



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Departamento de Sistemas Biológicos.  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

**Proyecto Genérico del Departamento de Sistemas Biológicos:**

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

**Etapas:** Extracción de principios activos o sustancias auxiliares a partir de productos naturales.

**TITULO DEL PROYECTO**

“Actividad antiinflamatoria y citotóxica de *Ranunculus petiolaris*”

**Nombre del alumno:**

Tania Mejía Vizuet

**Matricula:**

2182028442

**Asesor interno:**

Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

**Asesor externo:**

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez.

## ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Marco teórico.....	2
2.1. Inflamación.....	2
2.1.2. Clasificación de la inflamación .....	2
2.1.3. Tratamientos antiinflamatorios .....	3
2.1.4. Efectos secundarios/adversos .....	3
2.1.5. Tratamiento alternativo contra la inflamación .....	4
2.2. Cáncer .....	4
2.2.1. Tratamientos contra el cáncer .....	5
2.3. Tratamiento alternativo contra el cáncer .....	5
2.4. Generalidades de <i>Ranunculus petiolaris</i> .....	6
2.4.1. Clasificación Taxonómica .....	6
Justificación .....	7
Objetivos .....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos .....	8
Capítulo 3. Metodología.....	9
3.1. Colecta de la planta <i>Ranunculus petiolaris</i> .....	9
3.2. Preparación de los extractos de diclorometano y metanol .....	9
3.3. Separación de las fracciones del extracto con mayor actividad .....	9
3.4. Evaluación biológica .....	9
3.4.1. Modelo <i>in vivo</i> .....	9
3.4.1.1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular en ratón inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA).....	9
3.4.1.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de las fracciones del extracto con mayor actividad biológica.....	10
3.5. Obtención de sólidos a partir de las fracciones .....	10
3.6. Modelos <i>in vitro</i> .....	10
3.6.1. Cultivo celular de macrófagos.....	10
3.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS .....	11

3.6.2.1 Determinación de Viabilidad de macrófagos tratados con BCD por el ensayo de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) .....	11
3.6.2.2. Determinación de óxido nítrico (NO) .....	11
3.6.3. Evaluación de la actividad citotóxica de BCD sobre líneas celulares de cáncer .....	12
3.6.3.1. Cultivo celular de MCF-7, HCT-15 y HeLa.....	12
3.6.3.2. Evaluación de citotoxicidad por ensayo de MTT.....	12
3.7. Actividad antioxidante .....	13
3.7.1. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).....	13
3.7.1.2. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	13
3.8. Análisis estadístico .....	13
Capítulo 4. Resultados y discusión .....	14
4.1. Preparación de los extractos de diclorometano y metanol .....	14
4.2. Modelos <i>in vivo</i> .....	14
4.2.1. Evaluación antiinflamatoria <i>in vivo</i> de los extractos de diclorometano y metanol .....	14
4.2.1.2. Separación y evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de las fracciones del extracto con mayor actividad biológica.....	15
4.3. Aislamiento y caracterización de sólidos a partir de las fracciones .....	16
4.4. Análisis de los espectros de RMN .....	17
4.5. Modelos <i>in vitro</i> .....	18
4.5.1. Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS .....	18
4.5.1.1. Determinación de Viabilidad de macrófagos tratados con el sólido aislado (BCD) por el ensayo de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) .....	18
4.5.1.2. Determinación de Óxido nítrico .....	19
4.6. Actividad de BCD sobre cáncer en modelo <i>in vitro</i> .....	20
4.6.1. Evaluación de la actividad citotóxica de BCD sobre líneas celulares de cáncer .....	20
4.7. Actividad antioxidante .....	23
Capítulo 5. Perspectivas futuras.....	23
Capítulo 6. Conclusión.....	23
Bibliografía .....	24

## Capítulo 1. Introducción

Los medicamentos sintéticos tienen un papel relevante en la salud de las poblaciones humanas, se reconoce que han contribuido en aliviar el dolor, y controlar diversas enfermedades. Dentro de los medicamentos sintéticos, los grupos terapéuticos de mayor consumo son los antibióticos, medicamentos cardio y cerebrovasculares, así como los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), donde estos últimos tienen gran relevancia debido a su uso y a que están fuertemente asociados a una variedad de efectos adversos que a la larga perjudican o empeoran la calidad de vida de los pacientes, particularmente, cuando estos son administrados durante períodos prolongados de tiempo. Estudios demuestran la presencia de úlceras gástricas y duodenales en 24% de los pacientes con artritis reumatoide en tratamiento con AINEs, así como una tasa de mortalidad asociada con el uso de AINEs de alrededor de 5.6%, equivalente a 15,3 muertes por cada 100,000 pacientes (Vergara, N. 2017).

La inflamación es un padecimiento originado por la presencia de un agente patógeno o por la estimulación de agentes externos que generan una lesión tisular (traumáticos, tóxicos, autoinmunes, etc) (Vega, G. 2008). Siendo la inflamación uno de los temas de mayor interés en la clínica debido a que se presenta en diversas enfermedades, tales como, la diabetes, el lupus, la artritis, el cáncer etc. Donde el cáncer se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial que puede surgir en cualquier tipo de células y órganos, además es una de las principales causas de muerte pues en el año 2020 se estimaron casi 10 millones de fallecimientos en el mundo, siendo el cáncer pulmonar, colorrectal, hepático, gástrico y de mama los que causan un mayor número de fallecimientos a nivel mundial. Esta enfermedad involucra como una de sus características a la presencia de inflamación, por ello, es necesario continuar la búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica sobre cáncer, esperando que ayuden a reducir los efectos adversos, esto a partir de productos naturales siendo México uno de los países donde las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos, convirtiéndolo en una fuente primordial para la obtención de nuevos fármacos (Hernández, V *et al.*, 2018).

*Ranunculus petiolaris*, pertenece a la familia Ranunculaceae es conocida comúnmente como “Pata de león o Amazote”, es una especie común en los bosques de pino y encino de la Sierra madre y es de fácil reconocimiento debido a sus flores de llamativo color amarillo (Hanan, A & Mondragón, J, 2019).

En la actualidad no existen informes acerca del estudio de esta planta en ningún ámbito, por ello, el objetivo de este proyecto de servicio social fue llevar a cabo la recolección, identificación y evaluación de actividad antiinflamatoria y/o citotóxica de los extractos, fracciones y compuestos presentes en *R. petiolaris* que sean potencialmente viables para el desarrollo de nuevos medicamentos.

## Capítulo 2. Marco teórico

### 2.1. Inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico ante un daño en el organismo. Este daño puede ser causado por diversos factores, como los de naturaleza mecánica (por un golpe o fractura), infecciosos (por alguna bacteria o virus), o bien químicos (por el contacto con alguna sustancia) (Marinovic, M. 2008). La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor.

De acuerdo con Buse y Bakris la presencia de la inflamación puede contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas e incluso enfermedades cardíacas, autoinmunes y neurodegenerativas, entre otras (Buse, J & Bakris, L, 2008).

#### 2.1.2. Clasificación de la inflamación

La inflamación puede clasificarse de acuerdo con los criterios que se muestran en la tabla 1. (Kumar, V *et al.*, 2010):

Tabla 1. Clasificación de la inflamación.

