., 2014.)

En el 2017 Jiang y colaboradores realizaron un estudio donde se indicó que los extractos de etanólicos y acetónicos de raíces de *S. miltiorrhiza* exhiben citotoxicidad para las células HepG2, al igual que los extractos etanólicos y acetónicos de hojas y raíces de *S. officinalis*. Esos resultados proponen a *S. officinalis* como un agente con actividad terapéutica contra el cáncer, en especial sus raíces (Jiang et al., 2017).

2.8 *Salvia keerlii*.

Son plantas arbustivas, de 1-3.5 m de alto; tallos muy ramificados, entrenudos 1.5-9 cm, vilosos cuando jóvenes, con tricomas cortos 0.2 mm, largos 0.4-0.6 mm, en ocasiones solo de un tamaño, glabrescentes en la madurez; pecíolo 5-36 mm de largo, viloso, con tricomas simples, cortos, 0.2 mm y/o largos, 0.4-0.7 mm de largo; lámina foliar, discolora, deltoide a ovada, ocasionalmente orbicular, 2-8 cm de largo, 1 a 4 cm de ancho, ápice agudo a obtuso, base cordada, truncada o redondeada, margen aserrado, haz bullado-rugoso, glabrescente, con tricomas simples, 0.1-0.4 mm de largo, envés viloso, con tricomas simples, 0.1-0.4 mm de largo; inflorescencia indefinida, con 1 o 3 racimos terminales, espiciformes, brácteas ovadas, marrón claro, cáliz tubular, 5.5-6 mm de largo, 2.5-3.1 mm de ancho, con labios caudados; el superior con venas, viloso, con tricomas simples, 0.4-0.9 mm de largo; corola azul a morada, 8.5-14 mm de largo (Mendoza et al., 2017).

Los usos comunes de *S. keerlii* dentro de la población mexicana es en forma de gárgaras, se emplea para tratar cualquier inflamación del tipo bucofaríngea, como anginas o dolores de muelas, la acidez estomacal o hinchazón abdominal; las hojas manifiestan actividad antibacteriana, fungistática y virostática, además es astringente e inhibidora de la sudoración (Accame et al., 2002) además Esquivel y colaboradores indican que se usa para el tratamiento de golpes y torceduras en la medicina tradicional (Esquivel et al., 1985).

Los estudios reportados sobre *S. keerlii* son escasos sin embargo en los estudios previos que existen han demostrado que el aceite esencial de *Salvia keerlii* posee actividad insecticida (Zavala et al., 2021).

Además, ha sido reportado que los extractos metanólicos y cloroformicos de *S. keerlii* tienen actividad antiinflamatoria en modelos in vivo e in vitro; también posee efecto antinociceptivo, los autores reportan que estos extractos presentan ácido oleico, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido retinoico a los cuales se les atribuyen propiedades con actividad anticancerígena (Serrano-Vega et al., 2020).

Así mismo Serrano-Vega y colaboradores realizaron un ensayo con macrófagos murinos y determinaron que el extracto de *S. keerlii* tuvo una CI_{50} de 147.85 $\mu\text{g/mL}$ en el ensayo de MTT.

2.9 Cultivo en monocapa y líneas celulares.

Los cultivos en monocapa son una forma de crecimiento celular in vitro en cultivos primarios o líneas celulares dependientes del anclaje. En general, las células que se desarrollan de esta manera son genéticamente estables y tienen diploidía normal; este tipo de cultivos son utilizados para diagnosticar enfermedades, probar medicamentos nuevos.

Los ensayos en monocapa celular deben poseer características muy particulares, una de ellas y la más importante, es el número de células presentes en dicha monocapa lo cual recibe el nombre de (confluencia) la cual debe ser elevada, para que exista contacto entre ellas, cuando logramos lo anterior, las células dejen de crecer (Montalván et al., 2009).

2.9.1 A549 (CCL-185).

A549 es una célula epitelial que se aisló del pulmón de un hombre blanco de 58 años con carcinoma. La línea celular se puede utilizar en pruebas y calibración en laboratorios acreditados por ISO 17025, para desafiar el rendimiento del ensayo, validar o comparar métodos de prueba y establecer sensibilidad, linealidad y especificidad durante la validación o implementación del ensayo. Las células A549 también se utilizan ampliamente en la investigación del cáncer.

Tabla 1. Características generales de la línea celular A549 (CCL-185) de ATCC.

Categoría del producto	Células humanas
Tipo producto	Material de referencia certificado
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , Humano
Tipo de célula	Célula epitelial

Morfología	Epitelial
Tejido	Pulmón
Enfermedad	Carcinoma
Aplicaciones	Desarrollo de ensayos
Formato de producto	Congelado
Condiciones de almacenaje	Fase de vapor nitrógeno líquido

2.9.2 H1975 (CRL-5908).

NCI-H1975 [H-1975, H1975] es una línea celular que exhibe morfología epitelial que se aisló en 1988 de los pulmones de una mujer no fumadora con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estas células se usan en inmuno-oncología e investigación de cáncer de pulmón.

Tabla 2. Características generales de la línea celular H1975 (CRL-5908) de ATCC.

