

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE
DE PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA
TRADICIONAL PARA EL TRATAMIENTO DE
CÁNCER EN OAXACA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

JAEL JARIM AGUILAR RAMIREZ

DIRECTOR:

DR. PAUL MAURICIO SANCHEZ OCAMPO

CO-DIRECTORA:

DRA. JACQUELINE CAPATAZ TAFUR

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca
2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 06 de febrero de 2018
Oficio No. JCIB/001/02/2018

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Jael Jarim Aguilar Ramírez** titulado "**Actividad citotóxica y antioxidante de plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de cáncer en Oaxaca**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
*Terra uberrima, mens
Bou Lo-tama, chí jí*



Dr. Julián Mario Peña Castro

Jefe de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan

c.c.p. M.C. Héctor López Arjona. Vice-Rector Académico. Para su conocimiento.
c.c.p. Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo. Director de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. Jael Jarim Aguilar Ramírez, Alumno. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 28 de Noviembre del 2017 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Actividad citotóxica y antioxidante de plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de cáncer en Oaxaca** presentado por la alumna **Jael Jarim Aguilar Ramírez**, con número de matrícula **11090002**, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE** LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU **APROBACIÓN** PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 28 de Noviembre del 2017.

ATENTAMENTE.
LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo
Profesor- Investigador

Co-Director de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor- Investigador

Presidente

Dr. Victor Manuel Meza Villalvazo
Profesor- Investigador

Secretario

Dr. Edgar García López
Profesor-Investigador

Vocal

Dr. David Paniagua Vega
Profesor- Investigador

“No tengas miedo de decir no lo sé o no lo entiendo. No tengas miedo de continuar incluso cuando las cosas parezcan imposibles, no tengas miedo de estar equivocada y admitir errores, porque solo quienes se atreven a fallar en grande pueden lograrlo en grande”-Margaret Hamilton.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec en el laboratorio de cultivo de células vegetales bajo la asesoría del Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo y la Dra. Jacqueline Capataz Tafur; y en el laboratorio de biotecnología animal con la supervisión del Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo.

La investigación fue realizada con el financiamiento del proyecto de ciencia básica CONACYT CB 2012-01 N° 183958: “Estudio de la respuesta bioquímica y molecular de *Azadirachta indica* A. Juss a factores bióticos y abióticos en la producción de limonoides”. Se contó con la beca de tesis del mismo proyecto asignada con número de becario:24362.

AGRADECIMIENTOS

El culminar una carrera universitaria no es un logro solo del alumno, siempre cuenta con un gran equipo detrás que se encarga de brindarle amor, apoyo económico, animar e instruir. Yo no soy la excepción, ya que a lo largo de todos los años que pasé en la universidad y en el tiempo de desarrollo de la tesis he tenido el apoyo de personas a quienes deseo agradecer de todo corazón.

A mis padres, José Luis y Lucrecia, quienes se han dedicado a hacer de mí la mejor persona posible. Gracias por enseñarme a esperar en Dios, por su amor, consejos y comprensión; por darme impulso cuando el desánimo hacía mella en mi corazón. Gracias por respaldar mis sueños y creer en mí siempre. A mi hermano Jatnael, por su cariño, apoyo incondicional y paciencia, por ser mi máquina de sonrisas cuando me siento triste. *¡Siempre unidos para vencer, los amo!*

A mi abuelita María Irene, quien ha logrado sacarme una sonrisa en mis días tristes y ha sido mi ejemplo de fortaleza.

A Elvia Camacho Cobos, Víctor Luis Ortiz Valenzuela y Griselda Condado, gracias por llevarme siempre en sus oraciones, por el cariño y la amistad brindada a mi familia.

Al Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo y la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto, por los consejos, enseñanzas y atenciones brindadas durante toda la realización de esta tesis. ¡Mil gracias!

A la Dra. María Luisa Villareal del centro de biotecnología de la UAEM, por permitir que me capacitara para el manejo de las líneas celulares en su laboratorio.

Al Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, quien me ha brindado su sincera amistad a lo largo de todos estos años. ¡Gracias Doc!

A los médicos tradicionales que amablemente me brindaron sus conocimientos que fueron de gran importancia para la realización de esta tesis. Principalmente a doña Agripina Heras Carrera, quien me asesoró en la identificación y colecta de las especies.

A los integrantes del comité de evaluación, por asumir el compromiso de la revisión de esta tesis y aportar sus conocimientos para la mejoría de esta.

A mis compañeros del lab, que hicieron más amenas las horas de trabajo, especialmente a Lauris y Gus, quienes me brindaron su apoyo y conocimientos para la realización de algunas de las técnicas.

A Dios, porque mi vida depende de él y le ha placido que viva hasta hoy para concluir una etapa más, por todo lo que me ha dado y por todo lo que añadirá más adelante. Por el brillante futuro que sé que me aguarda bajo su gracia.

¡Gracias a todos los que formaron parte de esto!

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se
quiere debajo del cielo tiene su hora.

Ec. 3:1.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE GRÁFICAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
GLOSARIO	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Cáncer de mama	3
2.1.1. Definición y origen	3
2.1.2. Etapas	4
2.1.3. Clasificación y tipos	5
2.1.4. Incidencia en el estado de Oaxaca	6
2.1.5. Tratamientos	7
2.1.6. Quimioterapia	8
2.2. Medicina tradicional, alternativa para el tratamiento del cáncer	9
2.2.1. Metabolitos presentes en plantas con actividad anticancerígena y citotóxica	10
2.2.1.1. Antioxidantes, metabolitos presentes en plantas medicinales y su actividad contra el cáncer	11
2.2.2. Metabolitos de plantas medicinales, mecanismo de acción y presencia en la industria farmacéutica.	12
2.2.3. Estudios en plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento del cáncer de mama	13
2.2.4. Plantas utilizadas en medicina tradicional mexicana para el tratamiento del cáncer y sus síntomas	15
2.2.4.1. Plantas medicinales de Oaxaca para el tratamiento del cáncer	16
2.3. Valoración de la Citotoxicidad	16

2.3.1. Ensayo preliminar con <i>Artemia salina</i>	16
2.3.2. Ensayos en líneas celulares	17
2.3.2.1. Línea celular de cáncer de mama MCF-7	17
2.3.2.2. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general	21
5.2. Objetivos particulares	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Estrategia experimental	22
6.2. Selección de las especies vegetales	23
6.2. 1. Entrevistas	23
6.2.2. Revisión Bibliográfica	23
6.3. Colecta del material vegetal	24
6.4. Obtención de los extractos	25
6.5. Actividad citotóxica	26
6.5.1. Ensayo <i>Artemia salina</i>	26
6.5.2. Ensayo Sulforodamina B	27
6.6. Actividad antioxidante	28
6.6.1. DPPH (α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo) <i>in situ</i>	28
6.6.2. Ensayo de captación del radical DPPH $\bullet$	29
6.6.3. Ensayo de captación del radical ABTS $^{+}$	29
6.7. Análisis químico	30
6.7.1. Análisis fitoquímico preliminar	30
6.7.2. Cromatografía en capa fina	32
6.7.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	32
6.7.4. Cuantificación de flavonoides	33
6.7.5. Correlación de Pearson	33
6.8. Análisis estadístico	33

7. RESULTADOS	34
7.1. Entrevistas	34
7.2. Rendimiento y características de los extractos	36
7.3. Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	37
7.4. Actividad citotóxica en la línea celular MCF-7	38
7.5. Actividad antioxidante	39
7.5.1. DPPH <i>in situ</i>	39
7.5.2. Ensayo de captación del radical DPPH•	41
7.5.3. Ensayo de captación del radical ABTS+	45
7.6. Análisis químico	49
7.6.1. Análisis fitoquímico preliminar	49
7.6.2. Cromatografía en capa fina	50
7.6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	54
7.6.4. Cuantificación de flavonoides	54
7.6.5. Correlación de Pearson: ensayos de actividad antioxidante y cuantificación de compuestos	55
8. DISCUSIÓN	56
8.1. Citotoxicidad de los extractos	56
8.2. Actividad antioxidante de los extractos	59
8.3. Perfil fitoquímico	63
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. BIBLIOGRAFÍA	68
12. ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tumor desarrollado en seno	3
Figura 2. Tipos de cáncer de mayor frecuencia en mujeres de Oaxaca	6
Figura 3. Tratamientos utilizados para cáncer de mama	7
Figura 4. Metabolitos con actividad anticancerígena y/o citotóxica	11
Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental realizada.	22
Figura 6. <i>Agave potatorum</i>	24
Figura 7. <i>Selaginella lepidophylla</i>	24
Figura 8. Sitio de colecta en la comunidad de Macuilxóchitl	24
Figura 9. <i>Rhamnus purshiana</i> (cáscara)	25
Figura 10. Extractos acuosos previo y posterior al revelado con DPPH	40
Figura 11. Extractos metanólicos previo y posterior al revelado con DPPH	40
Figura 12. Extractos de acetato de etilo previo y posterior al revelado con DPPH	40
Figura 13. Extractos hexánicos previo y posterior al revelado con DPPH	41
Figura 14. Extractos de <i>G. globosa</i> previo y posterior al revelado con DPPH	41
Figura 15. Placa cromatográfica de los extractos acuosos de <i>A. potatorum</i> , <i>R. purshiana</i> y <i>S. lepidophylla</i> , con diferentes reveladores	51
Figura 16. Placa cromatográfica de los extractos metanólicos de <i>A. potatorum</i> , <i>R. purshiana</i> y <i>S. lepidophylla</i> , con diferentes reveladores	51
Figura 17. Placa cromatográfica de los extractos de acetato de etilo de <i>A. potatorum</i> , <i>R. purshiana</i> y <i>S. lepidophylla</i> , con diferentes reveladores	52
Figura 18. Placa cromatográfica de los extractos hexánicos de <i>A. potatorum</i> , <i>R. purshiana</i> y <i>S. lepidophylla</i> , con diferentes reveladores	53
Figura 19. Placa cromatográfica de los extractos de <i>G. globosa</i> , con diferentes reveladores	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Puntaje obtenido para cada una de las plantas medicinales utilizadas en medicina tradicional oaxaqueña para el tratamiento del cáncer.	35
Gráfica 2. Cinética DPPH de los extractos de <i>A. potatorum</i>	42
Gráfica 3. Cinética DPPH de los extractos de <i>R. purshiana</i>	42
Gráfica 4. Cinética DPPH de los extractos de <i>S. lepidophylla</i>	43
Gráfica 5. Cinética DPPH de los extractos de <i>G. globosa</i>	43
Gráfica 6. Cinética ABTS de los extractos de <i>A. potatorum</i>	45
Gráfica 7. Cinética ABTS de los extractos de <i>R. purshiana</i>	46
Gráfica 8. Cinética ABTS de los extractos de <i>S. lepidophylla</i>	47
Gráfica 9. Cinética ABTS de los extractos de <i>G. globosa</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de cáncer de mama	5
Tabla 2. Tipos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer	8
Tabla 3. Metabolitos aislados de plantas en el mercado	13
Tabla 4. Estudios de citotoxicidad en plantas utilizadas en medicina tradicional	14
Tabla 5. Ventajas y desventajas de ensayos de citotoxicidad	19
Tabla 6. Material vegetal utilizado por especie	25
Tabla 7. Rendimientos de extracción	36
Tabla 8. Características de los extractos	37
Tabla 9. Dosis letal 50 de los extractos	38
Tabla 10. Concentración inhibitoria 50 de los extractos	38
Tabla 11. Concentración de antioxidantes en los extractos (DPPH)	44
Tabla 12. Concentración inhibitoria 50 de los extractos (DPPH)	44
Tabla 13. Concentración de antioxidantes en los extractos (ABTS)	48
Tabla 14. Concentración inhibitoria 50 de los extractos (ABTS)	48
Tabla 15. Compuestos presentes en los extractos vegetales	50
Tabla 16. Concentración de compuestos fenólicos en los extractos	54
Tabla 17. Concentración de flavonoides en los extractos	54
Tabla 18. Correlación de Pearson: actividad antioxidante y cuantificación de compuestos	55