Crterios	Tipos			
<b>Tiempo de duración</b>	<b>-Aguda:</b> Respuesta inmediata al daño, cuya finalidad es la liberación de mediadores en el área de lesión, su duración es corta.	<b>-Crónica:</b> Proceso prolongado en el cual hay destrucción de tejido y un repetitivo intento de reparación, su tiempo de duración es prolongado.	-	-
<b>Carácter de exudado</b>	<b>-Trasudado:</b> Caracterizada por la presencia de líquido extravascular con bajo contenido proteico, producto de la ligera permeabilidad vascular.	<b>-Exudado:</b> Hay presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, lo que denota una gran permeabilidad en los vasos sanguíneos.	-	-
<b>Etiología</b>	<b>-Infecciosa:</b> Por bacterias, virus, parásitos.	<b>-Traumáticas.</b> <b>-Térmicas:</b> Resultante de quemaduras o congelamiento.	<b>-Por irradiación.</b> <b>-Por exposiciones a agentes químicos ambientales.</b>	<b>-Por presencia de cuerpos extraños.</b> <b>-Por necrosis tisular.</b>
<b>Localización</b>	<b>-Focal:</b> Producida en zonas y órganos específicos.	<b>-Diseminada:</b> Resultado de la propagación de procesos inflamatorios persistentes.	-	-

### **2.1.3. Tratamientos antiinflamatorios**

En la actualidad existen diversos medicamentos usados para el tratamiento de la inflamación, consisten en tres grupos de agentes antiinflamatorios (Domínguez, L. 2012):

1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)
2. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides
3. Fármacos modificadores de la enfermedad (FARMEs)

Los tratamientos más comunes son los AINEs, como ibuprofeno, naproxeno, aspirina, entre otros, estos actúan disminuyendo el dolor y la inflamación mediante la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) así como el bloqueo de la secreción de mediadores proinflamatorios (Espinós, D *et al.*, 2011)

Los glucocorticoides se caracterizan por poseer un potente efecto antiinflamatorio local esto debido a su liposolubilidad (Cosío, B. 2005). Dentro de este grupo se encuentran la dexametasona, cortisona, hidrocortisona, por mencionar algunos.

Por último, los fármacos modificadores de la enfermedad inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias (Domínguez, L. 2012). Estos fármacos comparten acciones farmacológicas, así como efectos adversos: como la toxicidad gastrointestinal y renal (Gómez, H *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, también es recomendable llevar a cabo una dieta variada en frutas, verduras y granos enteros, acompañada a su vez de ejercicio regular y una reducción del estrés para ayudar a reducir la inflamación (Smolen, J *et al.*, 2011).

### **2.1.4. Efectos secundarios/adversos**

Dentro del tratamiento de la inflamación, las propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias de los AINEs hacen que su prescripción sea de las más empleadas. Esta clase heterogénea de fármacos incorpora diversos agentes inhibidores no selectivos, esto un problema, debido a que los AINEs pueden desencadenar un bloqueo de la COX-1 en el tracto gastrointestinal llegando a inhibir la producción de prostaglandinas en la mucosa pudiendo llevar a la ulceración, perforación e incluso sangrado digestivo, además la evidencia científica sobre el incremento del riesgo cardiovascular con el uso de este tipo de fármacos indica particularmente que el uso de inhibidores selectivos de la COX-2 ejercen efectos cardiovasculares adversos, incluyendo aumento de riesgo de infarto del miocardio, insuficiencia cardiaca y renal, así como hipertensión arterial (Batlouni, M. 2010).

En cuanto a los glucocorticoides existe evidencia científica que demuestra que el uso prolongado de este tipo de fármacos provoca un gran número de efectos secundarios, entre estos está principalmente la

hiperglucemia y la hiperinsulinemia por el aumento de síntesis hepática de lipoproteínas y triglicéridos (Espinós, D *et al.*, 2011).

Mientras que en el tratamiento con FARMES, estos se asocian con alteraciones hematológicas como hemorragias, hematomas las cuales pueden poner en riesgo la vida de los pacientes. Algunos de estos fármacos son: sulfasalazina, cloroquina, metotrexato, entre otros (OMS, 2018).

### 2.1.5. Tratamiento alternativo contra la inflamación

En las últimas décadas el interés por los compuestos antiinflamatorios de origen natural ha ido en aumento, esto debido a que ofrecen múltiples ventajas, tales como: baja incidencia de efectos adversos en relación con los antiinflamatorios convencionales (Gómez, H *et al.*, 2011). Por lo que el presente trabajo propone estudiar científicamente a la planta *Ranunculus petiolaris*, la cual, ha sido empleada en la medicina tradicional para aliviar el dolor e inflamación de vientre (Ghenó, Y. 2010).

El género *Ranunculus* abarca cerca de 400 especies de plantas de la familia Ranunculaceae, sobre todo plantas perennes con flores blancas o amarillas como *R. petiolaris* (fig. 1), *R. bullatus* (fig. 2) y *R. alismifolius* (fig. 3), por mencionar algunas.



Fig. 1. Planta fresca de *R. petiolaris*.

Fig. 2. Planta fresca de *R. bullatus*.

Fig. 3. Planta fresca de *R. alismifolius*.

Imágenes tomadas de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/ranunculaceae/ranunculus-petiolaris/fichas/pagina1.htm> y [http://www.internatura.org/guias/plantas/boton\\_oro.html](http://www.internatura.org/guias/plantas/boton_oro.html)

## 2.2. Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que puede surgir en cualquier tipo de células y órganos, dicha enfermedad es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular: proliferación ilimitada, independencia ambiental para el crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis a diferentes partes del cuerpo (Hanahan, D & Weinberg, R, 2011), todas estas alteraciones promueven de manera colectiva el crecimiento maligno de las células, además estas características son compartidas por la mayoría y quizá todos los tipos de tumores humanos.

El cáncer puede ser producido por diversos factores: físicos (radiaciones ultravioletas y ionizantes), químicos (amianto, humo de tabaco, arsénico, etc). Adicionalmente, la incidencia de esta enfermedad incrementa conforme al aumento de la edad de las personas, debido a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular (PAHO, 2021).

### **2.2.1. Tratamientos contra el cáncer**

Los principales tratamientos suelen emplearse de manera individual o colectiva y comprenden radioterapia, cirugía, inmunoterapia y quimioterapia. Esta última se basa principalmente en el uso de fármacos citotóxicos, es decir, sustancias químicas con propiedades destructoras de células (Nyngren, P & SBU-group, 2001) y actúa reteniendo o deteniendo el crecimiento de las células de cáncer y así reducir la carga tumoral. El objetivo de este tratamiento es la inhibición de la multiplicación de tumores y la proliferación celular, evitando así la metástasis (Muhammad, T. *et al.*, 2023). Sin embargo, es un proceso con efectos tóxicos debido a que afecta también a las células normales.

### **2.3. Tratamiento alternativo contra el cáncer**

Durante varios años el desarrollo y el uso de medicamentos quimioterapéuticos han sido de gran utilidad para el tratamiento del cáncer, sin embargo, los efectos adversos de estos son aún preocupantes debido a que afectan de forma negativa al organismo; por ejemplo, la doxorubicina, la cual es ampliamente utilizada sola o en combinación para el tratamiento de determinados tipos de cáncer de tiroides y determinados tipos de sarcomas óseos o de tejidos blandos, causa toxicidad renal y cardíaca, otro agente quimioterapéutico común es el 5-fluorouracilo usado para tratar diferentes tipos de cáncer como el de mama, piel, estomago, páncreas y esófago (garganta) al cual se le atribuyen efectos secundarios como: cardiotoxicidad y mielotoxicidad (Desai, A *et al.*, 2008). Debido a que los fármacos utilizados en la quimioterapia no son selectivos ante células sanas, existe un interés científico en la búsqueda de fármacos con menos efectos adversos, con la finalidad de causar un impacto positivo en el tratamiento de los pacientes con cáncer, por lo cual se han estudiado, identificado y aislado ciertos compuestos derivados de plantas que poseen actividad citotóxica a células cancerígenas, inducción de apoptosis e inhibición del crecimiento celular (Kooti, W *et al.*, 2017). Tal es el caso de los alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y derivados de camptotecina como cuatro tipos de agentes citotóxicos empleados para el tratamiento contra el cáncer (Kuruppu, A *et al.*, 2019).