Categoría del producto	Células humanas
Tipo producto	Material de referencia certificado
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , Humano
Tipo de célula	Célula epitelial
Morfología	Epitelial
Tejido	Pulmón
Enfermedad	Adenocarcinoma; Cáncer de pulmón de células no pequeñas
Aplicaciones	Cultivo celular 3D Investigación sobre el cáncer
Formato de producto	Congelado
Condiciones de almacenaje	Fase de vapor nitrógeno líquido

2.10 Ensayo con cristal violeta para la determinación de la proliferación celular.

Las células adherentes se desprenden del sustrato de cultivo, esta característica se puede utilizar para la evaluación indirecta de la muerte celular y para determinar las diferencias en la tasa de proliferación tras la estimulación con agentes citotóxicos. Uno de los métodos más utilizados rápido y confiable para detectar la adherencia de éstas, es el ensayo con cristal violeta ya que el colorante de cristal violeta el cual se une a las proteínas de las células adheridas tiñéndose. Estas pierden su adherencia durante la muerte lo que reduce la cantidad de tinción, la prueba es insensible a los cambios en la actividad metabólica.

2.11 Ensayo con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difenil-2H-bromuro tetrazolio (MTT) para la determinación de la viabilidad celular.

El objetivo principal del ensayo MTT es medir las células metabólicamente funcionales, a diferencia de la técnica con cristal violeta.

Este ensayo se basa en la actividad mitocondrial ya que refleja la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán los cuales se pueden solubilizar para una medición homogénea y de este modo a partir del incremento o decremento del número de células viables puede detectarse midiendo la concentración de formazán a partir de la densidad óptica (DO) utilizando un lector de placas a 575 nm.

Para la determinación de la sensibilidad a los compuestos o fármacos los valores de DO con células expuestas a tratamiento se comparan contra la DO de las células no expuestas.

El ensayo de MTT es un método eficaz y confiable para la medición de la sensibilidad a compuestos o fármacos, el decremento en el número de células demuestra la inhibición de la viabilidad celular y, por lo general, la sensibilidad al tratamiento se especifica como la concentración del fármaco que se requiere para lograr una inhibición del crecimiento del 50 % (CI₅₀) en comparación con el crecimiento del control no tratado (Van et al., 2011).

Es por ello que en el presente trabajo se expuso el extracto etanólico de *Salvia keerli* a las líneas celulares A549 y H1975 las cuales al ser células con histología de epitelio pulmonar permiten analizar mediante ensayos como son cristal violeta y MTT, si el extracto posee actividad antiproliferativa o interfiere con la viabilidad de las líneas celulares.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general.

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Salvia keerlii* en líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y H-1975.

3.2 Objetivos específicos.

- Obtener el extracto etanólico por maceración de *Salvia keerlii*.
- Realizar la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Salvia keerlii*.
- Evaluar la actividad citotóxica en las líneas celulares A549 y H1975.

4. Material y métodos

4.1 Colecta.

S. keerlii se colectó en la localidad de “Guadalcázar”, que está situado en el estado de San Luis Potosí y se autenticó por el taxónomo José García Pérez con el folio

SLPM43012, el espécimen fue depositado en el herbario Isidro Fabela de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

4. 2 Extracción.

El material vegetal se secó a la sombra y se trituraron las partes aéreas (hojas, flores, tallo), así como las raíces de la planta, posteriormente se pesaron 250 g de planta y se le añadieron 3 L de etanol al 96% (Sigma-Aldrich) los cuales se dejaron en maceración simple durante una semana, transcurrido el tiempo, se filtró al vacío, a los residuos sólidos de la planta se les agregaron nuevamente tres litros de etanol al 96%, para una segunda maceración, y el líquido obtenido de las maceraciones se llevó a un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente, por último se utilizó baño maría para llevar a sequedad.

4.3 Marcha fitoquímica.

Para las pruebas fitoquímicas se utilizaron los ensayos de Mayer, Wagner, Hager, Bertrand, Dragendorff, NaOH al 10%, Cloruro férrico, Salkowski, Liebermann-Burchard, Shinoda, Prueba de NaOH, Rosenthaler, Baljet, Fehling y Benedict utilizando las metodologías descritas por (Barba, 1997), (Dominguez, 1988) y (Evans, 1991). Los ensayos fueron para la identificación de alcaloides, cumarinas, fenoles, taninos, esteroides, triterpenos, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos y azúcares reductores.

4.4 Cultivo celular.

Las líneas celulares A549 y H1975, fueron obtenidas de American Tipe Culture Collection (ATCC) y preservadas en congelación a -70 °C en un ultracongelador marca Thermo Scientific.

Ambas líneas celulares se descongelaron y colocaron en cajas de cultivo de 25 cm² añadiendo 5 mL de medio F-12K (30-2004) y RPMI-1640 (30-2001) de ATCC respectivamente, ambos suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (30-2021) ATCC y 0.02 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina) ATCC, se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera humidificada y 5% de CO₂, se incubaron hasta tener una confluencia del 90-100%.

Para despegar las células, estas se lavaron con 5 mL de buffer de fosfatos salino (PBS) 1X el lavado se hizo tres veces para eliminar el medio y SFB restante en la aja de cultivo, posteriormente se aplicaron 5 mL de verseno, el cual se retiró transcurridos 30 segundos y se añadieron 200 µL de tripsina (1:10), hasta que las células se despegaron de la base de la caja de cultivo, el volumen total obtenido se trasvasó a tubos cónicos 15 mL y se centrifugó durante cinco minutos a 800 rpm.

4.5 Conteo celular.

A continuación, se decantó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 5 mL de medio suplementado, se tomaron 10µL de esa suspensión y se colocaron en la cámara de Neubauer para contar el número de células de los cuatro cuadrantes de las esquinas como se muestra en la figura 1.