GLOSARIO

A-431	Línea celular de cáncer de piel
ABTS+	2-2'-azino-bis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Caco-2	Línea celular de cáncer de colon
cm	Centímetro
DL ₅₀	Dosis letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2-2-difenil-1-picrilhidrazil
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido Clorhídrico
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico-uterino
HEp-2	Línea celular de cáncer de piel
HT-29	Línea celular de cáncer de colon
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
nm	nanómetro
PA-1	Línea de cáncer de ovario
RPMI-1640	medio para cultivo celular Roswell Park Memorial Institute 1640
s	Segundo
T-47D	Línea celular de cáncer de mama
TCA	Ácido Tricloroacético
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
x g	Gravedad
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida
W	Watts

RESUMEN

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres oaxaqueñas, el tratamiento de esta enfermedad suele ser costoso, incluso inaccesible en algunas ocasiones, por lo que las mujeres recurren a alternativas como el uso de plantas medicinales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad citotóxica de extractos obtenidos de plantas medicinales del estado de Oaxaca. Para ello, se seleccionaron a partir de la información proporcionada por médicos tradicionales y la revisión bibliográfica, cuatro especies vegetales (*Agave potatorum*, *Rhamnus purshiana*, *Selaginella lepidophylla* y *Gomphrena globosa*). El material vegetal seco se utilizó para preparar cuatro extractos de diferente polaridad por especie, estos se probaron en nauplios de *Artemia salina* y células de cáncer de mama (MCF-7) administrándose a diferentes concentraciones por triplicado. Después de 48h se realizó el conteo de los nauplios muertos y se determinó la DL₅₀. La tinción de las células con Sulforodamina B se efectuó transcurridas 72 h de la administración del extracto y se realizó la lectura de las absorbancias a 490 nm para determinar la CI₅₀. Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante, se cuantificaron los compuestos fenólicos y flavonoides, y se determinaron los posibles grupos de metabolitos presentes por cromatografía en capa fina y análisis fitoquímico preliminar. Los resultados del ensayo en *A. salina* muestran que los extractos metanólicos de *A. potatorum* y *S. lepidophylla* poseen toxicidad (DL₅₀ de 33.5±0.178 y 62±0.228 µg/ml, respectivamente), mientras que el extracto acuoso de *R. purshiana* puede considerarse ligeramente tóxico (DL₅₀ = 920.6±0.212 µg/ml). Los extractos de acetato de etilo de *A. potatorum* y *G. globosa* demostraron actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) con valores de CI₅₀ de 1.086±0.016 y 0.118±0.014 µg/ml, respectivamente. Estos extractos poseen actividad antioxidante, una concentración elevada de compuestos fenólicos y baja de flavonoides. El estudio por cromatografía en capa fina solo mostró la presencia de saponinas en ambas especies, el análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de fitosteroles y grasas para el extracto de acetato de etilo de *A. potatorum*, mientras que en el extracto de *G. globosa* se observaron fitoesteroles, aceites y compuestos fenólicos. Los resultados de este estudio demuestran que las plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento del cáncer como *A. potatorum* y *G. globosa*, pueden ser una fuente de compuestos con actividad citotóxica.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer comprende un grupo de enfermedades no transmisibles capaces de aparecer en cualquier parte del cuerpo, tienen en común el desarrollo de células anormales que se dividen y crecen sin control (Endrini & Suherman, 2015; OMS, 2016). Las células sanas pueden convertirse en células cancerígenas a través de seis alteraciones: señales de crecimiento muy activas, evasión de la apoptosis, pérdida de la capacidad de respuesta a las señales de anticrecimiento, liberación de sustancias al medio para la vascularización de tejidos, crecimiento replicativo ilimitado e invasión de tejidos y órganos (Schlaepfer & Mendoza, 2010). Las células cancerígenas han generado más de 100 tipos de cáncer, los más comunes son: colorrectal, hígado, ovario, próstata, pulmón, riñón, linfoma no Hodgkin, oral, orofaríngeo y mama (ASCO, 2014).

El cáncer de mama inicia como una enfermedad localizada en los ductos o lóbulos del seno, puede ser invasivo o no invasivo dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre. El cáncer de mamá es considerado de baja incidencia en el estado de Oaxaca, sin embargo, ocupa el cuarto lugar entre los tipos de cáncer causantes de defunciones en mujeres. Es por ello que se considera de suma importancia el diagnóstico oportuno y el empleo de un tratamiento adecuado.

Entre los tratamientos más utilizados para contrarrestar el cáncer de mama, se encuentra la quimioterapia. En este tipo de tratamiento se utilizan medicamentos cuyo precio puede hacerlos inaccesibles a quienes carecen de recursos monetarios y presentan mayores desventajas sociales, estos individuos han recurrido a alternativas para tratar el cáncer como las plantas utilizadas en medicina tradicional.

Una de las costumbres de la población oaxaqueña, es el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (ajo, caléndula, llantén), sin embargo; la efectividad de muchas de estas especies carece de sustento científico que valide o demuestre los posibles efectos de su consumo. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar si los extractos

de diferente polaridad, obtenidos a partir de cuatro plantas utilizadas en el estado de Oaxaca para el tratamiento del cáncer, poseen actividad citotóxica sobre *A. salina* y la línea celular de cáncer de mama MCF-7, además de discernir los grupos de compuestos presentes (cumarinas, fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, entre otros) que podrían estar relacionados a la actividad del extracto.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer de mama

2.1.1. Definición y origen

El cáncer de mama comprende un grupo heterogéneo de enfermedades donde las células del tejido mamario se desarrollan de forma anormal, creciendo y dividiéndose sin control (Figura 1), inicia como una enfermedad localizada en los ductos o lóbulos del seno que tiende a invadir los tejidos que lo rodean, así como órganos distantes (American Cancer Society, 2016; IMSS, 2017; International Agency for Research on Cancer, 2014).

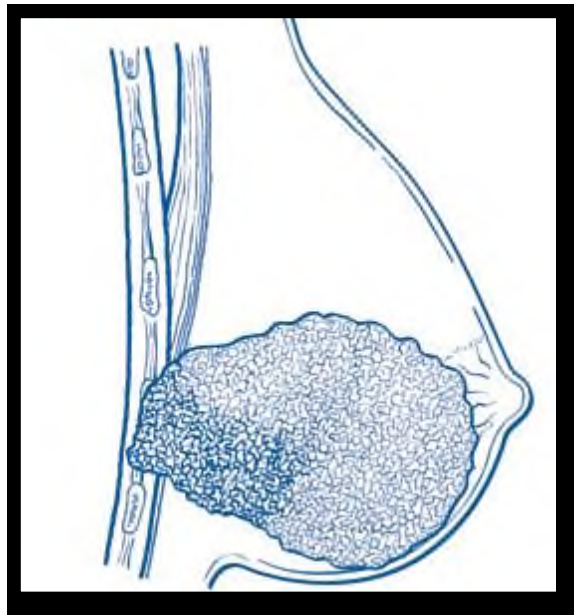


Figura 1: Tumor desarrollado en seno (American Cancer Society, 2009).

Existe la hipótesis de que las células epiteliales de la glándula mamaria pueden sufrir en un momento determinado un proceso irreversible de transformación celular, ya sea genético o funcional, convirtiendo las células sanas en cancerígenas. Esta transformación se puede producir en la división celular y transferirse durante la reproducción de las células,

incrementado el número de células malignas y posibilitando la formación de tumores (Torres & Ángeles, 2009). El origen del cáncer de mama se ha relacionado a diversos factores, entre los que se encuentran: alcoholismo, antecedente de cáncer de mama en parientes cercanos, densidad mamaria, edad tardía para el primer embarazo y menopausia, envejecimiento, exposición a radiaciones ionizantes durante el desarrollo o crecimiento, hábitos alimenticios en los que se incluyen un bajo consumo de fibra, consumo excesivo de carbohidratos, grasas animales y ácidos grasos trans; obesidad, sedentarismo, tabaquismo, terapia hormonal por periodos largos, no tener hijos, portar los genes BRCA1 o BRCA2 y vida menstrual temprana o tardía (Cárdenas *et al.*, 2013; Porter, 2009). Un porcentaje bajo del total de los casos de cáncer de mama se debe a factores genéticos, mientras que el 21% de todas las muertes por este tipo de cáncer en el mundo se atribuyen al consumo de alcohol, falta de actividad física, sobrepeso y obesidad (OMS, 2015).

2.1.2 Etapas

El cáncer de mama se desarrolla en una serie de etapas que llevan a la célula cancerígena a multiplicarse, formar tumores y propagarse en otras partes del cuerpo (NCI, 2012):

- Etapas iniciales
 - 0. Las células cancerígenas están en el revestimiento del ducto en el seno, no han invadido tejido mamario cercano o se han propagado fuera del ducto.
 - I. El tumor mamario no mide más de 2 centímetros y las células cancerígenas pueden o no encontrarse en los ganglios linfáticos.
- Etapa intermedia
 - II. El tumor mide de 2 a 5 centímetros y puede o no propagarse a los ganglios linfáticos.
- Etapas avanzadas
 - III. El tumor mamario no es mayor a 5 centímetros, afecta a los ganglios linfáticos axilares, pared torácica y/o piel.
 - IV. El tumor mamario puede ser de cualquier tamaño y las células cancerígenas se propagan a otras partes del cuerpo como los pulmones, hígado, huesos o cerebro.

2.1.3. Clasificación y tipos

El cáncer de mama puede clasificarse en: invasivo (las células cancerígenas se propagan a otros tejidos y órganos, si es detectado a tiempo puede ser removido, pero puede volverse a presentar) y no invasivo (no se propaga más allá de donde se origina, puede ser removido y usualmente no crece de nuevo). Existen diferentes tipos de cáncer de mama (Tabla 1), entre estos los más comunes son el carcinoma ductal y el carcinoma lobular (NCI, 2012).

Tabla 1: Tipos de cáncer de mama (American Cancer Society, 2016).

Tipo	Descripción
Carcinoma ductal	Cáncer no invasivo, inicia en células que se encuentran dentro de los ductos del seno.
Carcinoma lobular	Cáncer invasivo, comienza en células de los lóbulos del seno y se extiende a otras partes del cuerpo.
Cáncer inflamatorio de seno	Este tipo de cáncer hace que la piel se sienta caliente, gruesa y se vea roja; comprende del 1 al 3% de todos los casos cáncer de mama.
Enfermedad de Paget del pezón	Este tipo de cáncer es muy atípico. Inicia en los ductos del seno, se propaga a la piel del pezón y luego a la areola.
Tumor filoides	El tumor mamario se desarrolla en el tejido conectivo del seno. Estos tumores son atípicos, la mayoría de las veces son benignos.
Angiosarcoma	Este atípico tipo de cáncer comienza en células que se encuentran en vasos linfáticos o sanguíneos, cuando aparece en el seno usualmente se debe a tratamientos previos de 5 a 10 años de radiación.

2.1.4. Incidencia en el estado de Oaxaca

México es uno de los países donde el cáncer de mama se ha convertido en un problema creciente de salud pública, esto se debe a que cada año se detectan alrededor de 14, 000 casos nuevos (Narod, 2009). En el estado de Oaxaca, el cáncer de mama se considera un tipo de cáncer de baja incidencia; sin embargo, ocupa el cuarto lugar entre los tipos de cáncer causantes de defunciones en mujeres (Figura 2) (García *et al.*, 2011, INEGI 2005). Es por ello que el diagnóstico temprano y el uso de tratamientos adecuados desempeñan un papel importante para contrarrestar esta enfermedad.