#### **2.4. Generalidades de *Ranunculus petiolaris***

*R. petiolaris* es una planta con una amplia distribución en México, con registro en diversos estados como San Luis Potosí, Chiapas, Puebla, Michoacán, Morelos, etc. Es común en los bosques de pino y encino de la Sierra madre, así como en regiones templadas, generalmente con vegetación dominada por pastos. Se desconoce su origen, sin embargo, también se encuentra con distribución al suroeste de Estados Unidos hasta el noroeste de Sudamérica, es conocida comúnmente como “Pata de león o Amazote” y es usada en la medicina tradicional para aliviar el dolor e inflamación de vientre (Gheno, Y. 2010).

El crecimiento de esta planta perenne puede alcanzar hasta los 80 cm de largo y es de fácil reconocimiento debido a sus flores de llamativo color amarillo (Hanan, A & Mondragón, J, 2019).

##### **2.4.1. Clasificación Taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ranunculales

Género: *Ranunculus*

Especie: *petiolaris*

## **Justificación**

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna debido a que son fuente de un gran número de moléculas con una amplia variedad estructural y, además, muchas de estas poseen actividad biológica. La investigación en productos naturales tiene como propósito principal generar conocimiento que permita la identificación y obtención de principios activos, así como evaluar su uso como alternativa terapéutica, para el tratamiento de diversas enfermedades con especial énfasis en la inflamación, la cual está involucrada en la mayoría de las afecciones, tales como cáncer, diabetes, etc. Es así como el presente proyecto contribuye a la generación de conocimiento relacionado a la identificación, aislamiento, purificación y elucidación de la estructura, de los metabolitos secundarios de *R. petiolaris* con actividad antiinflamatoria y citotóxica.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Aislar el o los principios activos con actividad antiinflamatoria y/o citotóxica de *R. petiolaris* a través de un estudio biodirigido y determinar su mecanismo de acción.

### **Objetivos específicos**

- Obtener los extractos de diclorometano y metanol de las partes aéreas de *R. petiolaris*.
- Determinar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los dos extractos.
- Separar el extracto con mayor actividad por cromatografía en columna y evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de las fracciones obtenidas.
- Aislar el o los compuestos activos.
- Elucidar la estructura de los principios activos.
- Determinar el efecto del compuesto activo sobre la viabilidad en macrófagos.
- Cuantificar la producción de mediadores en macrófagos estimulados con LPS.
- Determinar la citotoxicidad del compuesto en células cancerígenas.

## Capítulo 3. Metodología

### 3.1. Colecta de la planta *Ranunculus petiolaris*

*R. petiolaris* fue colectada en el estado de San Luis Potosí, México, en la carretera San Luís Potosí a Rio Verde, Ejido San Francisco. Se realizó la poda ecológica de las partes aéreas de la planta (flores, hojas y tallos). La planta fue autenticada por el M. en C. Gabriel Flores y un espécimen se depositó en el Herbario de la Universidad del Estado de Morelos (HUMO 37539).

### 3.2. Preparación de los extractos de diclorometano y metanol

Las partes aéreas de *R. petiolaris* se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente, posteriormente fue molida. La extracción del material vegetal se realizó por maceración con dos disolventes distintos: diclorometano y metanol, utilizando 20 g de planta molida para cada extracto y 200 mL del respectivo disolvente (diclorometano y metanol) durante 3 días. Después la mezcla se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor para obtener los extractos.

### 3.3. Separación de las fracciones del extracto con mayor actividad

El extracto con mayor actividad biológica fue separado por cromatografía en columna abierta empacada con silica gel 60, como fase estacionaria, y como fase móvil hexano, aumentando la polaridad con acetato de etilo. A las fracciones resultantes de esta separación se les realizó una cromatografía en capa fina con el objetivo de juntar las que presentaban el mismo patrón. En las fracciones obtenidas donde se precipitaron sólidos, se eliminó el disolvente por decantación y posteriormente los sólidos se lavaron con hexano y se filtraron.

## 3.4. Evaluación biológica

### 3.4.1. Modelo *in vivo*

#### 3.4.1.1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular en ratón inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA)

Se usaron ratones macho, especie: *Mus musculus*, cepa: CD-1 con un peso promedio de 20-25 g, proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Se formaron cuatro grupos de 8 animales cada uno; positivo, negativo, extracto de diclorometano y extracto de metanol. Para inducir la inflamación se administró una dosis de 2.5 µg de TPA disueltos en acetona, en

la oreja derecha de cada ratón, treinta minutos después de la aplicación se administraron por vía tópica, en la oreja derecha, los tratamientos a cada grupo:

1. Control positivo: se utilizó indometacina (2 mg/oreja).
2. Control de prueba: extracto de diclorometano (2 mg/oreja).
3. Control de prueba: extracto de metanol (2 mg/oreja).

Después de seis horas los ratones se sacrificaron y se horadaron ambas orejas de cada ratón en círculos de 6 mm de diámetro. Las orejas se pesaron y la diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda se tomó como expresión del edema, calculando así el porcentaje de inhibición de los animales tratados con respecto al grupo control, empleando la fórmula 1 (Williams & Topham, R, 2007);

$$\%inhibición = \frac{(Ct - C0)control - (Ct - C0)tratado}{(Ct - C0)control} \times 100$$

*Fórmula 1. Para determinar el porcentaje de inhibición de la inflamación en el modelo de edema auricular de ratón inducido con TPA. Donde Ct=Peso del tejido horadado de la oreja tratada (derecha), C0= peso del tejido horadado de la oreja sin tratamiento (izquierda), control= control negativo (administrado únicamente con TPA) y tratado= grupo tratado con indometacina o con el extracto.*

### **3.4.1.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de las fracciones del extracto con mayor actividad biológica**

Las fracciones resultantes en la separación por cromatografía en columna del extracto con mayor actividad se evaluaron en el modelo de edema auricular en ratón inducido por aceite de crotón con una dosis de 50 µg en la oreja derecha de cada ratón. Con base en la estadística de los resultados obtenidos, se determinó la fracción con mayor actividad antiinflamatoria.

### **3.5. Obtención de sólidos a partir de las fracciones**

En la fracción activa se obtuvo un sólido (BCD), el cual se filtró, y se purificó mediante lavados con hexano y tratamiento con carbón activado para eliminar impurezas, se obtuvo el punto de fusión y se realizó el análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la elucidación de su estructura.

### **3.6. Modelos *in vitro***

#### **3.6.1. Cultivo celular de macrófagos**

Se emplearon macrófagos J774A.1 (macrófagos de murino), los cuales se crecieron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), y antibiótico (2 U/mL de penicilina y 20 µg/mL de estreptomycin) incubando a una temperatura de 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS**

#### **3.6.2.1 Determinación de Viabilidad de macrófagos tratados con BCD por el ensayo de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT)**

Las células se lavaron con 1 mL de buffer de sales de fosfato (PBS) y después se agregaron 500 µL de una solución de tripsina 0.05%, y se dejó por cinco minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, se adicionaron 500 µL de medio (DMEM) posteriormente, los macrófagos fueron centrifugados a 5000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente el sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de DMEM. Los macrófagos se contaron en una cámara de Neubauer para sembrarlas en cajas de 96 pozos (5000 células /pozo) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente los macrófagos fueron tratados con diferentes concentraciones de BCD (1-200 µg/mL), el grupo control (macrófagos sin tratamiento) se tomó como referencia del 100% de viabilidad.

Los macrófagos tratados se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente se agregaron 10 µL por pozo de una solución de MTT (5 mg/mL), se dejó incubar la placa de 1 a 2 horas hasta la formación de cristales de formazán. Enseguida, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Mosmann, T. 1983). El porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente formula:

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

*Fórmula 2. Para determinar el porcentaje de viabilidad.*

Con la viabilidad calculada de los macrófagos tratados con BCD se determinó la concentración de BCD usada para la determinación de óxido nítrico.