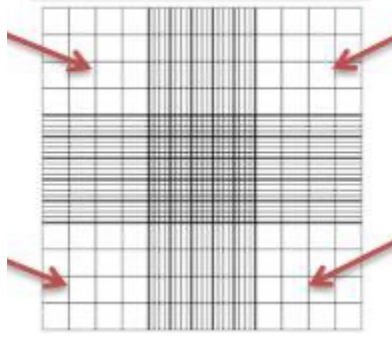


Figura 1. Cámara de Neubauer, el conteo se realizó en los cuadrantes señalados por las flechas de color rojo.

El número total de células por mL se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\text{Promedio de células contadas} = \frac{\text{Suma del número de células contadas de los cuatro cuadrates}}{4}$$

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

4.6 Ensayo de Cristal violeta.

En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron 5×10^3 (80 a 90 % de confluencia) células a un volumen final de 100 μL en cada pozo, se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas durante 24 horas para su adherencia y crecimiento. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó el extracto de *S. Keerlii* previamente diluido en medio suplementado, a las concentraciones deseadas (2000, 1000 y 500 μg totales), para el control positivo se utilizó cisplatino diluido en medio suplementado, a una concentración de 500 mg/mL , y a un volumen final de 100 μL por pozo, al control negativo solo se le añadió medio suplementado, estos ensayos se realizaron a tres tiempos (24, 48 y 72 horas) con una $n=3$ con 3 repeticiones.

Transcurrida la exposición a los tratamientos, las placas se lavaron con PBS, posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 5%, durante 24 horas, al término de ese tiempo, se retiró el fijador, y se hicieron 3 lavados con PBS; finalmente, se añadió el colorante cristal violeta, se mantuvo e exposición por 10 minutos para teñir las células, al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada, por último, el colorante se solubilizo en 100 μL ácido acético al 99.7%, durante 15 minutos en agitación constante y finalmente se midieron las absorbancias de los pozos a 575 nanómetros en un lector de placas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer 1510 (López, 2019).

4.7 Ensayo de MTT.

Se siguió la misma metodología anteriormente descrita para el ensayo de cristal violeta, transcurrido el tiempo a exposición de los compuestos, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se añadió el MTT.

Para esto se pesaron 5 mg de MTT y se diluyeron en 10 mL de medio, para posteriormente ser colocados 100µL de esta disolución a cada pozo de la placa, la placa se incubó durante 4 horas en las condiciones anteriormente mencionadas, al término de ese tiempo, se aspiró el medio de todos los pozos, y el colorante se solubilizó con 100µL de DMSO, la placa se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, la absorbancia se midió a 575 nanómetros en un lector de placas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer 1510 (Hernández, 2013).

5. Resultados y discusión.

5.1 Rendimiento del extracto etanólico de *S. keerlii*.

De 250 g de *S. keerlii* se obtuvieron 29.45 g de extracto, los cuales equivalen al 11.78 %.

5.2 Análisis fitoquímico de *S. keerlii*.

Los resultados del análisis fitoquímico de *S. keerlii* se muestran en la tabla 3. En este trabajo se evaluó si existía la presencia de alcaloides, cumarinas, fenoles, taninos, esteroides, triterpenos, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos y azúcares reductores.

Se determinó que *S. keerlii* resultó negativa para cinco de las quince pruebas realizadas, sin embargo se destaca la presencia principalmente de glicósidos cardiotónicos y azúcares reductores, lo cual confirma los estudios previamente realizados, también se encontró que *S. keerlii* contiene cumarinas, flavonoides, fenoles y taninos, es importante mencionar que desde hace tiempo se ha reportado que la *Salvia* es un género en el cual se han aislado alrededor de 50 flavonoides (Paje et al., 2022), (Askari et al., 2021), además se han descrito la existencia de compuestos fenólicos en distintas especies del género *Salvia* (Paje et al., 2022). Se encontró que *S. keerlii* contiene en menor cantidad esteroides, triterpenos y saponinas, siendo los triterpenos confirmados por Serrano-Vega y colaboradores con la presencia de ácido ursólico (Serrano-Vega et al., 2020) y en el caso de las saponinas Hafez y colaboradores reportaron la presencia de estos metabolitos (Hafez et al., 2021).

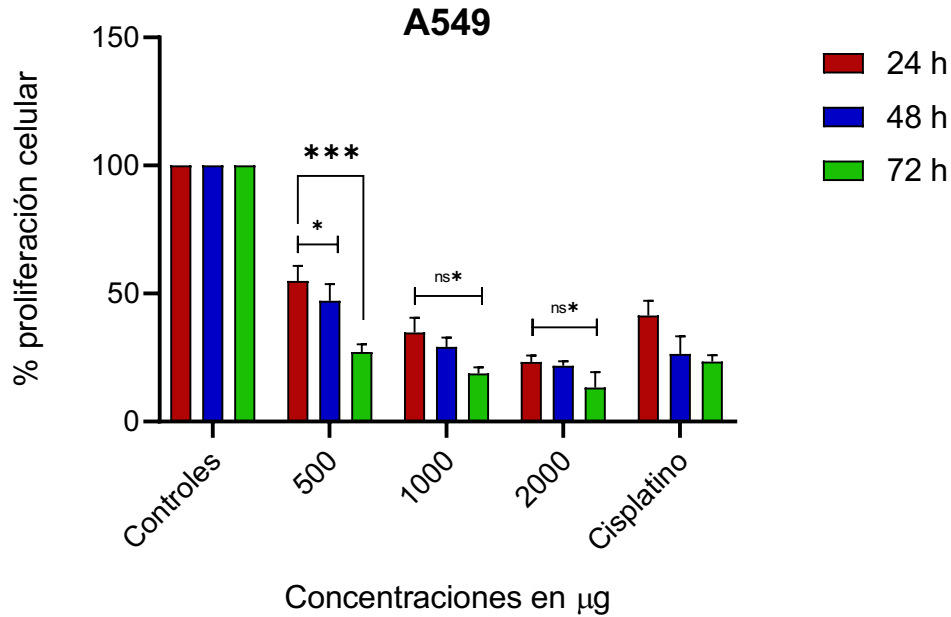
Tabla 3. Resultados de las pruebas del análisis fitoquímico, la interpretación se da conforme las siguientes indicaciones: Abundante (+++), moderada (++), escasa (+), negativa (-).