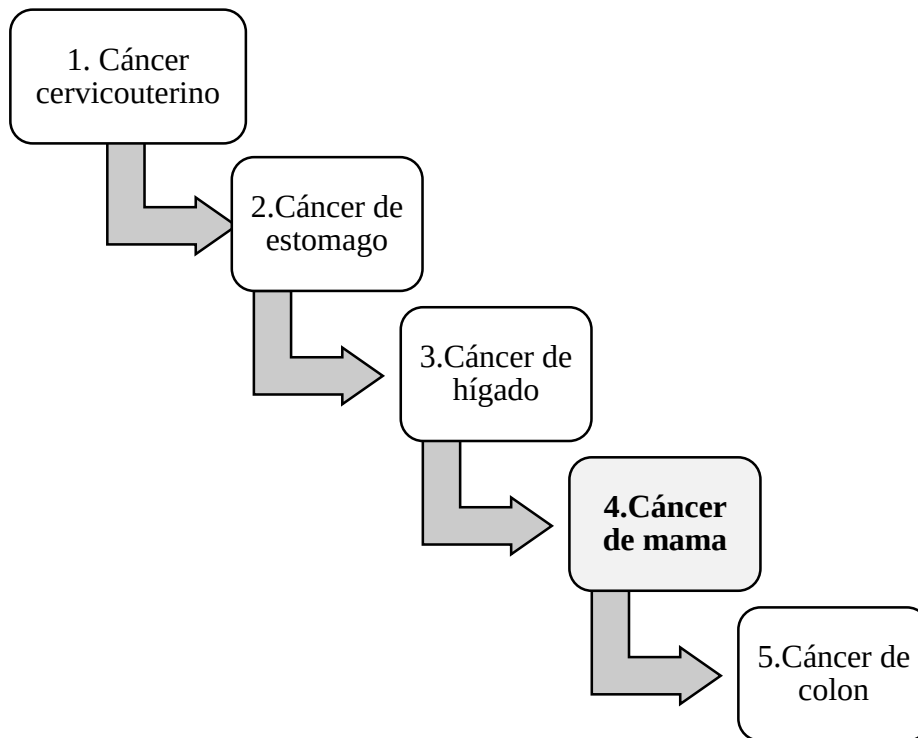


Figura 2: Tipos de cáncer de mayor frecuencia en mujeres de Oaxaca (Gómez *et al.*, 2016).

2.1.5. Tratamientos

Los pacientes con cáncer de mama requieren de múltiples cuidados, hospitales que cuenten con los equipos necesarios y un tratamiento adecuado (National Cancer Control Programme, 2015). En la actualidad existen diferentes tratamientos para el cáncer de mama (Figura 3), la selección de cada uno de estos y su uso, ya sea solo o en combinación con otro, depende de diversos factores: el tipo y etapa del cáncer, la edad, etapa hormonal y obesidad del paciente; la histología del tumor, las pruebas multigenes, características patológicas y clínicas del tumor, y la presencia o ausencia de enfermedad metastásica detectable (NCCN, 2015). El precio aproximado del tratamiento por año varía de acuerdo a la etapa del cáncer de mama: \$74,522.⁰⁰-\$102,042.⁰⁰ (etapa inicial), \$154,018.⁰⁰ (etapa intermedia) y \$199, 274.⁰⁰ (etapa avanzada), en promedio (Knaul *et al.*, 2009). La mayoría de estos tratamientos incluyen quimioterapia en combinación con otra técnica (WHO, 2010).

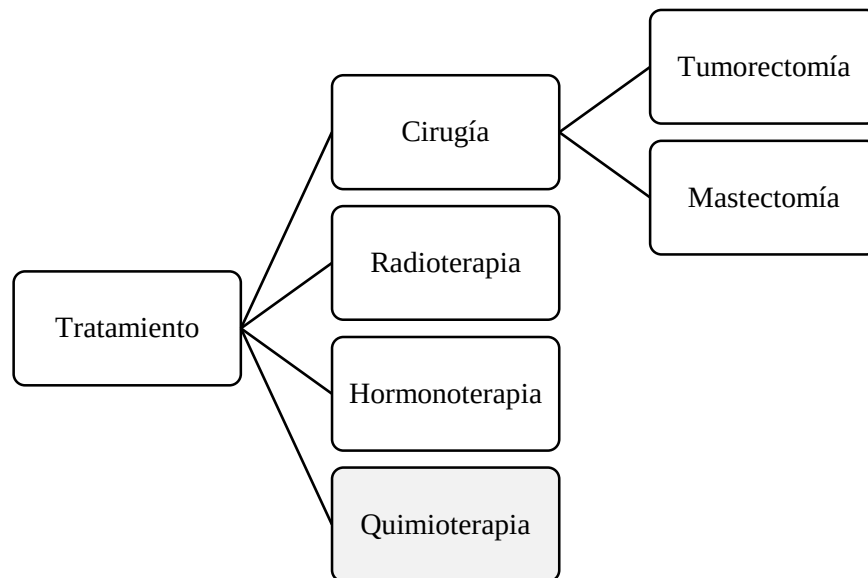


Figura 3: Tratamientos utilizados para cáncer de mama (NCCN,2015).

2.1.6. Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el uso de fármacos que destruyen las células a través de diferentes mecanismos (Tabla 2). Los fármacos que se fijan a la tubulina, agentes alquilantes y los antibióticos; son algunos de los más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama (Breastcancer, 2015).

Tabla 2: Tipos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer (Rodilla, 2016).

Tipo	Ejemplos
Fármacos antimetabolitos	Análogos del ácido fólico Análogos de las bases pirimidínicas
Fármacos que se fijan a la tubulina	Alcaloides de la vinca, Taxanos
Inhibidores de topoisomerasas	Irinotecán, Eltopotecán, Etopósido
Agentes alquilantes	Mostazas nitrogenadas, Nitrosoureas
Cis-platino	Actúa preferentemente sobre las bases del ADN
Antibióticos	Antraciclinas, Bleomicinas
L-Asparaginasa	Enzima que hidroliza la asparagina en ácido aspártico y amoníaco
Hormonas	Antiestrógenos, Antiandrógenos
Modificadores de la respuesta biológica	Citocinas, Interferones

A pesar de ser el tratamiento más empleado y contar con fármacos utilizados contra el cáncer de mama, la quimioterapia presenta ciertas desventajas, entre las que se encuentran: un alto costo y uso de medicamentos no específicos. Es por ello que continúa la búsqueda de nuevas fuentes de metabolitos con actividad anticancerígena, que puedan utilizarse en la formulación de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama.

2.2 Medicina tradicional, alternativa para el tratamiento del cáncer

El cáncer de mama aparece en mujeres de cualquier nivel social, económico y étnico; sin embargo, quienes carecen de recursos monetarios y presentan mayores desventajas sociales, suelen ser los más vulnerables e incapaces de seguir un tratamiento debido al alto costo de estos, es por ello que deben recurrir a alternativas como la medicina tradicional (Lozano *et al.*, 2009; Nigenda *et al.*, 2009). En la actualidad, más del 80% de la población de países en desarrollo y subdesarrollados depende de la medicina tradicional para cubrir el déficit de atención médica y medicamentos (Ioanis *et al.*, 2015). Uno de los recursos más empleados en medicina tradicional son las plantas. Existen reportes del uso de estas en la época precolombina, desde ese tiempo a la actualidad, el número de especies vegetales que se utilizan para el tratamiento de enfermedades ha incrementado. Las plantas medicinales poseen sustancias o principios activos que pueden servir como precursores de nuevos fármacos. Estas plantas están realizando un aporte importante en el enriquecimiento de la medicina convencional, siendo útiles para tratar diversas enfermedades como el cáncer (Vides & Álvarez, 2013).

Las plantas medicinales se han utilizado para la prevención, tratamiento del cáncer y para contrarrestar los efectos secundarios ocasionados por las terapias convencionales en diferentes partes del mundo (Hanks, 2000; Agrawal & Pandey, 2013). Estas plantas han presentado actividad inmunomoduladora (estimulan la inmunidad innata y protegen la médula ósea contra el efecto de la quimioterapia mielosupresora) y quimiopreventiva (inducen la apoptosis y son capaces de inhibir o retardar la tumorigénesis a partir de distintos

mecanismos como: inhibición de la síntesis de ADN y ARN, inhibición de la topoisomerasa II o inhibición de las reacciones en cadena de los radicales libres) (Safarzadeh *et al.*, 2014).

Las plantas se administran en personas con cáncer con el fin de cumplir algunos de los siguientes objetivos (Lam, 2003):

- La prevención primaria del cáncer (Antes de la aparición del cáncer)
- La prevención secundaria del cáncer (Después de eliminar el cáncer para evitar la reaparición de este)
- Reducir los efectos secundarios que dan como resultado las terapias convencionales (quimioterapia o radioterapia)
- Mejorar el sistema inmune
- Servir como tratamiento complementario a enfermos terminales

Hoy en día se cuenta con datos de más de 3000 plantas que poseen propiedades contra el cáncer, dicha información se ha utilizado para la búsqueda e identificación de metabolitos con actividad anticancerígena y/o citotóxica (Balachandran & Govindarajan, 2005).

2.2.1. Metabolitos presentes en plantas con actividad anticancerígena y citotóxica

Existe una amplia variedad de metabolitos que poseen actividad anticancerígena y citotóxica, por ejemplo: fenoles, flavonoides, alcaloides, entre otros (Figura 4). La distribución y concentración de los metabolitos en las plantas varía de acuerdo a su metabolismo y al sitio en el que estas se encuentran. Además de la actividad contra el cáncer algunos metabolitos pueden presentar actividad antiinflamatoria, antioxidante, entre otras (Safarzadeh *et al.*, 2014).

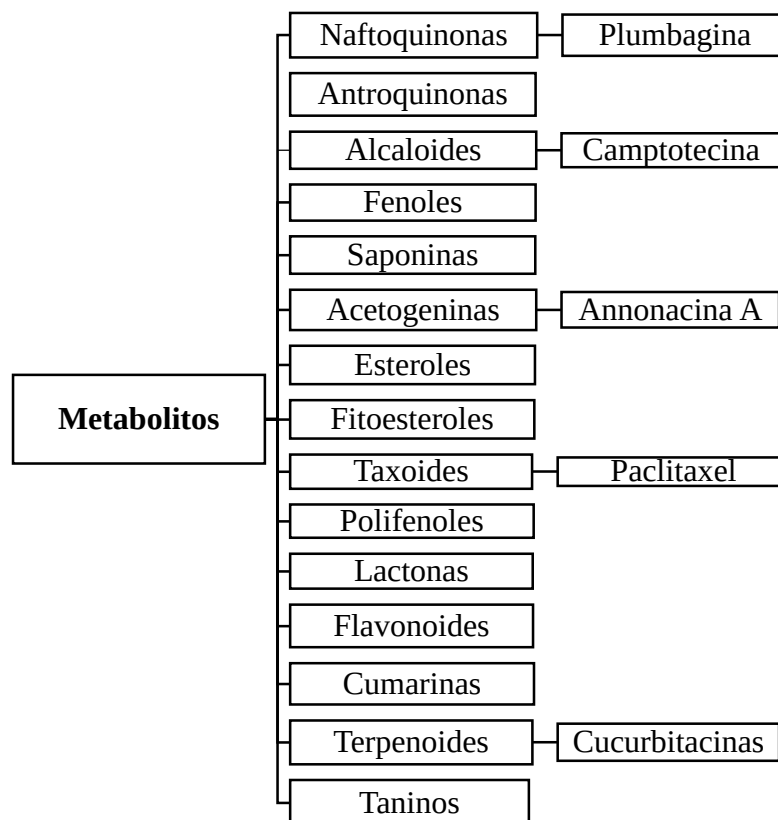


Figura 4: Metabolitos con actividad anticancerígena y/o citotóxica (Bhanot *et al.*, 2011).

2.2.1.1. Antioxidantes, metabolitos presentes en plantas medicinales y su actividad contra el cáncer.

El daño oxidativo de las células causado por los radicales libres, en particular el daño al ADN, puede llevar al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer. Existen evidencias de que el estrés oxidativo participa en algunos tipos de carcinogénesis, causando al menos 100 diferentes tipos de lesiones oxidativas en el ADN (García *et al.*, 2013). La carcinogénesis es un proceso complejo que consta de tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión. Las especies reactivas de oxígeno “ROS” pueden intervenir en las tres etapas incrementando el daño de la célula y acelerando la formación de tumores. Las células que conforman estos tumores sufren cambios metabólicos como el aumento en la producción de peróxido de hidrógeno y una disminución significativa de sistemas antioxidantes (Fuchs, 2013; Zorrilla *et al.*, 2004).