#### **3.6.2.2. Determinación de óxido nítrico (NO)**

Se sembraron macrófagos en placas de 6 pozos a una densidad de 200,000 células por pozo. Se usaron 4 pozos, para cada grupo. Los grupos formados fueron los siguientes: Grupo basal (sin tratamiento, solo DMEM), Grupo LPS (3 µg/mL de LPS), Grupo dexametasona (5 µg/mL y 3 µg/mL LPS), Grupo BCD (50 µg/mL y 3 µg/mL LPS). Las células se dejaron incubar por 24 horas. Posteriormente se aplicaron los tratamientos: grupo dexametasona, grupo BCD y al grupo basal se le coloco solo DMEM, 2 horas después se aplicó el lipopolisacárido (LPS) en: grupo BCD, grupo dexametasona y grupo LPS y se dejaron incubar por 24 horas. Al terminar el periodo de incubación se colectaron los sobrenadantes en una placa de 96 pozos colocando 100 µL de sobrenadante de cada grupo (Basal, LPS, Dexametasona y BCD), posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 µL de reactivo de Griess. La placa se incubó a 37° C durante 30 min, una vez

transcurrido ese tiempo se determinaron las absorbancias en un lector de ELISA a 540 nm. El porcentaje de NO de cada grupo se calculó a partir de considerar el 100% al grupo de LPS.

### **3.6.3. Evaluación de la actividad citotóxica de BCD sobre líneas celulares de cáncer**

#### **3.6.3.1. Cultivo celular de MCF-7, HCT-15 y HeLa**

Las líneas celulares utilizadas fueron: MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer colorrectal) y HeLa (cáncer cervicouterino). Las células se sembraron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), y antibiótico (2 U/mL de penicilina y 20 µg/mL de estreptomycin) incubando a una temperatura de 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.6.3.2. Evaluación de citotoxicidad por ensayo de MTT**

Se emplearon tres líneas celulares de cáncer: MCF-7, HCT-15 y HeLa, éstas fueron sembradas en una placa de 96 pozos a una densidad de 5000 células por pozo, dejándolas incubar a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente se formaron los grupos de estudio: grupos de prueba: células tratadas con BCD a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5 y 1 µg/mL) y grupo control: células sin tratamiento, sólo vehículo.

Las células tratadas se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente se agregaron 10 µL de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL. Se dejó incubar la placa de 1 a 2 horas hasta la formación de cristales de formazán. Enseguida, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL de DMSO para solubilizar los cristales previamente formados. Finalizado el procedimiento se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Mosmann, T. 1983). El porcentaje de citotoxicidad se obtuvo con la siguiente formula:

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

*Fórmula 3. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad.*

Cada ensayo se realizó por triplicado con n=7. Con los valores obtenidos se calculó, mediante un análisis de regresión lineal, la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de la población celular CI<sub>50</sub>.

### 3.7. Actividad antioxidante

#### 3.7.1. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Se prepararon soluciones de ABTS 7 mM y de persulfato de potasio 2.45 mM como agente oxidante. Se mezclaron volúmenes iguales de las dos soluciones y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 12 horas.

En una placa de 96 pozos se colocaron 180 µL de ABTS, se dejó incubar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz, pasado ese tiempo se colocaron 20 µL de BCD a diferentes concentraciones (100-1.56 µg/mL) disuelto en metanol, así como 10 µL de Trolox (40-0.62 µg/mL), también disuelto en metanol. La absorbancia se determinó a 734 nm después de 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La curva estándar de Trolox fue lineal entre 0-31.2 µg/mL (Palacios, J *et al.*, 2014).

#### 3.7.1.2. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El ensayo se realizó con base en el método de Chanda y colaboradores con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía 100 µL de BCD y 100 µL de DPPH 0.208 mM, ambos disueltos en metanol (7.8-125 µg/mL). La decoloración se midió después de 20 minutos en ausencia de luz a una longitud de 490 nm. Para los cálculos, se trazó una curva de calibración de Trolox (0-31.2 µg/mL) (Chanda, S *et al.*, 2011).

La capacidad de captación de radicales (ABTS y DPPH) de las muestras se calculó empleando la siguiente fórmula (Palacios, J *et al.*, 2014):

$$\% \text{actividad de eliminación de radicales} = \left( \frac{(Ac - As)}{Ac} \right) \times 100$$

*Fórmula 4. Para determinar el porcentaje de actividad de la eliminación de radicales (ABTS y DPPH), donde Ac=absorbancia del control, As=absorbancia en presencia de las muestras. Se empleó metanol como blanco. Ambos ensayos se realizaron por triplicado.*

### 3.8. Análisis estadístico

Los valores experimentales se expresan como la media ± la desviación estándar de al menos 3 experimentos.

Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística se empleó el nivel de  $p > 0.05$ . En análisis estadístico se realizó en Excel.

## Capítulo 4. Resultados y discusión

### 4.1. Preparación de los extractos de diclorometano y metanol

En la tabla 2 se presentan los rendimientos obtenidos de los extractos de diclorometano y metanol.

<b>Tabla 2. Rendimientos de los extractos de diclorometano y metanol de <i>Ranunculus petiolaris</i>.</b>	
<b>Extracto</b>	<b>% Rendimiento (m/m)</b>
Diclorometano	1.635
Metanol	13.785

Como se muestra en la tabla 2, se obtuvo un mejor rendimiento en el extracto más polar (metanol) donde se observa una proporción 10 veces mayor al obtenido con el extracto de diclorometano. Sin embargo, con el fin de conocer la bioactividad de ambos extractos, se evaluó su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular en ratón.

### 4.2. Modelos *in vivo*

#### 4.2.1. Evaluación antiinflamatoria *in vivo* de los extractos de diclorometano y metanol

La actividad antiinflamatoria de los extractos de diclorometano y metanol se determinó en el modelo de edema auricular de ratón inducido con TPA, los porcentajes de inhibición de ambos extractos se muestran en la tabla 3. Los valores se determinaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) para identificar cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas con el control positivo (indometacina).

<b>Tabla 3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de <i>Ranunculus petiolaris</i> en el modelo de edema auricular de ratón inducido con TPA.</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>% de inhibición de la inflamación ± EE</b>
Indometacina	43.37 ± 6.20
Extracto de diclorometano	37.06 ± 8.02
Extracto de metanol	34.24 ± 3.18

Media ± EE (n=8). \*Existen diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control (Indometacina) ( $p > 0.05$ ). Resultados de ANOVA.

Con base en los resultados de la tabla 3, se decidió continuar el estudio con el extracto de diclorometano. En ambos extractos no existe diferencia significativa en comparación con el grupo control.

El TPA es un éster de forbol extraído del aceite de *Croton tiglium*, ha sido empleado como agente proinflamatorio, debido a que posee propiedades irritantes y promotoras de tumores (Vähätupa, M *et al.*, 2019); induce la inflamación desencadenando vasodilatación, permeabilidad vascular, extravasación y edema (Moreno, C. 2013). Al inducir el edema auricular en oreja de ratón mediante la aplicación tópica del TPA, la inflamación que se produce está mediada por la proteína quinasa C (PKC), la cual da pauta a la formación de la fosfolipasa A2, donde esta promueve la activación del ácido araquidónico de las membranas celulares, culminando con la activación de lipooxigenasas y de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) induciendo de esta manera la biosíntesis de prostaglandinas, además de aumentar la producción de radicales libres (Zambrano, O *et al.*, 2017). En consecuencia, es de gran importancia encontrar compuestos químicos capaces de inhibir a estos medidores pro-inflamatorios.

#### **4.2.1.2. Separación y evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de las fracciones del extracto con mayor actividad biológica**

Se realizó una separación biodirigida mediante una cromatografía en columna abierta del extracto de diclorometano con el objetivo de identificar el compuesto activo. Se obtuvieron dieciséis fracciones en total, posteriormente se les realizó una cromatografía en capa fina para agrupar aquellas que presentaron el mismo patrón, obteniendo seis fracciones que fueron nombradas de la letra A a la letra F, la tabla 4 presenta la polaridad de la fase móvil en que fueron colectadas.