Análisis fitoquímico de *s. Keerlii*

Prueba realizada	Resultado	Determinación de:
Mayer	-	Alcaloides
Wagner	-	Alcaloides
Hager	-	Alcaloides
Bertrand	-	Alcaloides
Dragendorff	-	Alcaloides
NaOH al 10%	++	Cumarinas
Cloruro férrico	++	Fenoles y taninos
Salkowski	+	Esteroles y triterpenos
Lieberman-Burchard	+	Esteroles y triterpenos
Shinoda	++	Flavonoides
Prueba de NaOH	++	Flavonoides
Rosenthaler	+	Saponinas
Baljet	+++	Glicósidos cardiotónicos
Fehling	+++	Azúcares reductores
Benedict	+++	Azúcares reductores

5.3 Evaluación de la actividad citotóxica del extracto etanólico de *S. keerlii*.

El extracto etanólico de *S. keerlii* fue soluble en medio de cultivo gracias a que es un extracto de tipo polar, por lo cual no fueron necesarias pruebas con vehículo, mientras que, el uso de cis platino como control positivo fue debido a que es considerado un agente de fácil adquisición, bajo costo y uno de los quimioterapéuticos más efectivos (Price et al., 2006).

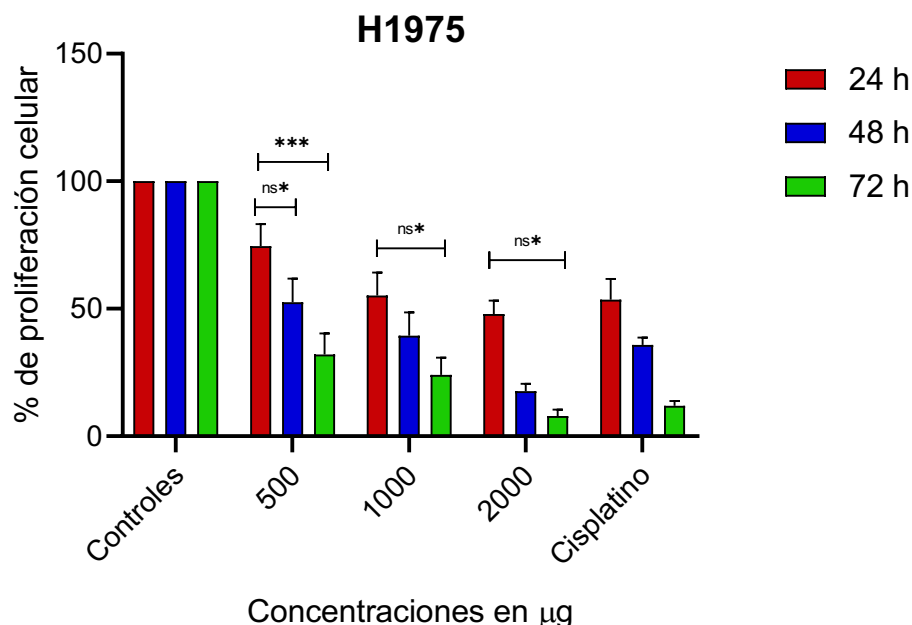


Gráfica 1. Efecto del extracto etan3lico de *S. keerlii* sobre la proliferaci3n de la línea celular A549 mediante el ensayo de cristal violeta. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0010$ con respecto a los diferentes tiempos. Los valores corresponden a la medida obtenida de tres repeticiones ($n=3$) \pm desviaci3n est3ndar.

En la gr3fica 1 se presenta el efecto del extracto etan3lico de *S. keerlii* sobre la proliferaci3n celular de la línea A549. Se observa que el extracto tiene actividad sobre la proliferaci3n celular desde la concentraci3n de m3s baja y al menor tiempo de exposici3n, con un porcentaje de inhibici3n de la proliferaci3n del 45.07%, se observa que tras 48 horas a esa misma concentraci3n la inhibici3n ya es mayor al 50% con un 52.87% y a medida que pasa el tiempo se incrementa la actividad, pues a la misma concentraci3n a 72 horas el porcentaje de inhibici3n es de 72.77%, al aumentar la concentraci3n a 1000 µg durante 24 horas, la actividad es a3n mayor, ya que el porcentaje de inhibici3n de la proliferaci3n es de 65.16%, a 48 horas es del 70.86% y a las 72 horas es del 81.19%, por 3ltimo a la concentraci3n de 2000 µg los porcentajes fueron de 76.66%, 78.16% y 86.72% a 24, 48 y 72 horas respectivamente, se observa que conforme la concentraci3n y el tiempo aumentaban el efecto es mayor, lo que podr3a reflejar que la actividad del extracto es dependiente de la concentraci3n y el tiempo, sin embargo se observa una mayor actividad que el control positivo a partir de la concentraci3n de 2000 µg/mL, pues se observa que el extracto presenta un porcentaje de inhibici3n de la proliferaci3n de 76.66% a partir del primer tiempo que es 24 h, respecto a el 58.56% del cisplatino.

Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que el extracto etan3lico de *S. keerlii* posee actividad sobre la inhibici3n de la proliferaci3n celular de la línea A549 y esta actividad podr3a estar relacionada con algunos de los metabolitos que se identificaron en el extracto y que ya han sido reportados con actividad citot3xica como lo son los triterpenos y los flavonoides (Intergun et al., 2022), es importante

mencionar que los resultados se obtuvieron con el ensayo de cristal violeta (Kuong et al., 1989), el cual se une a las proteínas y ADN de las células adheridas, siendo este un ensayo para la evaluación indirecta de la muerte celular y para determinar las diferencias en la tasa de proliferación tras la estimulación o tratamiento con agentes citotóxicos (Aslantürk, 2018)

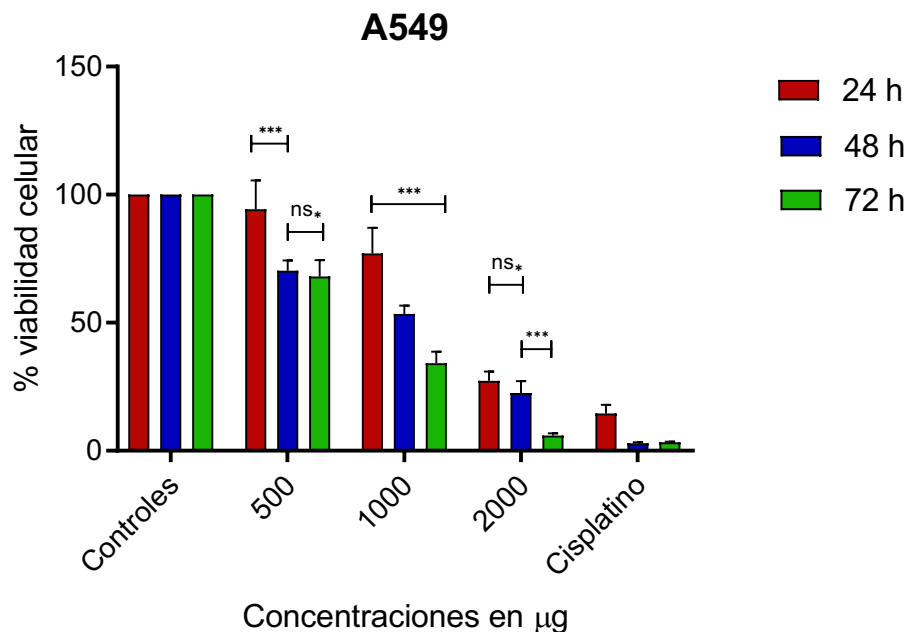


Gráfica 2. Efecto del extracto etanólico de *S. keerlii* sobre la proliferación de la línea celular H1975 mediante el ensayo de cristal violeta. *** $p < 0.0010$ con respecto a los diferentes tiempos. Los valores corresponden a la medida obtenida de tres repeticiones ($n=3$) \pm desviación estándar.

El efecto que tuvo el extracto etanólico de *S. keerlii*, sobre la proliferación celular en la línea H1975 se representa en la gráfica 2, donde se observa que el extracto presenta actividad con diferencia significativa de los controles a partir de la concentración más baja a 24 horas con un porcentaje del 25.44% de inhibición de la proliferación, además a esa misma concentración pero a 48 horas el porcentaje de inhibición es cercano al 50% con un 47.41% y tras 72 horas con el tratamiento se tiene un porcentaje del 67.9%, a una concentración de 1000 µg a 24 horas existe un 44.83% de la inhibición de la proliferación, a partir de las 48 horas a la misma concentración el efecto ya es mayor al 50% con un 60.59% y un 75.97% tras 72 horas el cual es mejor que el control positivo a 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico de *S. keerlii* tiene actividad sobre la inhibición de la proliferación celular, aunque también demuestra una clara dependencia de la actividad respecto a la concentración y el tiempo de exposición con una mayor inhibición a concentraciones más altas y tiempos prolongados de exposición, estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado la relación entre la concentración y el tiempo de exposición de