Los antioxidantes son considerados uno de los grupos de compuestos de gran importancia para el tratamiento del cáncer presentes en las plantas, esto se debe al papel que desempeñan como agentes anticancerígenos. Han mostrado potencial para suprimir y reducir el desarrollo del cáncer mediante la neutralización de los radicales libres, impidiendo que estos dañen el ADN de células sanas y que el proceso de carcinogénesis continúe en algunos casos (Bennett *et al.*, 2012). Algunos antioxidantes obtenidos de plantas se utilizan para el tratamiento del cáncer, entre los que se encuentran: vitamina C, B17 y E; resveratrol, betacaroteno, ácido α -lipóico, licopeno, carotenoides, luteolina, ácido rosmarínico y algunos compuestos fenólicos (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Venket & Agarwal, 2000; Yalko *et al.*, 2006). La presencia de metabolitos con actividad antioxidante y anticancerígena se ha corroborado actualmente en una gran cantidad de plantas medicinales (Muñoz & Gutiérrez, 2008).

2.2.2. Metabolitos de plantas medicinales, mecanismo de acción y presencia en la industria farmacéutica.

Los metabolitos aislados de plantas medicinales actúan a través de diferentes mecanismos: desordenando las señales en las vías de transducción celular, alterando el ciclo celular, induciendo la acción antioxidante, estimulando mecanismos de reparación del ADN, interfiriendo en los microtúbulos e inhibiendo las topoisomerasas (Alam *et al.*, 2013; Safarzadeh *et al.*, 2014).

En la actualidad, es posible encontrar estos metabolitos bajo un nombre comercial, algunos de los más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama son: Vinorelbina, Paclitaxel, Topotecán y Camptotecina (Tabla 3) (Breastcancer, 2015). Sin embargo, la mayor parte de los compuestos activos en los extractos de las plantas medicinales que se han estudiado permanecen aún sin identificar, su presencia se ha logrado detectar mediante pruebas biológicas (Pehlivan *et al.*, 2012).

Tabla 3: Metabolitos aislados de plantas en el mercado (Schlaepfer & Mendoza, 2010).

Metabolitos	Mecanismo de acción	Fuente Natural
Alcaloides de la vinca:		
Tipo A: Vinblastina, Vincristina y Vindesina.	Son específicos del ciclo celular, bloquean las células que se encuentran en mitosis.	Vincapervinca de Madagascar (<i>Catharanthus roseaus</i>)
Tipo B: Vinorelbina		
Taxanos: Paclitaxel y Docetaxel	Se ligan a la subunidad β de la tubulina, bloqueando las células que se encuentran en mitosis.	Corteza del tejo (<i>Taxus brevifolia</i>)
Epipodofilotoxinas: Tenopósido y Etopósido	Se ligan a la tubulina pero ejercen su acción citóxica a través de inhibición de la topoisomerasa II.	Raíz de mandrágora (<i>Podophyllum peltatum</i>)
Camptotecinas: Camptotecina, Topotecán y Rintotecán	Inhiben la función de las topoisomerasas I y II.	Árbol chino (<i>Camptoteca acuminata</i>)

2.2.3. Estudios en plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento del cáncer mama

Los extractos obtenidos de plantas utilizadas en diferentes partes del mundo para el tratamiento del cáncer de mama se han evaluado mediante estudios *in vitro* (Tabla 4), los resultados obtenidos han demostrado que estos extractos presentan actividad citotóxica y antioxidante (Nassr-Allah *et al.*, 2009).

Tabla 4: Estudios de citotoxicidad en plantas utilizadas en medicina tradicional

Especie	Uso medicinal	Extracto	Línea celular	CI₅₀ (µg/ml)	Actividad Antioxidante (CI₅₀ µg/ml)	Referencia
<i>Artocarpus altillis</i>	Purgante	Metanólico (corteza)	T-47D	6.19	140.54	Arung <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichillia hirta</i> L.	Antitumoral Antiúlceras	Acuoso (hojas)	T-47D	30	-----	Hernández <i>et al.</i> , 2012
<i>Azadirachta indica</i>	Ictericia Antiúlceras	Etanólico (fruto)	MCF-7	22.0	80	Ávalos, 2014; Nahak & Sahu, 2010.
<i>Annona squamosa</i>	Supuración de tumores malignos	Etanólico (flores)	MCF-7	6.87	-----	Sumithra, 2014.
<i>Castilleja tenuiflora</i>	Inflamación Fertilidad	Metanólico	MCF-7	9.53	1259	Moreno <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bacopa monnieri</i>	Alergias	Hexánico Metanólico	MCF-7	>20	789	Moreno <i>et al.</i> , 2011.
<i>Petiveria alliacea</i>	Abortivo Anticáncer	Acuoso Butanólico	MCF-7	23.4 6.6	254.54	Pérez <i>et al.</i> , 2006.
<i>Theobroma cacao</i>	Inflamación	Metanólico (hojas)	MCF-7	41.4	433.3	Baharum <i>et al.</i> , 2014.

El cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en los estudios mencionados en la tabla 4, permitió determinar si extractos de plantas utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama (T-47D y MCF-7), considerando como extracto con actividad a aquel que presenta un valor de CI₅₀ menor o igual a 20 µg/ml de acuerdo a los criterios establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos. Los resultados obtenidos en estos estudios sitúan a las plantas medicinales como una fuente viable para la obtención de metabolitos con actividad citotóxica, estos metabolitos podrían ser útiles en el tratamiento del cáncer de mama.

2.2.4. Plantas utilizadas en medicina tradicional mexicana para el tratamiento del cáncer y sus síntomas

México cuenta con una gran riqueza vegetal, posee más de 30,000 especies de plantas vasculares cuyo uso principal es medicinal y de alimento (Ghenó, 2010). Se calcula que la flora mexicana contiene entre 3000 y 5000 plantas con potencial terapéutico, de las cuales solo se ha estudiado y caracterizado el principio activo de un 5% (Esquivel *et al.*, 2012). Más del 90% de la población mexicana hace uso de plantas medicinales para el tratamiento empírico de varias enfermedades, entre estas el cáncer (Alonso *et al.*, 2011). Existen registros de más de 300 especies de plantas utilizadas en México para el tratamiento del cáncer, de las cuales 119 especies son utilizadas de forma empírica y sólo 181 se han analizado de forma experimental (Alonso *et al.*, 2011). Uno de estos estudios lo realizaron Vega *et al.* en el 2009, ellos determinaron la actividad citotóxica de cuatro plantas medicinales nativas de México (*Ibervillea sonora*, *Cucurbita ficifolia*, *Tagetes lucida* y *Justicia spicigera*) utilizadas en el tratamiento de diferentes enfermedades, los extractos de estas especies se evaluaron mediante el ensayo de la Sulforodamina B en dos líneas celulares: cáncer de mama (T-47D) y cáncer cérvico-uterino (HeLa). El extracto etanólico de *J. spicigera* mostró el mejor efecto citotóxico, validando el uso popular que posee en el tratamiento de cáncer. Resultados similares a estos han permitido a los investigadores justificar la necesidad de incrementar el número de estudios *in vitro* e *in vivo* de plantas mexicanas (Estanislao *et al.*, 2016).

2.2.4.1. Plantas medicinales de Oaxaca para el tratamiento del cáncer

Oaxaca cuenta con una amplia variedad de plantas que son utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento del cáncer, algunas de estas cuentan con estudios que demuestran su actividad como: el ajo, la caléndula y el llantén (Méndez *et al.*, 2009). Sin embargo, existen plantas que aún carecen o cuentan con pocos estudios, por ejemplo: espinazo del diablo, mirto, cresta de gallo, violeta, pájaro bobo, guaguatón, chamizo del río, borreguillo (Cervantes & Valdés, 1990; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Los censos y estudios botánicos han permitido conocer las plantas medicinales que hay en el estado, pero no demuestran si estas presentan algún tipo de actividad, para ello es necesario realizar ensayos de valoración de citotoxicidad (Mercado, 2013).

2.3. Valoración de la citotoxicidad

La citotoxicidad comprende las alteraciones causadas en las funciones celulares que dan lugar a la producción de un daño que es capaz de detectarse a través de pruebas *in vitro* que permiten predecir efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos (Rodeiro *et al.*, 2004). Estas pruebas *in vitro* cumplen con características como: ser simples, rápidas, eficientes, económicas, reproducibles, sensibles, seguras, efectiva en la medida de la población celular viable, además de no mostrar interferencia con el compuesto a evaluar (Escobar *et al.*, 2010). Estas pruebas utilizan como modelos experimentales organismos simples, cultivos primarios, órganos aislados y líneas celulares establecidas. El tamizaje de productos de origen natural con potencial actividad citotóxica se realiza a través de ensayos preliminares utilizando a *Artemia salina* y líneas celulares procedentes de tumores humanos (Flores, 2009).

2.3.1. Ensayo preliminar con *Artemia salina*

Artemia salina es un crustáceo pequeño que habita en agua salada. En su etapa adulta alcanza un tamaño de aproximadamente 1 cm, sus huevos poseen una cubierta dura e impermeable además de la cubierta normal, dicha característica permite que resistan deshidratación extrema y puedan permanecer inactivos durante años (Castro *et al.*, 2009; Parra *et al.*, 2001).

A. salina es uno de los biomodelos más utilizados en los ensayos preliminares de toxicidad, es fácil de cultivar y manipular en el laboratorio, también es sensible a una gran variedad de tóxicos. El ensayo se basa en la posibilidad de causar la muerte de este crustáceo cultivado en laboratorio en su etapa larvaria (nauplios), es utilizado para evaluar la toxicidad de extractos de plantas y químicos, la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, y predecir la citotoxicidad de compuestos puros (Dumitrascu, 2011; Fernández *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2012; Pino & Jorge, 2011). En este ensayo se determina la dosis letal y el tipo de toxicidad del extracto (aguda, intermedia, nula), sin embargo, los valores obtenidos no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular, solo sirven de orientación para estudios más específicos como los realizados en líneas celulares (Ponce *et al.*, 2007; Sánchez & Neira, 2005).

2.3.2. Ensayos en líneas celulares

Las líneas celulares son ampliamente utilizadas para realizar pruebas de toxicidad *in vitro* debido a que resultan más económicas y fáciles de manejar respecto a los cultivos celulares primarios (Garza, 1990). Las líneas celulares son células de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en cultivo y que poseen capacidad de proliferación ilimitada (Castro, 2006). Estas líneas en conjunto con un ensayo de citotoxicidad adecuado permiten obtener resultados replicables y seguros. Existe una amplia variedad de líneas celulares para cada tipo de cáncer, las líneas T-47D y MCF-7 son unas de las más utilizadas para estudios en cáncer de mama.

2.3.2.1. Línea celular de cáncer de mama MCF-7

La línea celular MCF-7 se estableció en 1970 a partir de tejido de cáncer de seno derivado de un sitio metastásico de una mujer de 69 años. Las células son epiteliales adherentes con una densidad de siembra de 4×10^4 células/cm² y duplican su población en aproximadamente 38 h. Esta línea celular es una de las más utilizadas en ensayos *in vitro* enfocados al estudio y tratamiento del cáncer de mama, debido a que conserva características del epitelio mamario

diferenciado entre las que se incluyen: la capacidad de acumularse y formar monocapas (ATCC, 2012; ATCC 2013; ATCC, 2016).