**Tabla 4. Fracciones resultantes de la cromatografía en columna abierta con hexano/acetato de etilo.**

<b>Fracción</b>	<b>Polaridad de la fase móvil</b>
A	90:10 hexano/acetato de etilo
B	70:30 hexano/acetato de etilo
C	50:50 hexano/acetato de etilo
D	90:10 acetato de etilo/metanol
E	80:20 acetato de etilo/metanol
F	100 metanol

Los disolventes polares compiten eficientemente con las moléculas polares de la mezcla por los lugares polares del adsorbente, es así como puede llevarse a cabo el desplazamiento de componentes de acuerdo con la afinidad del eluyente y así obtener una separación adecuada. Otros factores importantes que se consideraron en esta separación biodirigida fueron los colores, pues las mezclas de disolventes recuperadas en la cromatografía en columna eran coloreadas y eso permitió la identificación de las fracciones entre columnas.

Fue así como de las seis fracciones obtenidas, se evaluaron las actividades biológicas de las cuatro de polaridades intermedias (B-E), en el modelo de edema auricular de ratón empleando aceite de croton disuelto en acetona como agente proinflamatorio.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación antiinflamatoria de las fracciones anteriormente mencionadas, mismos a los que se les realizó el ANOVA correspondiente.

<b>Tabla 5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones del extracto de diclorometano de <i>Ranunculus petiolaris</i> en el modelo de edema auricular de ratón inducido con aceite de croton.</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>% de inhibición de la inflamación ± EE</b>
Indometacina	85.89 ± 1.11
Fracción B	74.54 ± 7.44
Fracción C	55.52 ± 7.86*
Fracción D	80.98 ± 4.26
Fracción E	51.53 ± 7.65*

Media ± EE (n=8). \*Existen diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control (Indometacina) ( $p > 0.05$ ). Resultados de ANOVA.

Como se observa en la tabla 5, las fracciones B y D tienen un porcentaje de inhibición mayor en comparación con las fracciones C y E, además de no tener diferencias estadísticamente significativas en comparación con la indometacina.

Estos resultados permiten suponer que los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria están presentes en las fracciones B y D.

#### **4.3. Aislamiento y caracterización de sólidos a partir de las fracciones**

En cada una de las fracciones B, C y D, se obtuvo un sólido que presenta el mismo punto de fusión, entre 215-219° C, lo cual indica que no se trataba de un compuesto puro, sino de una mezcla de compuestos. Por otro lado, se realizó un análisis por cromatografía en capa fina donde se muestra que los sólidos B, C y D, presentaron el mismo patrón, empleando la misma polaridad del eluyente (5% metanol y 95% acetato de etilo). Con base en este resultado se decidió juntar a los tres sólidos y nombrarlo BCD.

Cabe mencionar que el rendimiento del sólido BCD aislado fue muy bajo, pues de 1.8 g de extracto se logró separar únicamente 30 mg en cromatografía en columna abierta, lo que equivale a 1.56% de rendimiento.

El sólido BCD se intentó purificar mediante lavados con hexano y posteriormente tratamiento con carbón activado, sin embargo, al realizar el tratamiento con carbón activado se perdió una cantidad considerable

del sólido del 60% m/m. Por otra parte, tampoco pudo realizarse una separación biodirigida mediante cromatografía en columna abierta debido al bajo rendimiento del sólido en las fracciones.

Sin embargo, al sólido recuperado de los lavados con hexano y el tratamiento con carbón activado se le determinó los espectros de RMN para intentar elucidar la posible estructura de los compuestos.

#### 4.4. Análisis de los espectros de RMN

Los experimentos de RMN-  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en un equipo Agilent 600 DD2 con una sonda tipo OneNMR, la muestra fue disuelta en  $\text{CDCl}_3$  y se agregaron unas gotas de  $\text{DMS-d}_6$  para favorecer su solubilidad. En la figura 4 y 5 se presentan ambos espectros.

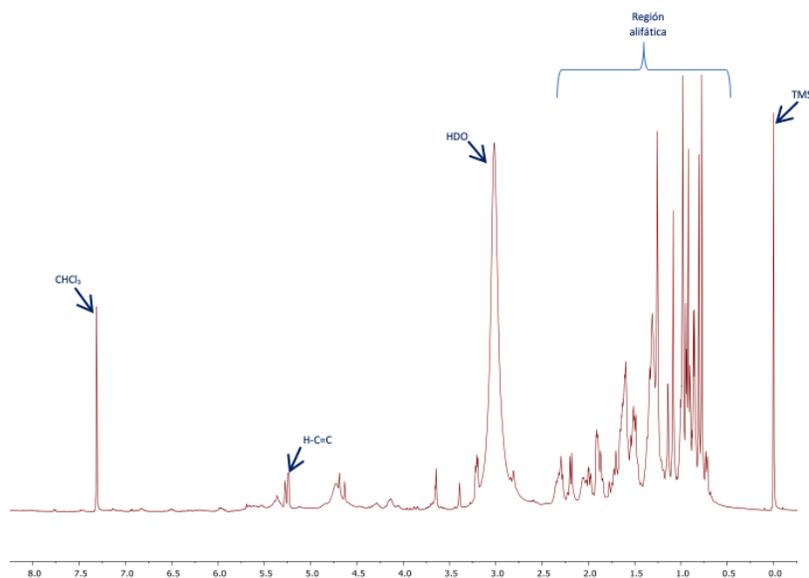


Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del sólido BCD.

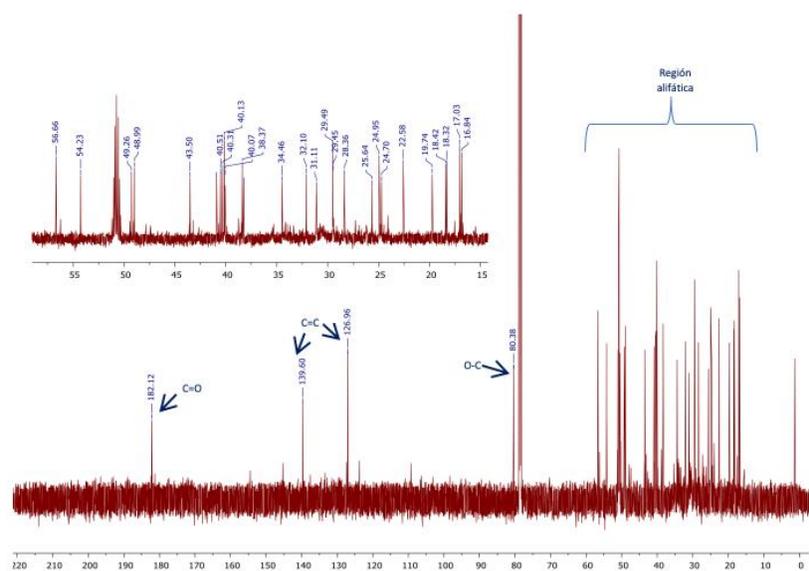


Figura 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del sólido BCD.

El análisis de los experimentos muestra que el sólido es una mezcla de varios compuestos, sin embargo, se observa la presencia de un compuesto mayoritario, cuyo perfil nos da indicios de la presencia de un triterpeno. En particular, el experimento de  $^{13}\text{C}$  muestra 30 señales de mayor intensidad; se observa la presencia de un grupo carbonilo en 182.12 ppm; la presencia de dos carbonos  $\text{sp}^2$  en 139.60 y 126.96 ppm y que indica la presencia de una doble ligadura y que se confirma con la señal 5.25 ppm en el experimento de  $^1\text{H}$ . El carbono con desplazamiento en 80.38 ppm indica la presencia de un carbono base de oxígeno, mientras que los carbonos que se encuentran entre 57 y 16 ppm corresponden a carbono alifáticos de los anillos del triterpeno y que correlacionan con las señales de hidrógeno que se encuentran entre 2.5 y 0.5 ppm. Desafortunadamente, las impurezas y la poca cantidad de muestra que se obtuvo tanto para el análisis biológico como para el espectroscópico no permitieron realizar la completa identificación del triterpeno ya que es necesario realizar un análisis por RMN en 2D.