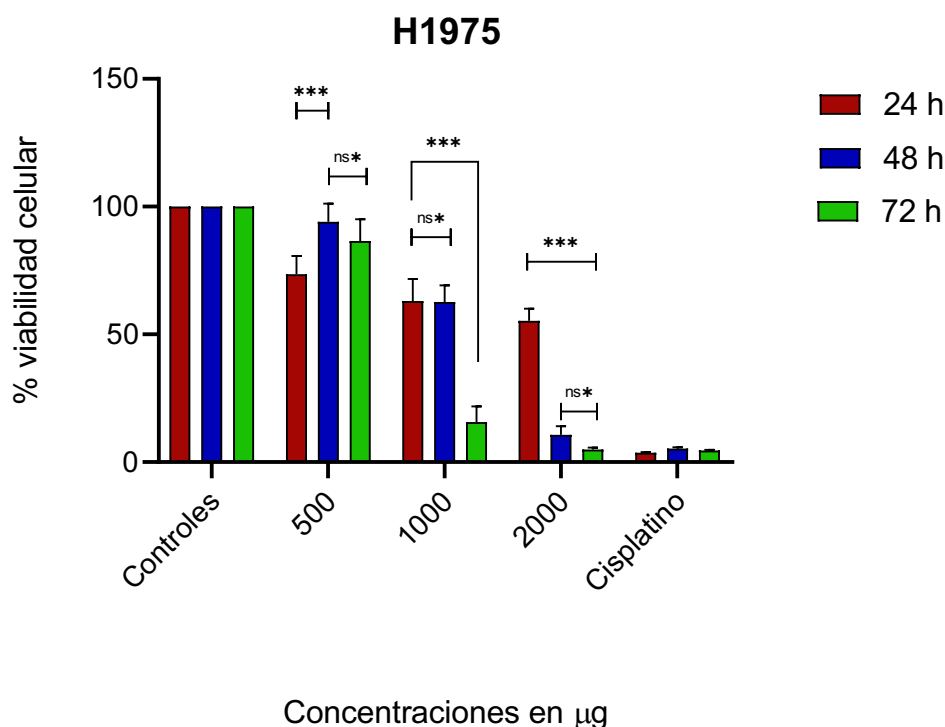
compuestos de origen natural y su actividad antiproliferativa en líneas celulares (Mousavi et al., 2018), (Umar et al., 2019), (Gomathi et al., 2020), estos resultados respaldan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender los mecanismos subyacentes de acción.



Gráfica 3. Efecto del extracto etanólico de *S. keerlii* sobre la viabilidad de la línea celular A549 mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.0001$ con respecto a los diferentes tiempos. Los valores corresponden a la medida obtenida de tres repeticiones ($n=3$) \pm desviación estándar.

La actividad que tuvo el extracto etanólico de *S. keerlii* en la viabilidad celular de la línea A549 se presenta en la gráfica 3, donde se observa que tras 24 h no existe un efecto evidente, sin embargo transcurridas 48 horas de exposición, a la misma concentración, la actividad incrementa un 29.71% y no muestra diferencia significativa a 72 horas con 31.1 %, también se observa que a 1000 µg y 24 horas existe un efecto del 22.95%, a 48 horas se alcanza cerca del 50% de inhibición de la viabilidad con 46.56%, a esa misma concentración pero a 72 horas ya existe actividad del 65.78% y por último a concentración de 2000 µg hay actividad sobre la viabilidad del 72.75%, 77.46% y 94.01% a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Los resultados demuestran que el extracto etanólico de *S. keerlii* interfiere con la viabilidad celular de la línea A549, observando que el efecto es dependiente de la concentración, pero no del tiempo, observando que la actividad mayor se encontró a la concentración más alta (Umar et al., 2019), (Gomathi et al., 2020).



Gráfica 3. Efecto del extracto etanólico de *S. keerlii* sobre la viabilidad de la línea celular H1975 mediante el ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ con respecto a los diferentes tiempos. Los valores corresponden a la medida obtenida de tres repeticiones ($n=3$) \pm desviación estándar.

El extracto etanólico de *S. keerlii* presenta actividad sobre la viabilidad celular de la línea H1975 esta se ve reflejada en la gráfica 4, en la cual podemos observar que a 500 µg a 24 horas se observa un porcentaje de inhibición de la proliferación celular del 26.41% con respecto a los controles negativos, sin embargo a esa misma concentración pero a 48 y 72 horas pareciera que el efecto se perdió e inclusive se observa un efecto contrario al esperado con un 5.93% y 13.49% respectivamente, sin embargo a 1000 µg se observa un incremento sobre la inhibición de la viabilidad celular a las 24 y 48 horas con un porcentaje del 36.95% y 37.35 respectivamente, pero el mayor efecto a esta concentración se ve reflejado a las 72 horas pues supera incluso el 50% de la inhibición de la viabilidad con un 84.38%, también se observa que a 2000 µg hay una inhibición de la viabilidad celular con 44.74%, 89.30% y 90.05 % a 24, 48 y 72 horas.

Es importante señalar que de las cuatro graficas presentadas en este trabajo, el efecto del extracto presenta una actividad en su mayoría, dependiente de la concentración y el tiempo, dicha actividad es mayor en los ensayos relacionados con la proliferación celular, lo cual marca la pauta para un posible mecanismo de acción, aunque hablar de ello sería en extremo apresurado, ya que hablamos de un

extracto crudo, el cual posee una mezcla de metabolitos secundarios, por lo cual dicha actividad podría atribuirse a uno o más de estos compuestos.

Si bien la actividad observada en viabilidad celular es menor, muestra una tendencia a ser mayor conforme aumenta la concentración, (como se puede observar en la tabla 4) en ambas líneas celulares desde la concentración intermedia, es importante recalcar que hablamos de un compuesto que no se encuentra puro, por lo cual se esperaría que al separar el extracto y tratar de purificar las fracciones que se obtengan el efecto incremente, así mismo se sabe que el cisplatino provoca daño mitocondrial, disminución en la actividad ATPasa y alteración en los mecanismos de transporte celular (Rodríguez, 2013) y el ensayo con MTT se basa en la actividad mitocondrial ya que refleja la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán (Van et al., 2011), (Ghasemi et al., 2021).