2.3.2.2. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares

En la actualidad, se cuenta con diversos tipos de ensayos *in vitro* para determinar la actividad citotóxica de los extractos (Chanda & Nagani, 2013):

- Ensayo de exclusión del colorante azul de tripano.- Es la prueba más utilizada para determinar viabilidad celular. Las células viables no toman color mientras que las células muertas se colorean. Sin embargo, si se mantiene demasiado tiempo las células vivas pueden tomar color.
- Ensayo de la deshidrogenasa láctica.- Se mide por espectrofotometría en el medio de cultivo y en los lisados celulares a 340 nm, analizando la reducción del NADH durante la transformación de piruvato a lactato.
- Ensayo MTT.- Se basa en la conversión de la sal amarilla de tetrazolio, a cristales púrpura de formazán por células activas metabólicamente, proporciona una determinación cuantitativa de las células viables.
- Ensayo XTT.- Este ensayo es usado para medir la respuesta de proliferación. Es especialmente útil en la cuantificación de células viables. Esta designado para la cuantificación espectrofotométrica de crecimiento y viabilidad celular.
- Ensayo de Sulforodamina B (SRB).- Es un colorante rosa brillante aniónico que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas de las células cancerosas que han sido previamente precipitadas con ácido tricloroacético (Pérez, 2006). La unión se da en la base de los aminoácidos en condiciones acidas leves y se disocia bajo condiciones básicas.

Los ensayos presentan diferentes ventajas y desventajas (tabla 5), sin embargo, el ensayo de la Sulforodamina B destaca debido a que no da resultados negativos falsos.

Tabla 5: Ventajas y desventajas de ensayos de citotoxicidad (Arencibia *et al.*, 2003; Flores, 2009).

Ensayo	Ventajas	Desventajas
Captación del rojo neutro (NR)	Simple, preciso y altamente reproducible.	Falsos positivos debido a detergentes y precipitación del NR.
Enlazamiento al azul de kenacid (KB)	Detecta compuestos capaces de inhibir tasa de crecimiento celular.	Distribución irregular de las células afecta el resultado.
Reducción del MTT	Mayor facilidad y reproducibilidad respecto a KB y NR.	No determina efecto citotóxico o citostático.
XTT	Producto soluble en agua, facilita realizar el ensayo.	Falsos positivos, sensible a la formación de superóxido.
Sulforodamina B (SRB)	No arroja falsos negativos	TCA que se añade puede separar las células.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama ocupa el cuarto lugar en el estado de Oaxaca entre los tipos de cáncer que causan la muerte en mujeres, es por ello que se considera un problema de importancia para el sector salud. El precio de los tratamientos para contrarrestar esta enfermedad es elevado, limitando la posibilidad de acceder a estos a la población más vulnerable que debe valerse de alternativas como la medicina tradicional, utilizando productos elaborados de plantas para la prevención, tratamiento del cáncer y para contrarrestar los efectos secundarios ocasionados por las terapias convencionales. En Oaxaca se han realizado estudios y censos para conocer la variedad de plantas medicinales que se encuentran en el estado y se utilizan para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como el de mama, sin embargo, en gran número de estos estudios no queda demostrada realmente la actividad biológica de estas plantas.

El conocimiento de médicos tradicionales oaxaqueños acerca de las especies que se utilizan en el estado para el tratamiento del cáncer y sus síntomas, es valioso, ya que puede favorecer la selección de aquellas especies que podrían presentar actividad y carecen o cuentan con pocos estudios citotóxicos.

La evaluación de la actividad citotóxica y antioxidante, además de conocer los grupos de compuestos que presentan los extractos de las plantas medicinales oaxaqueñas, permitirá corroborar su uso en medicina tradicional y determinar si estas son una alternativa viable para el desarrollo a futuro de nuevos medicamentos herbolarios e incluso fármacos para el tratamiento del cáncer de mama.

4. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos, metanólicos, de acetato de etilo y hexánicos obtenidos de *Agave potatorum*, *Selaginella lepidophylla*, *Rhamnus purshiana* y *Gomphrena globosa* tienen toxicidad hacia *Artemia salina* y citotoxicidad en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica y antioxidante de extractos de plantas medicinales (*Agave potatorum*, *Selaginella lepidophylla*, *Rhamnus purshiana* y *Gomphrena globosa*) utilizadas en el estado de Oaxaca.

5.2. Objetivos Particulares

- Seleccionar las especies vegetales.
- Evaluar la actividad citotóxica de cada uno de los extractos mediante el ensayo preliminar de *Artemia salina* y mediante el ensayo *in vitro* de la Sulforodamina B (SRB) sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos mediante el método DPPH *in situ*, DPPH y ABTS.
- Cuantificar los compuestos fenólicos y flavonoides además de determinar los compuestos presentes en los extractos por cromatografía en capa fina y mediante un análisis fitoquímico preliminar.

6. METODOLOGÍA

6.1. Estrategia experimental

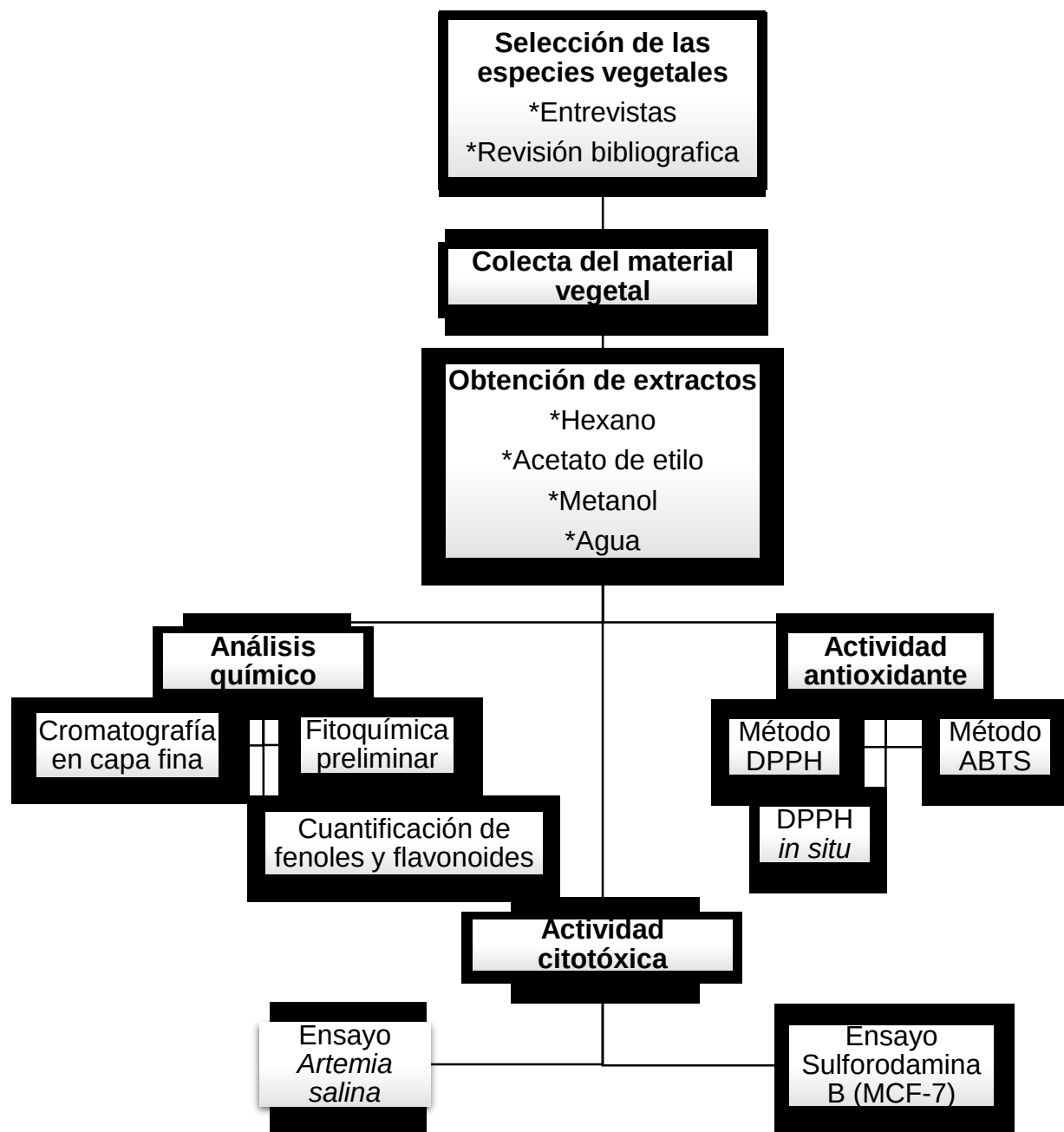


Figura 5: Diagrama de la estrategia experimental realizada.

6.2. Selección de las especies vegetales

La selección de las especies vegetales a estudiar se llevó a cabo mediante la aplicación de entrevistas y revisión bibliográfica.

6.2.1. Entrevistas.

Con el fin de conocer las especies vegetales más utilizadas para el tratamiento del cáncer y sus síntomas en el estado de Oaxaca, se encuestó a habitantes de la región de La Chinantla (San José Chiltepec, San Juan Bautista Tuxtepec, San Juan Bautista Valle Nacional) y la región de la Cañada (Cuicatlán y Huautla). Las entrevistas se realizaron durante el mes de agosto del 2016 utilizando un cuestionario que comprendía preguntas abiertas y cerradas enfocadas en el tema de investigación (Anexo 1). Se realizó un muestreo intencional, no probabilístico, seleccionando como informantes estratégicos a aquellos habitantes dedicados a la medicina tradicional.

6.2.2. Revisión bibliográfica.

A partir de la información obtenida en las entrevistas se realizó la revisión bibliográfica de cada una de las especies mencionadas por los médicos tradicionales. La selección de las especies vegetales se llevó a cabo considerando los siguientes rubros:

- Facilidad de colecta durante el año.
- Colección en cualquier etapa de desarrollo.
- Uso para un tipo específico de cáncer.
- Actividad relacionada.
- Uso de órgano específico de la planta.
- Uso combinado con otra planta.
- Dosis asignada.
- Número de médicos tradicionales que la recetan.
- Estudios previos de actividad citotóxica y antioxidante.

6.3. Colecta del material vegetal

La colecta de la planta completa del maguey de papalomé (*Agave potatorum*) (Figura 6) y la doradilla (*Selaginella lepidophylla*) (Figura 7) se realizó en el mes de septiembre de 2016, en la comunidad de Macuixóchitl de Artigas Carranza, Oaxaca; ubicada a una latitud norte de 17°00'15" y una longitud oeste de 96°32'37" (Figura 8).



Figura 6: *Agave potatorum*



Figura 7: *Selaginella lepidophylla*

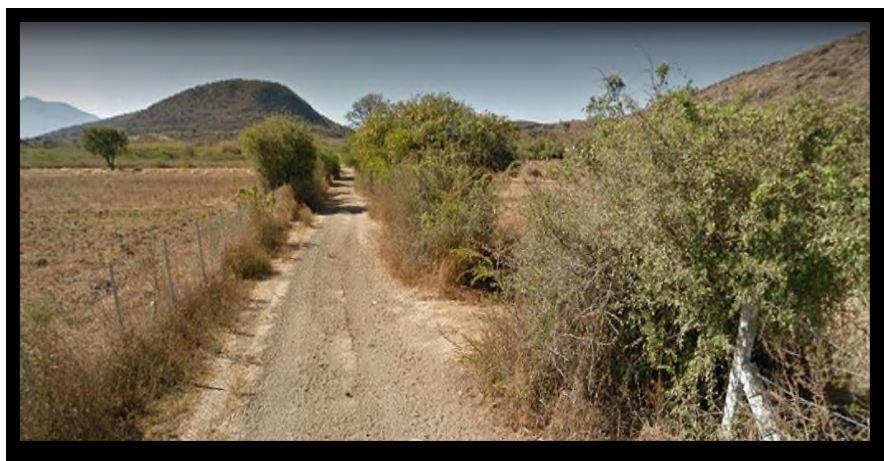


Figura 8: Sitio de colecta en la comunidad de Macuixóchitl

La corteza del árbol de la cascara sagrada (*Rhamnus purshiana*) (Figura 9) se adquirió en la tienda naturista “San Rafael”, ubicada en el mercado de abastos de la ciudad de Oaxaca, Oaxaca. La parte aérea del amaranto globo (*Gomphrena globosa*) se obtuvo en el mes de

noviembre de 2015 de un cultivo en la comunidad de San Jacinto Ocotlán, Oaxaca; ubicada a una latitud norte 16°80'72" y una longitud oeste de 96°70'58".