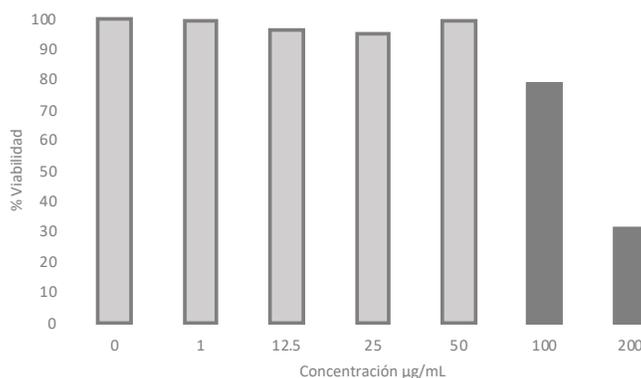
## 4.5. Modelos *in vitro*

### 4.5.1. Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS

#### 4.5.1.1. Determinación de Viabilidad de macrófagos tratados con el sólido aislado (BCD) por el ensayo de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT)

La viabilidad de los macrófagos J774A.1 tratados con el sólido BCD a concentraciones de 1 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se muestra en la gráfica 1. Se tomó como 100% viables a las células del grupo control (macrófagos sin ningún tratamiento).

Los valores de la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) obtenida para BCD fue de  $140.64 \pm 3.17$ , con base en este resultado, la concentración utilizada para la determinación de óxido nítrico (NO) fue menor a la de la  $\text{CI}_{50}$ , ya que se requirió que la viabilidad celular fuera mayor al 60%. Por lo que para BCD se utilizó una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pues en la gráfica 1, se puede observar que entre la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se encuentra el 50% de células vivas.



Gráfica 1. Viabilidad de Macrófagos J774A.1 tratados con BCD (Media  $\pm$  EE, (n=7) de al menos tres experimentos).

La viabilidad celular es la cuantificación del número de células vivas en una muestra y en la actualidad existen una variedad de ensayos *in vitro* para poder cuantificarlas.

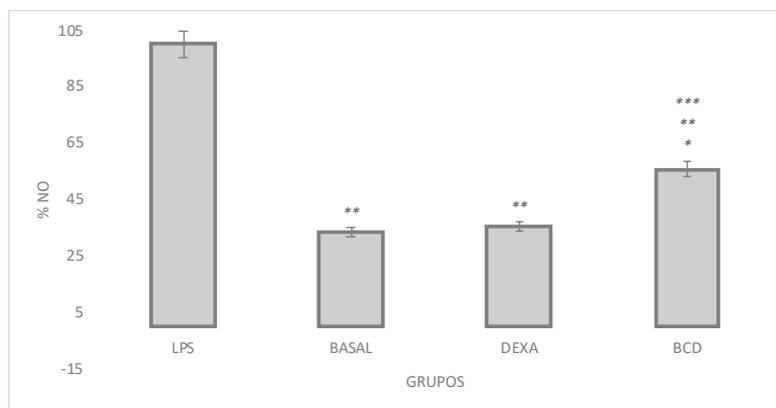
Una prueba *in vitro* ideal para evaluar tanto la citotoxicidad como la viabilidad debe tener como características el ser simple, rápida, eficiente, segura, sensible, reproducible y sobre todo efectiva en la medida de la población celular viable y que no interfiera a nivel químico o estructural con el compuesto a evaluar (Anoopkumar, S *et al.*, 2005).

El ensayo de MTT, es el ensayo más empleado para medir la viabilidad celular al servir como indicador, ya que evalúa la eficacia de las enzimas mitocondriales de las células (Jessop, Z *et al.*, 2017). En este ensayo se mide la función metabólica de las células presentes en un cultivo tras la exposición a un compuesto; el MTT es reducido por las células viables a formazán (cristales azul violeta, insolubles en agua) por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de la cadena respiratoria (Cortejo L. 2013). Como el formazán es insoluble, queda atrapado dentro de las células vivas, y la cantidad producida de este compuesto es proporcional al número de células viables. Para determinar el número de células se miden los valores de absorbancia del formazán utilizando un espectrofotómetro (Jessop, Z *et al.*, 2017).

#### 4.5.1.2. Determinación de Óxido nítrico

El efecto antiinflamatorio *in vitro* de BCD se evaluó en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS.

En la gráfica 2 se muestran los porcentajes de NO producidos por macrófagos tratados con LPS. El grupo LPS fue tomado como el 100% de producción de NO, donde en este grupo las células solo fueron estimuladas con LPS, sin colocarles ningún tratamiento.



Gráfica 2. Porcentajes de producción de NO generado por macrófagos estimulados con LPS. Media  $\pm$  EE (n=4). Existen diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo dexametasona\*, LPS\*\* y basal \*\*\* (p>0.05). Resultados de ANOVA.

Con base en la gráfica 2, se puede observar la producción de NO en los grupos tratados con dexametasona y con BCD ( $35.438\% \pm 2.806\%$  y  $55.524\% \pm 2.806\%$  respectivamente) en comparación con el grupo de LPS (100%), el grupo tratado con dexametasona es similar a la del grupo basal ( $33.286\% \pm 2.393\%$ ), sin embargo, pese a que el grupo tratado con BCD no es del todo similar con estos grupos, se puede ver que disminuyó 44.476% la producción de NO, lo cual es favorable, pues demuestra un efecto antiinflamatorio.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria en modelos *in vitro* se basa en la estimulación de macrófagos con LPS. Este agente es empleado para estimular a las células y así inducir la producción de mediadores, tales como el óxido nítrico (NO) y algunas citocinas. El LPS es un lipopolisacárido presente en la pared celular de las bacterias *Gram negativas* (Tucureanu, M *et al.*, 2018).

El NO participa en el origen y evolución de trastornos inflamatorios de los pulmones, articulaciones e intestino. Se sintetiza y libera en células endoteliales con la participación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual convierte a la arginina en citrulina produciendo NO durante el proceso inflamatorio. En presencia de estímulos como el LPS, los macrófagos tienen la capacidad de producir niveles altos de NO, estos altos niveles inducen vasodilatación en el sistema cardiovascular (Balaji, S & Ganesan, K, 2021). Por lo tanto, la inhibición de NO presenta un avance terapéutico relevante en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Sharma, J *et al.*, 2007). Por ello con base en los resultados obtenidos, se intuye que la actividad antiinflamatoria de BCD se debe a la disminución de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) y al posible incremento de la producción de IL-10, pues la IL-10 es una citocina antiinflamatoria capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias, teniendo un importante papel regulador sobre la respuesta inmune.