Tabla 4. Resultados de las CI_{50} del extracto etanólico de *S. keerlii*

Línea celular	Tiempo			Ensayo
	24 horas	48 horas	72 horas	
A549	429.2 ± 2.2 µg	367.1 ± 2.3 µg	199.3 ± 1.7 µg	Cristal violeta
	1284 ± 3.8 µg	931.3 ± 1.5 µg	689.9 ± 2.3 µg	MTT
H1975	508.9 ± 2.8 µg	437.2 ± 1.6 µg	249.1 ± 1.3 µg	Cristal violeta
	2445 ± 0.5 µg	1097 ± 4.2 µg	692.9 ± 5.5 µg	MTT

6. Conclusión.

Se logró la obtención del extracto etanólico de *S. Keerli*, el cual fue sometido a un análisis fitoquímico donde se encontró que dicho extracto tiene presencia de metabolitos como lo son azúcares reductores y glicósidos cardiotónicos en mayor proporción, aunque moderadamente también presentó cumarinas, flavonoides, fenoles, taninos y con menor prevalencia metabolitos como esteroides, triterpenos y saponinas.

Así mismo se evaluó la actividad citotóxica (proliferación y viabilidad) del extracto y se concluyó que posee actividad antiproliferativa en su mayoría inhibiendo la proliferación, dichos ensayos, subrayan la necesidad de realizar investigaciones adicionales para tratar comprender los mecanismos de acción y en su caso tratar de aislar de alguna molécula de interés farmacéutico para el tratamiento del cáncer.

7. Recomendaciones.

En primera instancia, el interés por continuar el trabajo debe basarse en la separación del extracto con actividad, esto mediante cromatografía en columna abierta y, posteriormente continuar con separaciones más especializadas como HPLC, aunado a ensayos biodirigidos.

La importancia de llevar a cabo la identificación y caracterización de dichos compuestos es crucial, usando técnicas espectroscópicas y espectrométricas como son RMN, RM, IR, UV-Vis,

Además de los estudios in vitro, es importante realizar investigaciones en modelos animales para evaluar la eficacia y la seguridad del extracto de *S. keerlii* en un entorno más cercano a las condiciones clínicas. Estos estudios proporcionarán información valiosa sobre la biodisponibilidad, la farmacocinética y los efectos sistémicos del extracto y sus posibles compuestos aislados.

8. Referencias

- Accame, M. E. C., Hernández-Agero, T. O., & del Fresno, A. M. V. (2002). *Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica*. Farmacia profesional, 16(7), 60-64.
- American Cancer Society. (2021). *Métodos de la medicina complementaria e integral ¿Qué son los métodos de la medicina complementaria e integral?* American Cancer Society. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/242.96.pdf>
- Askari, S. F., et al. (2021). *Iranian Salvia species: A phytochemical and pharmacological update*. Phytochemistry 183: 112619.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). *Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular in vitro: principios, ventajas y desventajas*. Genotoxicidad: un riesgo predecible para nuestro mundo real , 2 , 64-80.
- Barba, J. (1997). *Introducción al análisis de los productos naturales: laboratorio de fitoquímica*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Domínguez, X. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa.
- Elizondo-Luévano, JH, Gomez-Flores, R., Verde-Star, MJ, Tamez-Guerra, P., Romo-Sáenz, CI, Chávez-Montes, A., ... & Quintanilla-Licea, R. (2022). Actividad Citotóxica In Vitro de

Extractos Metanólicos de Plantas Medicinales Seleccionadas Tradicionalmente Usadas en México contra el Carcinoma Hepatocelular Humano. *Plantas*, 11 (21), 2862.

Esquivel, B., Mendez, A., Ortega, A., Soriano-Garcia, M., Toscano, A., & Rodriguez-Hahn, L. (1985). *Neo-clerodane-type diterpenoids from Salvia keerlii*. *Phytochemistry*, 24(8), 1769-1772.

Evans, W., & Trease, G. (1971). *Farmacognosia* (J. Cabo Torres, Trans.). Interamericana.

Gallegos, M. (2017). *Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo, Ecuador*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880037/las-plantas-medicinales-usos-y-efectos-en-el-estado-de-salud-de_iHP5e7s.pdf

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.

Garza, J., & Juárez, P. (2014). *El cáncer*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Gomathi, AC, Rajarathinam, SX, Sadiq, AM y Rajeshkumar, S. (2020). *Actividad anticancerígena de nanopartículas de plata sintetizadas utilizando extracto acuoso de cáscara de fruta de Tamarindus indica en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7*. *Revista de ciencia y tecnología de suministro de fármacos*, 55, 101376.

Guzmán, H., Díaz, R. S., & González, H. M. M. (2017). *Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral*. INIFAP.

Hafez Ghoran, S., Firuzi, O., Asadollahi, M., Stuppner, H., Alilou, M., & Jassbi, A. R. (2021). *Dammarane-type triterpenoid saponins from Salvia russellii Benth*. *Phytochemistry*, 184, 112653.