Figura 9: *Rhamnus purshiana* (cáscara)

El material vegetal (doradilla, cascara sagrada y amaranto globo) se secó bajo sombra a temperatura ambiente. El maguey de papalomé se cortó en pequeños trozos, se liofilizó y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

6.4. Obtención de los extractos

El material vegetal seco de cada especie fue molido, pesado y macerado durante 24 h a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) con solventes de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo, metanol y agua (Tabla 6).

Tabla 6: Material vegetal utilizado por especie

Especie vegetal	Masa (g)	Volumen de solvente (L)
<i>A. potatorum</i>	66.138	0.5
<i>R. purshiana</i>	300	1
<i>S. lepidophylla</i>	300	1.5
<i>G. globosa</i>	110	0.732

Las cuatro fracciones obtenidas en gradiente de polaridad para cada una de las especies se filtraron en papel Whatman N° 1, recuperando el solvente y el material vegetal por separado. El solvente filtrado se retiró con un evaporador rotatorio a 40 °C y 80 rpm. Los extractos obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol terminaron de concentrarse a temperatura ambiente mientras que los extractos acuosos se liofilizaron. Los extractos concentrados fueron pesados para obtener el rendimiento y almacenados a temperatura ambiente hasta su uso (Capataz, 2007).

6.5. Actividad citotóxica

6.5.1. Ensayo *Artemia salina*

En este trabajo el ensayo se realizó de acuerdo a la metodología establecida por Leos *et al.* (2016), con algunas modificaciones. Se pesaron 0.1 g de huevos de *A. salina* y se preparó agua de mar sintética (NaCl 0.5%). Los huevos se depositaron en el agua y se hidrataron durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se colocó el agua con los huevos de *A. salina* en una cámara de eclosión con un lado oscuro y otro iluminado por un foco de 30 W, el sistema se mantuvo con aireación constante a una temperatura de 25 °C.

Después de la eclosión, los nauplios permanecieron en las mismas condiciones durante 48 h (Anexo 2).

En una microplaca de 96 pozos se colocaron: 100 µL de agua de mar sintética, 10 nauplios y 100 µL de los extractos a concentraciones de: 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/ml. Se utilizó como control negativo agua de mar artificial y como control positivo KMnO₄ a 400 µg/ml. Cada extracto y control se colocó por triplicado.

Las microplacas fueron incubadas bajo el foco de 30 W durante 24 h a 25 °C, transcurrido el tiempo de incubación, se contaron los nauplios muertos utilizando un microscopio estereoscópico y se determinó la DL₅₀ (Dosis Letal media) por análisis estadístico PROBIT, utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.

Los extractos se consideraron: no tóxicos para valores superiores a 1000 µg/ml, ligeramente tóxicos para valores menores a 1000 pero mayores a 500 µg/ml y tóxicos para valores menores a 500 µg/ml.

6.5.2. Ensayo Sulforodamina B

Los extractos de cada una de las especies se solubilizaron en DMSO al 100%, obteniéndose soluciones a 4 mg/ml. Estas soluciones stock se utilizaron para preparar las diluciones a las siguientes concentraciones: 20, 4, 0.8, 0.016 µg/ml.

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Anexo 3) se cultivó en frascos de cultivo de tejido animal T-25 con medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, hasta alcanzar 100% de confluencia celular.

Las células se despegaron de los frascos de cultivo utilizando 0.5 ml de tripsina-EDTA 1X, se añadió 4.5 ml de medio RPMI-1640/SFB-10%, se mezcló hasta obtener una suspensión celular homogénea y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer, ajustando la cantidad de células de acuerdo al volumen de medio necesario para inocular los pozos y la densidad celular de la línea (MCF-7: 4×10^4 cel/ml).

Se colocaron 190 µL de medio con células más 10 µL de muestra (extracto, control o blanco) en los pozos de la microplaca. Se utilizó como blanco DMSO al 10% y como controles Paclitaxel y camptotecina (Anexo 4); estos se colocaron en microplacas distintas a las de los extractos. Las microplacas se incubaron a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad durante 72 h. En una microplaca diferente se colocó medio con células en 24 pozos y se incubó a las condiciones mencionadas durante 30 min, esta microplaca se consideró como el día cero.

Las células se fijaron con 100 µL de TCA al 30% frío y se incubaron a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se lavó tres veces cada microplaca con agua destilada fría y se secaron a temperatura ambiente. Se comprobó que los pozos estuvieran secos y se añadió a cada uno

de ellos 50 µL de SRB, las microplacas se incubaron a 4 °C durante 30 min; transcurrido este tiempo, se desechó en un frasco la SRB, se realizaron tres lavados con ácido acético 1% y se secaron a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 200 µL de Tris-base a cada pozo. Las placas permanecieron en reposo durante 2 h.

Las lecturas se realizaron en un lector ELISA a una longitud de onda de 490 nm. El valor de la CI₅₀ para cada uno de los extractos se determinó realizando un análisis de regresión lineal, graficando el porcentaje de sobrevivencia (1) respecto a la concentración de las muestras (Sanchez *et al.*, 2013).

$$(1). \%Sobrevivencia = \frac{DO(células\ muertas) - DO(día\ cero)}{DO(blanco) - DO(día\ cero)} \times 100$$

6.6. Actividad antioxidante

6.6.1. DPPH (α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo) *in situ*

La actividad antioxidante de los extractos se detectó mediante un ensayo preliminar por cromatografía en capa fina utilizando la técnica del DPPH, de acuerdo a la metodología propuesta por Raja *et al.* (2010). Para ello, se prepararon soluciones de los extractos y el control a una concentración de 17 mg/ml. Los extractos de té verde comercial preparados con hexano, acetato de etilo, metanol y agua; se utilizaron como control positivo.

Se aplicaron 5 µl (0.085 mg peso seco) de cada una de los extractos en el borde inferior de placas cromatográficas de sílica gel 60 (F₂₅₄ Merck) de 5x5 cm, para la separación de los compuestos se utilizó una fase móvil de acetato de etilo, metanol y agua (100:13.5:10). Las placas fueron rociadas con una solución 0.2% de DPPH en metanol.

Se consideró positivo para antioxidantes la presencia de bandas de color amarillo brillante en los carriles en contraste con el fondo morado de la placa.

6.6.2. Ensayo de captación del radical DPPH•

La actividad antioxidante de los extractos se determinó utilizando una solución del radical DPPH en metanol a una concentración de 0.025 g/L, de la cual se tomó un volumen de 497.5 µl y se añadió 2.5 µl de cada extracto.

La curva de calibración se realizó con trolox a partir de una solución a 0.25 mg/ml (Anexo 5), como blancos se utilizaron agua, metanol, acetato de etilo y hexano.

La cinética se llevó a cabo durante 10 min utilizando los extractos a una concentración de 17 mg/ml, el resultado se expresó en equivalentes de trolox (ET) por peso seco. Posteriormente, se calculó la CI_{50} graficando el porcentaje de inhibición (2) respecto a las diferentes concentraciones analizadas por extracto vegetal. Todas las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 515 nm por triplicado (Kuskoski *et al.*, 2005).

$$(2). \%Inhibición = \frac{AB - AM}{AB} \times 100$$

6.6.3. Ensayo de captación del radical ABTS⁺

La determinación de la actividad antioxidante se realizó con el radical ABTS⁺, obtenido tras la reacción durante 16 h en oscuridad a 25 °C de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM. Transcurrido el tiempo de incubación, la solución ABTS⁺ se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.05 a 734 nm.

Las lecturas se realizaron por triplicado utilizando 487.2 µl de la solución ABTS⁺ y 12.8 µl de muestra. La curva de calibración (Anexo 6), blancos, extractos, condiciones de la cinética y cálculo de la CI_{50} se realizó de forma similar al ensayo DPPH (Kuskoski *et al.*, 2005).

6.7. Análisis químico

6.7.1. Análisis fitoquímico preliminar

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar para la detección de grupos de compuestos secundarios. En la determinación de flavonoides y cumarinas se utilizó la metodología propuesta por Patil & Deshmukh (2016). La determinación de alcaloides, carbohidratos, saponinas, proteínas, fitoesteroles, aceites, grasas y compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Raaman (2006).

Flavonoides: Se colocó 1ml de extracto y 1 ml de acetato de plomo al 10% en un tubo de ensayo de 5 ml. La presencia de coloración amarilla se consideró como reacción positiva para flavonoides.

Cumarinas: Se colocó 2 ml de extracto y 3 ml de hidróxido de sodio al 10% en un tubo de ensayo de 5 ml. La presencia de coloración amarilla se consideró como reacción positiva para cumarinas.

Alcaloides: 50 mg de extracto se disolvieron en 2 ml de ácido clorhídrico y se filtraron.

Prueba de Mayer.- 1 ml de extracto se colocó en un tubo de ensayo y se le añadieron 20 µl del reactivo Mayer (Anexo 10). Se consideró como reacción positiva para alcaloides la observación de un precipitado color blanco o crema.

Prueba de Wagner.- 1ml de extracto se colocó en un tubo de ensayo y se le añadieron 20 µl del reactivo Wagner (Anexo 11). La observación de un precipitado rojo a café se consideró como reacción positiva para alcaloides.

Carbohidratos: 20 mg de extracto de extracto se disolvieron en 1 ml de agua y se filtraron.

Prueba de Fehling.- 1 ml de extracto se calentó en un baño de agua con 1ml de cada solución de Fehling (A y B, Anexo 12). La presencia de azúcares es indicada por la observación de un precipitado color rojo.

Saponinas: 2.5 mg de extracto se diluyeron en agua y se agitaron durante 15 min en un tubo de ensayo. La reacción se consideró positiva al observar una capa de 2 cm de espuma en el tubo.

Proteínas: 10 mg de extracto se disolvieron en 1 ml agua destilada y se filtraron.

Prueba de Biuret.- 1ml de extracto se colocó en un tubo de ensayo. Se añadió una gota de solución de sulfato de cobre al 2% y 1ml de etanol al 95 %. Posteriormente, se agregó un exceso de pastillas de hidróxido de potasio. La presencia de proteínas se consideró positiva al observar coloración rosa en la capa de etanol.

Fitoesteroles:

Prueba de Libermann-Burchard.- 25 mg de extracto se disolvieron en 1 ml de anhídrido acético, posteriormente, se añadió 20 µl de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró como reacción positiva para fitoesteroles la observación de cambio de color.

Aceites y Grasas:

Prueba de mancha.- Una pequeña cantidad de extracto fue prensada entre dos fragmentos de papel filtro. La presencia de una mancha de aceite en el papel se consideró como positivo para mezcla de aceites.

Prueba de saponificación.- Una pequeña cantidad de extracto se colocó en un tubo. Se añadieron 30 µl de una solución alcohólica de hidróxido de potasio 0.5 N y 10 µl de fenolftaleína. La mezcla se calentó en un baño de agua durante dos horas. La formación de jabón o parcial neutralización del álcali indica la presencia de grasas y mezcla de aceites.

Compuestos fenólicos:

Prueba del cloruro férrico.- 10 mg de extracto se disolvieron en 1 ml de agua y se añadieron 20 µl de cloruro férrico al 5%. Se consideró como reacción positiva para compuestos fenólicos la observación de coloración verde oscuro.

Reducción de magnesio y ácido clorhídrico.- 10 mg de extracto se disolvieron en 1 ml de alcohol, se colocaron en un tubo, se añadió un fragmento de cinta de magnesio y 10 µl de ácido clorhídrico concentrado. La observación de coloración rosa a rojo escarlata se consideró como reacción positiva para flavanol glicosidos.