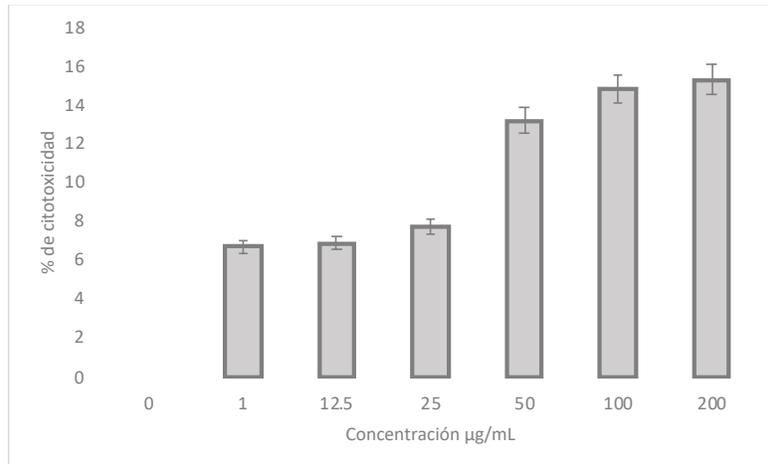
#### **4.6. Actividad de BCD sobre cáncer en modelo *in vitro***

##### **4.6.1. Evaluación de la actividad citotóxica de BCD sobre líneas celulares de cáncer**

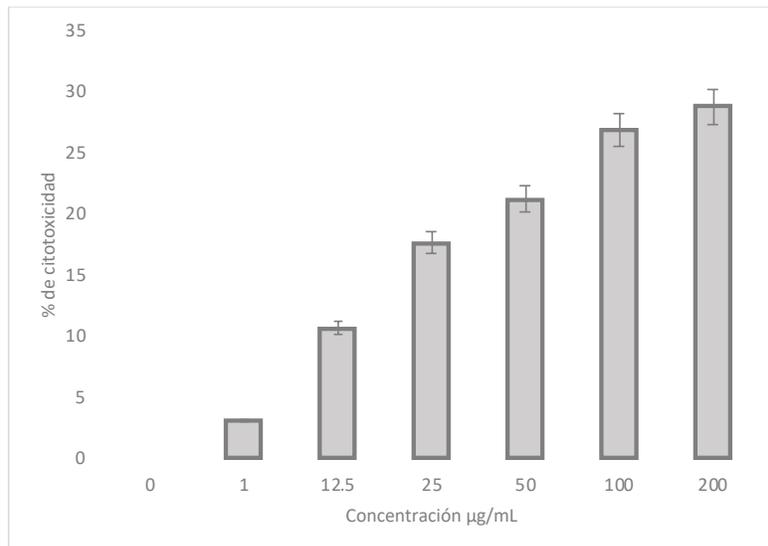
Se evaluó la actividad citotóxica de BCD en tres líneas celulares de cáncer: MCF-7, HCT-15 y HeLa a diferentes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 1  $\mu\text{g/mL}$ , como se muestra en las gráficas 3, 4 y 5 respectivamente. La  $\text{CI}_{50}$  de BCD fue de  $336.75 \pm 2.97 \mu\text{g/mL}$  para MCF-7,  $312.96 \pm 4.22 \mu\text{g/mL}$  para HCT-15 y  $275.50 \pm 3.02 \mu\text{g/mL}$  para HeLa.

Con base en la gráfica 3, se puede observar una proporcionalidad entre la concentración y el porcentaje de citotoxicidad, pues a mayor concentración la citotoxicidad aumenta, sin embargo, los resultados obtenidos en las tres líneas celulares de cáncer indican que el sólido BCD carece de actividad citotóxica ya que las  $\text{CI}_{50}$  obtenidas con cada línea celular se encuentran fuera del rango establecido para considerar un sólido citotóxico, pues de acuerdo con Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU (NCI) se menciona que un compuesto puro tiene actividad citotóxica *in vitro* si el valor de  $\text{CI}_{50}$  es de  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  (Gregoriou, G *et al.*,

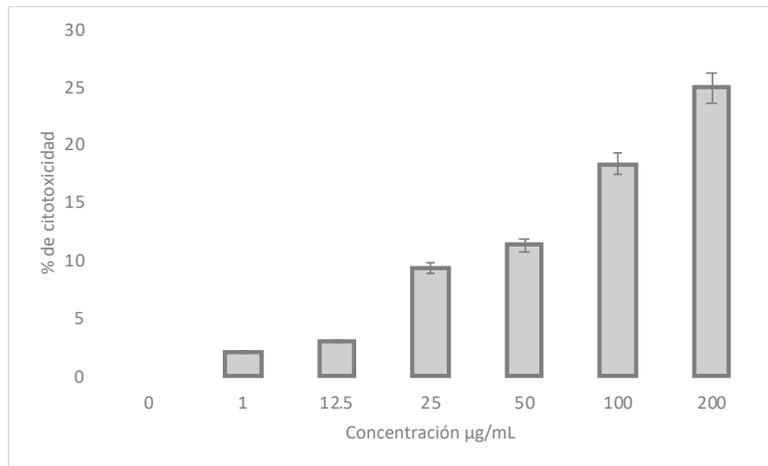
2021). Aunque BCD no es un compuesto puro, este valor puede tomarse como referencia al tratarse de un sólido y no haber reportes de una  $CI_{50}$  para sólidos aislados, además también puede considerarse como referencia la  $CI_{50}$  para considerar un extracto citotóxico, propuesta por Suffness y Pezzuto (Suffness, M & Pezzuto, J, 1990), con una  $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ .



Gráfica 3. Concentraciones empleadas en la evaluación citotóxica de BCD en MCF-7 (Media  $\pm$  EE, (n=7) de al menos tres experimentos).



Gráfica 4. Concentraciones empleadas en la evaluación citotóxica de BCD en HCT-15 (Media  $\pm$  EE, (n=7) de al menos tres experimentos).



Gráfica 5. Concentraciones empleadas en la evaluación citotóxica de BCD en HeLa (Media  $\pm$  EE, (n=7) de al menos tres experimentos).

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el cáncer es una enfermedad presente en la vida de miles de personas, ocasionando múltiples muertes debido a que es una patología en estudio y para la cual, en la actualidad no hay una cura o tratamiento que sea 100% seguro y eficaz. Aunque si existen fármacos y tratamientos que ayudan a paliar sus síntomas además de retener o detener el crecimiento de las células de cáncer y reducir la carga tumoral, resulta importante seguir buscando alternativas seguras y eficaces.

La citotoxicidad celular es definida como una alteración de las funciones celulares básicas que originan daño o muerte a una célula, este daño o muerte puede ser detectable mediante técnicas *in vitro*. Los ensayos de citotoxicidad celular se utilizan generalmente para detectar si los compuestos de ensayo tienen efectos directos en las células (Cortejo, L. 2013).

Algunos de los ensayos *in vitro*, empleados en diferentes reportes científicos, para determinar la actividad citotóxica de un extracto, compuesto o sólido son: el ensayo de azul de tripán, debido a que este es un cromóforo con carga negativa que solo tiñe las células con una membrana celular comprometida, lo que indica la muerte celular (Jessop, Z *et al.*, 2017), ya que al verse afectada la permeabilidad de la membrana el tinte entra al citoplasma uniéndose así a las proteínas intracelulares y se torna a un color azulado (Jain, A *et al.*, 2018).

Otro ensayo empleado es el ensayo de MTT, el cual se basa en la reducción de sales de Tetrazolio. En este ensayo el MTT es reducido por las células viables a formazán (Jessop, Z *et al.*, 2017), por lo cual se esperaría que en un ensayo de citotoxicidad el MTT sea reducido en pocas cantidades, pues esto es un indicativo de que las células no se encuentran viables.

#### **4.7. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de BCD se midió mediante dos ensayos: DPPH y ABTS. Este compuesto tuvo un efecto secuestrante de los radicales libres, con una  $CI_{50}$  de 137.753  $\mu\text{g/mL}$  para DPPH y  $112.118 \pm 1.675$   $\mu\text{g/mL}$  para ABTS. Trolox que se utilizó como control positivo, presentó una  $CI_{50}$  de 8.367 y  $1.671 \pm 0.045$   $\mu\text{g/mL}$  para DPPH y ABTS, respectivamente.

Es innegable que los radicales libres tienen un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la progresión de las células cancerígenas. Por ello, cualquier método que contribuya a disminuir su concentración en el organismo, asegurando así una reducción del estrés oxidativo, es una alternativa en la prevención de esta patología, pues el estrés oxidativo es una de las principales causas de desarrollo de mutaciones y daños en el ADN, que puede desembocar, entre otras patologías, en el cáncer (Campos, M. 2021).