- Hernández, V. (2013). *Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del Dietilditiocarbamato Sódico (DDTC) en líneas celulares de cáncer cérvicouterino*. Universidad Nacional Autónoma De México. https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_hernandez_cruz.pdf
- Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S. y Shahlari, M. (2014). *Propiedades químicas, farmacológicas y medicinales de la salvia (Salvia) para prevenir y curar enfermedades como la obesidad, la diabetes, la depresión, la demencia, el lupus, el autismo, las cardiopatías y el cáncer*. *Revista de medicina tradicional y complementaria*, 4 (2), 82-88.
- INEGI. (2023). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
- Irtegun Kandemir, S., Fidan, HS, Yener, I., Mete, N., Ertas, A., Topcu, G. y Kolak, U. (2022). *Investigación de los efectos citotóxicos y apoptóticos de 63 compuestos obtenidos de especies de Salvia: Agentes anticancerígenos prometedores*. *Revista de bioquímica alimentaria*, 46 (9), e14226.
- Jiang, Y., Zhang, L. y Rupasinghe, HV (2017). *Efectos antiproliferativos de extractos de Salvia officinalis L. y Salvia miltiorrhiza Bunge en células de carcinoma hepatocelular*. *Biomedicina y Farmacoterapia*, 85, 57-67.
- Khan, T., & Gurav, P. (2018). *PhytoNanotechnology: enhancing delivery of plant based anti-cancer drugs*. *Frontiers in pharmacology*, 8, 1002.
- Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989, Octubre). *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. *Elsevier*, 182, 16-19. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90710-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90710-0)

- López, E. (2019). *Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología*. https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/5143/lopez_aem.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Mendoza, A. (2020). *Actividad Antimicrobiana del extracto acetónico de Salvia mexicana*. https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/DGB_UNAM/TES01000817838/3/0817838.pdf
- Mendoza, E. I. O., García, B. Y. B., & Cabrera, S. I. L. (2017). *Revisión taxonómica de Salvia subgénero Calosphace sección Scorodoniae (Lamiaceae), endémica de México*. Acta botánica Mexicana, (118), 07-40.
- Montalván, C. A. T., García, A. O., González, I. D., Mondaca, S. E., & Acosta, A. M. (2009). *Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica*. Revista mexicana de Ciencias farmacéuticas, 40(4), 35-46.
- Mousavi, B., Tafvizi, F. y Zaker Bostanabad, S. (2018). *Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando extracto de hoja de Artemisia turcomanica y el estudio del efecto anticancerígeno y la inducción de apoptosis en la línea celular de cáncer gástrico (AGS)*. Células artificiales, nanomedicina y biotecnología, 46 (sup1), 499-510.
- Naranjo, F. L., Almazo, E. M., García, S. N. J., Martínez, M. A., & Marmolejo, J. M. (2013). *Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la Lavandula officinalis y su potencial uso como agente sedante*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 44(1), 60-65.
- NIH (2021, 11 octubre). *What is cancer?* National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#:~:text=Cancer%20is%20a%20disease%20caused,are%20also%20called%20genetic%20changes>.
- OMS. (2022). *Cáncer*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/cancer>

- Paje, L. A., Choi, J., Lee, H. D., Kim, J., Yu, A. R., Bae, M. J., Geraldino, P. J. L., & Lee, S. (2022). *Phenolic acids and flavonoids from Salvia plebeia and HPLC-UV profiling of four Salvia species*. Heliyon, 8(3), e09046.
- Price, PM, Yu, F., Kaldis, P., Aleem, E., Nowak, G., Safirstein, RL y Megyesi, J. (2006). *Dependencia de la muerte celular inducida por cisplatino in vitro e in vivo en la quinasa dependiente de ciclina 2*. Journal of the American Society of Nephrology , 17 (9), 2434-2442.
- Rodríguez, R. (2013). *Vademécum académico de medicamentos*. UNAM.
- Schlaepfer, L., & Mendoza, J. (2010). *Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41(4), 18-27. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57916060003.pdf>
- Serrano-Vega, R., Pérez-González, C., Alonso-Castro, Á. J., Zapata-Morales, JR, & Pérez-Gutiérrez, S. (2020). *Actividades antiinflamatorias y antinociceptivas de Salvia keerlii*. Revista Farmacognosia, 16 (67).
- Thompson, H. J., & Lutsiv, T. (2023). *Natural Products in Precision Oncology: Plant-Based Small Molecule Inhibitors of Protein Kinases for Cancer Chemoprevention*. Nutrients, 15(5), 1192.
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., & Ziad, A. (2021). *Update and new insights on future cancer drug candidates from plant-based alkaloids*. Frontiers in Pharmacology, 3621.
- Umar, H., Kavaz, D. y Rizaner, N. (2019). *Biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc utilizando corteza de tallo de Albizia lebbeck y evaluación de sus actividades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas en líneas celulares de cáncer de mama humano*. Revista internacional de nanomedicina, 14 , 87.
- Van Meerloo, J., Kaspers, GJ y Cloos, J. (2011). *Ensayos de sensibilidad celular: el ensayo MTT*. Cultivo de células cancerosas: métodos y protocolos, 237-245.

Vidal, M., Torres, H., Velázquez, C., Rascón, L., & Robles, R. (2020). *Actividad antioxidante y antiproliferativa de seis plantas medicinales del noroeste de México*. SciELO, 23(3).

<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1169>

Zavala-Gómez, CE, Zamora-Avella, D., Rodríguez-Chávez, JL, Zavala-Sánchez, M. Á., Campos-Guillén, J., Bah, MM, ... & Ramos-López, MA (2021)). *Bioactividad de 1,8-Cineol y Aceite Esencial de Salvia keerlii (Lamiaceae) Contra Spodoptera frugiperda*. Entomólogo del suroeste, 46 (2), 385-396.