6.7.2. Cromatografía en capa fina

El análisis por cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 (F₂₅₄ Merck) de 5x5 cm. La fase móvil y los extractos se prepararon de la misma manera que en el ensayo de DPPH *in situ*, como control se utilizaron los solventes de extracción.

Las placas se analizaron bajo luz ultravioleta a 254 y 365 nm, se revelaron con solución HS (Anexo 9) y se determinó el factor de retención (R_f) (3) para cada una de las bandas observadas (Sánchez *et al.*, 2013).

$$(3) R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

6.7.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Kim *et al.* (2003). Se colocaron en los pozos de una microplaca 150 µl de agua desionizada, 2.5 µl de extracto (17 mg/ml) y 10 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, la mezcla se mantuvo en reposo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada pozo 30 µl de carbonato de sodio al 20%, se incubó durante 15 min a 37 °C, se enfrió en un baño de hielo y, finalmente, se realizó la lectura a 750 nm.

La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución de ácido gálico a 1000 ppm (Anexo 7), como controles se utilizaron los solventes de extracción. La cantidad de compuestos fenólicos se expresó en equivalentes de ácido gálico (EAG) por peso seco.

6.7.4. Cuantificación de flavonoides

El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos, donde se colocaron 1 µl de extracto y 5 µl de nitrito de sodio al 20%, posteriormente se añadieron 5 µl cloruro de aluminio al 10% y 239 µl de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en reposo durante 45 min, transcurrido ese tiempo se realizaron las lecturas a 415 nm (Kim *et al*, 2003).

La curva de calibración se preparó con una solución de Quercetina a 1.5 mg/ml (Anexo 8), como controles se utilizaron los solventes de extracción. La cantidad de flavonoides se expresó en equivalentes de quercetina (EQ) por peso seco.

6.7.5. Correlación de Pearson

La posible relación entre la actividad antioxidante mostrada por los extractos y los compuestos cuantificados se determinó mediante el método de correlación de Pearson utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.

6.8 Análisis estadístico

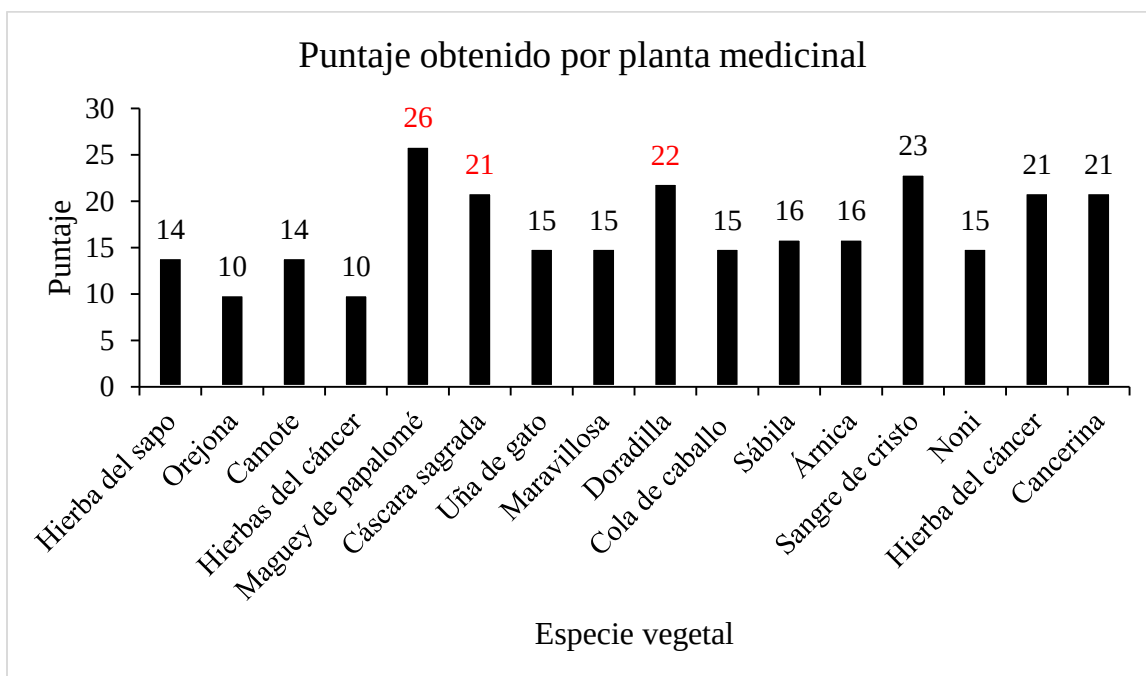
Los datos obtenidos en el ensayo con *Artemia salina*, SRB, DPPH[•], ABTS⁺, cuantificación de fenoles y flavonoides, se valoraron mediante un análisis de varianza “ANOVA” con una significancia de $p < 0.05$, seguido de un análisis post ANOVA “Tukey” con una significancia de $p < 0.05$, ambos análisis utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.

7. RESULTADOS

7.1. Entrevistas

El análisis de la información recabada en las entrevistas realizadas a los médicos tradicionales de la región de la Chinantla (San José Chiltepec, San Juan Bautista Tuxtepec, San Juan Bautista Valle Nacional) y la Cañada (Cuicatlán y Huautla), permitió identificar 16 especies utilizadas en medicina tradicional oaxaqueña para el tratamiento del cáncer: *Eryngium carlinae* (Hierba del sapo), *Hylocereus undatus* (Orejona), *Ipomoea batatas* (Camote), Hierbas del cáncer (manzanilla, matico y llantén), *Agave potatorum* (Maguey de papalomé), *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada), *Uncaria tomentosa* (Uña de gato), *Kalanchoe pinnata* (Maravillosa), *Selaginella lepidophylla* (Doradilla), *Equisetum arvense* L. (Cola de caballo), *Aloe vera* (Sábila), *Heterotheca inuloides* (Árnica), *Justicia spicigera* S. (Sangre de cristo), *Morinda citrifolia* (Noni) y *Semialarium mexicanum* (Cancerina). Los lugares, temporadas y estadios de colecta, el tipo de cáncer, el uso de las especies además del tratamiento del cáncer, la parte que se utiliza de la planta y los métodos de preparación más frecuentes, se ilustran en el anexo 13.

Se estableció un sistema de evaluación a partir de las respuestas obtenidas en el cuestionario formulado (Anexo 13), asignándole valor a estas de acuerdo a la relevancia que tenían para la realización de este trabajo. El puntaje obtenido por cada una de las especies se muestra en la Gráfica 1. El maguey de papalomé, la sangre de cristo y la doradilla, fueron las especies vegetales que obtuvieron las puntuaciones más altas. Sin embargo, al realizar la revisión bibliográfica se encontró que la sangre de cristo ya cuenta con estudios de actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Es por ello que se consideraron la cáscara sagrada, la hierba del cáncer y la cancerina; especies que obtuvieron las siguientes puntuaciones más altas (21 puntos cada una). Se seleccionó la cáscara sagrada debido a que no se encontraron antecedentes de estudios en la línea celular a utilizar.



Gráfica 1: Puntaje obtenido para cada una de las plantas medicinales utilizadas en medicina tradicional oaxaqueña para el tratamiento del cáncer.

1. Maguey de papalomé (*Agave potatorum*). - Los médicos tradicionales colectan esta especie utilizada para el tratamiento del cáncer de pulmón principalmente en temporada de lluvia en Santiago Nacaltepec, Oaxaca. La planta se lava y se utiliza fresca preparada por decocción colocando una penca en agua, se consume una copa de esta bebida tres veces día (Anexo 20).
2. Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*). – La corteza de esta especie utilizada por los médicos tradicionales para el tratamiento del cáncer de próstata se prepara por infusión y se consume una taza de esta al día. Esta corteza es posible de empaquetar y almacenar para su uso posterior (Anexo 21).
3. Doradilla (*Selaginella lepidophylla*). - Esta especie es posible de colectar durante todo el año en San José Chiltepec, Oaxaca. Es utilizada para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, se emplea también para desinflamar y mitigar dolores corporales. La planta completa se lava y se prepara por infusión con una taza de agua. Se consume diario una taza de esta infusión por la mañana (Anexo 22).

Se seleccionó una cuarta especie vegetal a partir de la revisión bibliográfica de plantas medicinales utilizadas en el estado de Oaxaca:

4. Amaranto globo (*Gomphrena globosa*). – Esta especie es empleada en medicina tradicional oaxaqueña para el tratamiento de diferentes enfermedades entre las que se encuentran la diabetes, hipertensión, infecciones, asma y cáncer. Se aplica macerado en la zona afectada y se consume en té o infusiones (Anexo 23).

7.2. Rendimiento y características de los extractos

El rendimiento obtenido de cada uno de los extractos (Acuoso-Ac, Metanólico-MeOH, Acetato de etilo-AEt y Hexánico -Hex) de las cuatro especies se muestran en la tabla 7. El porcentaje de rendimiento más alto para los extractos de *Agave potatorum* fue alcanzado por el extracto acuoso, mientras que en el caso de *Rhamnus purshiana*, *Selaginella lepidophylla* y *Gomphrena globosa* los porcentajes más altos los mostraron los extractos metanólicos.

Tabla 7: Rendimientos de extracción

Especie	Tipo de extracto	Material seco (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	g extracto/ g material seco
<i>Agave potatorum</i>	Ac	66.138	22.856	34.558	0.346
	MeOH		7.328	11.080	0.111
	AEt		0.330	0.499	0.005
	Hex		0.383	0.579	0.006
<i>Rhamnus purshiana</i>	Ac	300	23.308	7.770	0.078
	MeOH		49.287	16.430	0.164
	AEt		25.226	8.409	0.084
	Hex		1.542	0.514	0.005
<i>Selaginella lepidophylla</i>	Ac	300	5.638	1.880	0.019
	MeOH		21.738	7.250	0.072
	AEt		9.250	3.083	0.031
	Hex		5.301	1.770	0.018
<i>Gomphrena globosa</i>	Ac	110	5.385	4.895	0.049
	MeOH		5.395	4.904	0.049
	AEt		0.634	0.580	0.006
	Hex		0.428	0.390	0.004

El mayor rendimiento para los extractos acuosos fue el extracto de *A. potatorum*, mientras que entre los metanólicos y de acetato de etilo fueron los de *R. purshiana*. Entre los extractos hexánicos el de mayor rendimiento fue el de *S. lepidophylla*.

Los extractos obtenidos presentaron texturas variadas y color amarillo, verde o café; como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Características de los extractos

Especie	Extracto	Color	Textura
<i>Agave potatorum</i>	Ac	Amarillo claro	Seca-granulada
	MeOH	Café oscuro	Viscosa-aceitosa
	AEt	Negro	Granulada-viscosa
	Hex	Café claro	Aceitosa-suave
<i>Rhamnus purshiana</i>	Ac	Café claro	Seca-granulada
	MeOH	Café oscuro	Viscosa-suave
	AEt	Amarillo claro	Seca
	Hex	Amarillo oscuro	Elástica-semisuave
<i>Selaginella lepidophylla</i>	Ac	Café oscuro	Viscosa-elástica-granulada
	MeOH	Café oscuro	Granulada-húmeda
	AEt	Verde oscuro	Granulada-húmeda-aceitosa
	Hex	Café claro	Granulada-aceitosa
<i>Gomphrena globosa</i>	Ac	Café oscuro	Elástica-granulada
	MeOH	Café verdoso	Viscosa-granulada
	AEt	Verde oscuro	Seca-suave
	Hex	Amarillo oscuro	Aceitosa-granulada

7.3. Toxicidad en *Artemia salina*

Los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad fueron analizados mediante transformación PROBIT. Los valores obtenidos del cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀) se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Dosis letal 50 de los extractos

Especie/Extracto	DL ₅₀ (µg/ml)			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>Agave potatorum</i>	>1000	33.5±0.178	>1000	>1000
<i>Rhamnus purshiana</i>	920.6±0.212	>1000	>1000	>1000
<i>Selaginella lepidophylla</i>	>1000	62±0.228	>1000	>1000
<i>Gomphrena globosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000

Los valores se muestran como media ± desviación estándar (n=3)

Utilizando el siguiente criterio para determinar el nivel de toxicidad de los extractos:

- No tóxicos (valores superiores a 1000µg/ml)
- Ligeramente tóxicos (valores menores a 1000 y mayores a 500 µg/ml)
- Tóxicos (valores menores a 500 µg/ml)

Se determinó que los extractos metanólicos de *A. potatorum* y *S. lepidophylla* presentan toxicidad, mientras que el extracto acuoso de *R. purshiana* puede considerarse ligeramente toxico.