Por ello, en los antioxidantes se puede encontrar una puerta a la investigación de nuevos procesos de prevención y tratamiento de esta enfermedad, así como de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.

#### **Capítulo 5. Perspectivas futuras**

Se recomienda obtener más cantidad del compuesto BCD para poder realizar una purificación de este y así elucidar la estructura del compuesto responsable de la actividad antiinflamatoria, además de realizar más pruebas *in vivo* e *in vitro*. Así mismo sería pertinente realizar un perfil de composición de BCD mediante espectrometría de masas, además de determinar su mecanismo de acción.

También se recomienda trabajar con el extracto de metanol, debido a los resultados obtenidos en el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA, además de su buen rendimiento obtenido en la maceración.

#### **Capítulo 6. Conclusión**

Con base en el análisis de los resultados se determinó, que tanto los extractos de diclorometano y metanol, como las fracciones tienen actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo*, donde las fracciones B y D cuentan con una mejor actividad en comparación con las fracciones C y E, además se aisló el sólido BCD de las mismas, en la especie de *R. petiolaris*. Así mismo, se pudo comprobar que BCD carece de actividad citotóxica en al menos tres líneas celulares de cáncer y no presenta actividad antioxidante en los ensayos de DPPH y ABTS. También fue posible determinar el efecto de este sobre la viabilidad en macrófagos. Lo anterior da pauta a continuar con su investigación, además de implementar más modelos que permitan determinar si posee otro tipo de actividad.

## Bibliografía

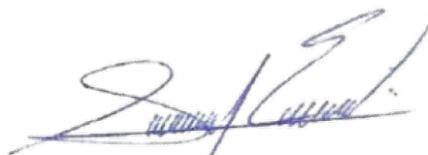
1. Anoopkumar, S., Carey, J., Conere, T., Sullivan, E., Van Pelt, F., Allshire, A. (2005) Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology*. 78(934), 945-947.
2. Balaji, S., & Ganesan, K. (2021). Inhibition of inducible nitric oxide production by *Caryota urens* and its active constituents umbelliferone and rutin. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 12(2), 369–372.
3. Batlouni, M. (2010). Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 94(4), 538-546.
4. Buse, J., & Bakris, L. (2008). Inflammation and Allostasis in Obesity and Metabolic Syndrome. *Physiology and pathophysiology of the endocrine pancreas*, 3(4), 51-58.
5. Campos, M. (2021). *Los antioxidantes en el tratamiento del cáncer: beneficios y riesgos de su administración durante la quimioterapia*. [Trabajo de fin de grado; doble grado en Farmacia y Óptica y Optometría]. Universidad de Sevilla.
6. Chanda, S., Dave, R., Kaneria, M. (2011). In vitro antioxidant property of some Indian medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5, 169–179.
7. Cortejo, L. (2013). *Evaluación de la citotoxicidad de una nueva diazocina en la Línea Celular LNCaP*. [Tesis para obtener el título de Maestra en Neurootología]. Universidad Veracruzana.
8. Cosío, B. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Archivos de Bronconeumología*, 1(41), 34-41
9. Domínguez, L. (2012). Tratamientos farmacológicos contra alternativos en el manejo de pacientes con artritis reumatoide. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 2(43), 23-30.
10. Espinós, D., López, A., Calvo, E. (2011). Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia* (15), 237-286.
11. Gheno, Y. (2010). *La etnobotánica y la agrobiodiversidad como herramientas para la conservación y el manejo de recursos naturales: un caso de estudio en la Organización de Parteras y Médicos Indígenas Tradicionales "Nahuatlxihiuitl" de Ixhuatlancillo, Veracruz, México* [Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias agropecuarias y recursos naturales]. Universidad Autónoma del Estado de México.
12. Gómez, H., González, K., Domingo, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(3), 182-217.
13. Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
14. Hanan, A., & Mondragón, J. (2019). *Ranunculus petiolaris* Kunth ex DC. Malezas de México, Heike Vibrans.
15. Hernández, V., Meléndez, M., Márquez, Y., Arreguín, M. (2018). Estudio etnobotánico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Geranium seemanii* Peyr. *Polibotánica*, (46), 287-303.

16. Jain, A., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A. (2018). Models and Methods for In Vitro Toxicity. *In Vitro Toxicology*, (3), 45–65.
17. Jessop, Z., Al-Sabah, A., Gardiner, M., Combellack, E., Hawkins, K., Whitaker, I. (2017). 3D bioprinting for reconstructive surgery: Principles, applications and challenges. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery*, 70(9), 1155–1170.
18. Kooti, W., Servatyari, K., Behzadifar, M., Asadi-Samani, M., Sadeghi, F., Nouri, B., Zare Marzouni, H. (2017). Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *Journal of evidence-based complementary and alternative medicine*, 22(4), 982–995.
19. Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. (2010). Robbins, & Cotran: Patología estructural y funcional. 8a edición. España: Elsevier.
20. Kuruppu, A., Paranagama, P., Goonasekara, C. (2019). Medicinal plants commonly used against cancer in traditional medicine formulae in Sri Lanka. *Saudi pharmaceutical journal* 27(4), 565–573.
21. Marinovic, M. (2008). Inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Revista Biomédica*, (6), 502-506.
22. Moreno, C. (2013). *Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de Ternstroemia sylvatica* [Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Química Bioorgánica]. Universidad Veracruzana.
23. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 65(1), 55-63.
24. Muhammad, T., Chidharla, A., Kasi, A. (2023). Cancer Chemotherapy. *StatPearls*, 2(2), 17-19.
25. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Estrategia de OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
26. Palacios, J., Arroyo, O., García, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I. (2014). Evidence of the anti-Helicobacter pylori, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *Journal of ethnopharmacology*, 151(2), 990–998.
27. Pan American Health Organization (PAHO). (2021) *World Cancer Day 2021*.
28. Sharma, J., Al-Omran, A., Parvathy, S. (2007). Role of Nitric Oxide in Inflammatory Diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259.
29. Smolen, J., Landewe, R., Breedveld, F., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Kvien, T. (2011). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(7), 1125-1135.
30. Suffness, M., & Pezzuto, J. (1990). Assays related to cancer drug discovery. 6<sup>th</sup> edition. London: Academic Press.
31. Tucureanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C., Deleanu, M., Voicu, G., Butoi, E., Manuela C., Manduteanu, I. (2018). Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Monocytes/Macrophages Is

- Blocked by Liposomal Delivery of Gi-Protein Inhibitor. *International Journal of Nanomedicine*, (13), 63–76.
32. Vähätupa, M., Pemmari, T., Junttila, I., Pesu, M., Järvinen, T. (2019). Chemical-Induced Skin Carcinogenesis Model Using Dimethylbenz[a]Anthracene and 12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetate (DMBA-TPA). *Journal of visualized experiments*, (154), 103-105.
33. Vega, G. (2008). Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 51(5), 220.
34. Vergara, N. (2017). AINEs: Resumen de reacciones adversas hematológicas, gastrointestinales y cardiovasculares. *Boletín de farmacovigilancia*, 2(9), 1-6.
35. Williams & Topham, R. (2007). Methods for Measuring Inflammation in Animal Models of Human Disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(1), 1-15.
36. Zambrano, O., Carrasco, A., Aguilar, A., Hernández, L., Jiménez, M. (2017). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana del extracto orgánico de *Cnidioscolus tehuacanensis* Breckon y su fraccionamiento químico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48, 56-66.



Vo. Bo  
Dra. María Salud Pérez Gutiérrez  
Nombre y firma del asesor externo  
Profesor Titular C  
No. Económico: 2212



Vo. Bo  
Dr. Ernesto Sánchez Mendoza  
Nombre y firma del asesor interno  
Técnico Académico Titular E  
No. Económico: 35036