7.4. Actividad citotóxica en la línea celular MCF-7

Los datos obtenidos en las lecturas realizadas a 490 nm se utilizaron para calcular los valores de CI₅₀ que se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Concentración inhibitoria 50 de los extractos

Especie/Extracto	CI ₅₀ (µg/ml)			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>Agave potatorum</i>	ND	ND	1.086±0.016	1.321±0.012
<i>Rhamnus purshiana</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Selaginella lepidophylla</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Gomphrena globosa</i>	ND	ND	0.118±0.014	27.710±0.013
Camptotecina			0.027±0.004	
Paclitaxel			0.003±0.0003	

Los valores se muestran como media ± desviación estándar. (n=3). ND- no determinado.

El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI) menciona que para determinar si un extracto posee actividad citotóxica este debe presentar un valor de CI_{50} menor o igual a 20 $\mu\text{g/ml}$. De acuerdo a este criterio se puede afirmar que los extractos de acetato de etilo y hexánicos de *A. potatorum* y *G. globosa* poseen actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Entre estos, el extracto de acetato de etilo de *G. globosa* muestra mayor actividad, ya que su valor de CI_{50} ($0.118 \pm 0.014 \mu\text{g/ml}$) es el más cercano a los valores que muestran los fármacos comerciales utilizados en el tratamiento del cáncer de mama: camptotecina ($0.027 \pm 0.004 \mu\text{g/ml}$) y paclitaxel ($0.003 \pm 0.0003 \mu\text{g/ml}$).

7.5. Actividad antioxidante

A pesar de que solo cuatro de los 16 extractos mostraron actividad, se determinó la actividad antioxidante de todos con el fin de recabar información de las especies vegetales seleccionadas.

7.5.1. DPPH *in situ*

Los extractos acuoso, metanólico, acetato de etilo y hexánico de *R. purshiana* (carril 2) revelaron bandas de color amarillo brillante, demostrando la presencia de compuestos antioxidantes, como se puede observar en las figuras 10, 11, 12 y 13. Los extractos de *A. potatorum*, *S. lepidophylla* y *G. globosa* mostraron bandas de ligera coloración amarilla (Figuras 10, 11, 12, 13 y 14) por lo cual no se descarta la presencia de compuestos antioxidantes.

Las bandas no se muestran claramente definidas como se puede observar en las imágenes, esto podría deberse a que la fase móvil utilizada no es la más adecuada para la separación de los compuestos presentes en los extractos, sin embargo, en este ensayo no era de interés identificar bandas definidas, sino observar la coloración amarilla en los carriles que indicaría la presencia de compuestos antioxidantes.

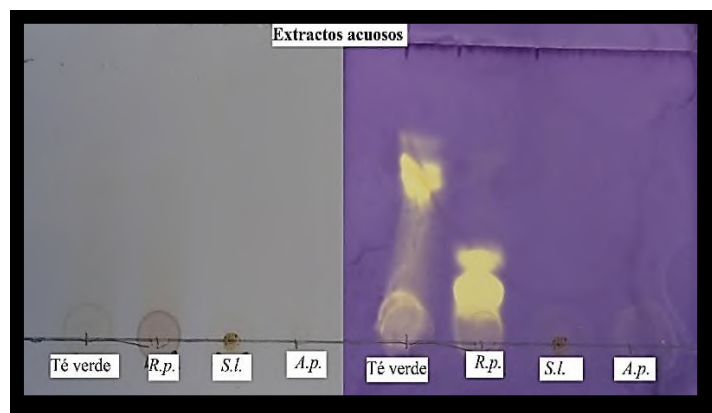


Figura 10: Extractos acuosos previo y posterior al revelado con DPPH
 Leyenda: A.p.-*Agave potatorum*, R.p.-*Rhamnus purshiana*, S.l.-*Selaginella lepidophylla*.

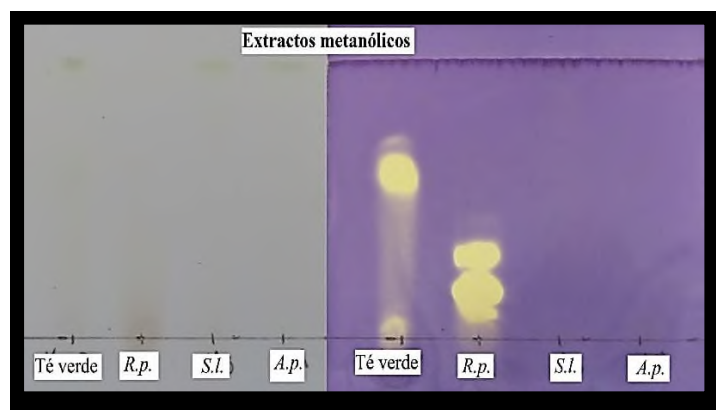


Figura 11: Extractos metanólicos previo y posterior al revelado con DPPH
 Leyenda: A.p.-*Agave potatorum*, R.p.-*Rhamnus purshiana*, S.l.-*Selaginella lepidophylla*.

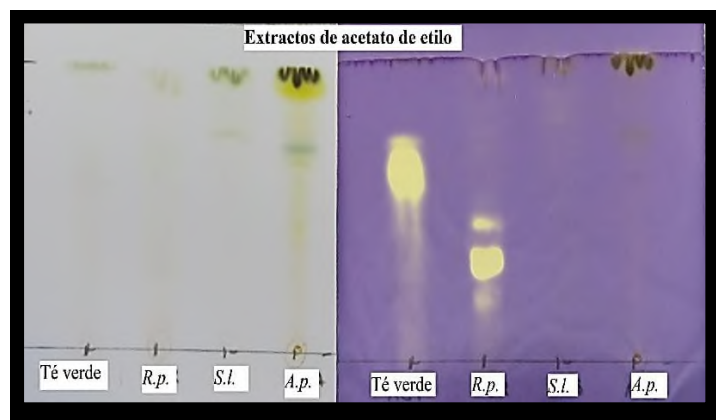


Figura 12: Extractos de acetato de etilo previo y posterior al revelado con DPPH
 Leyenda: A.p.-*Agave potatorum*, R.p.-*Rhamnus purshiana*, S.l.-*Selaginella lepidophylla*.

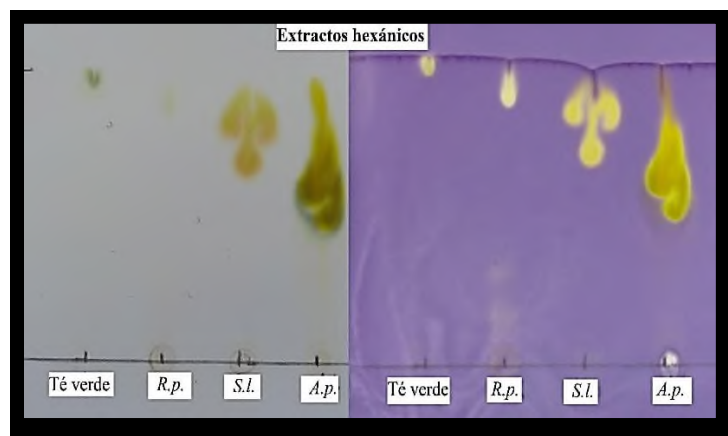


Figura 13: Extractos hexánicos previo y posterior al revelado con DPPH
 Leyenda: A.p.-*Agave potatorum*, R.p.-*Rhamnus purshiana*, S.l.-*Selaginella lepidophylla*.

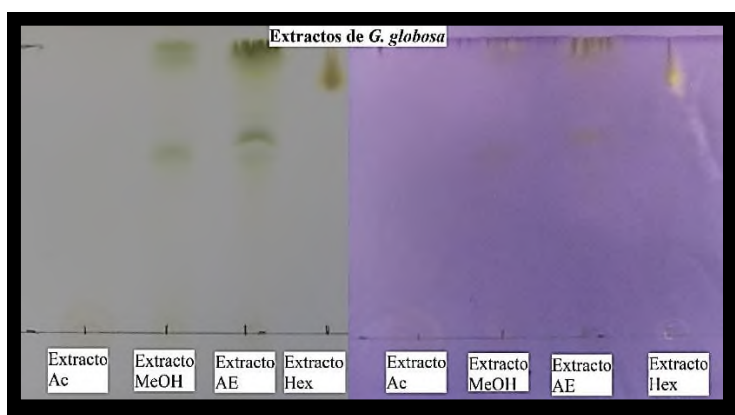
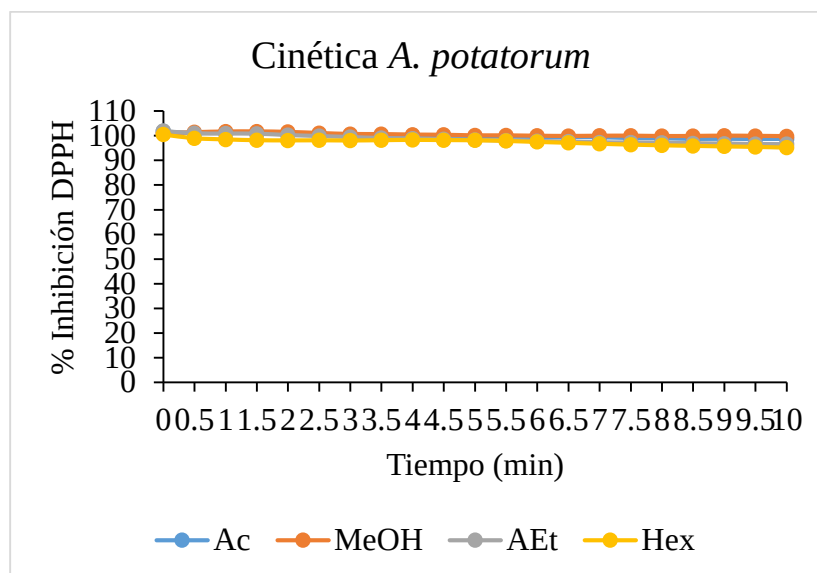


Figura 14: Extractos de *G. globosa* previo y posterior al revelado con DPPH
 Leyenda: Ac-Acuoso, MeOH-Metanólico, AEt-acetato de etilo, Hex-hexánico.

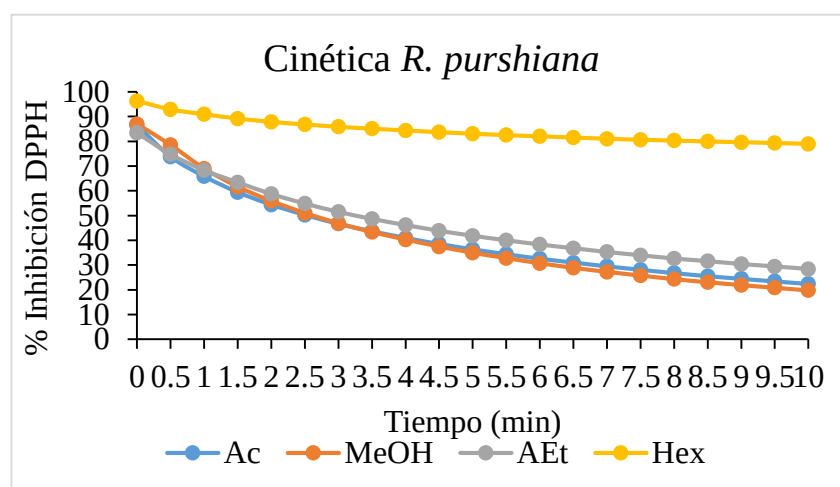
7.5.2. Ensayo de captación del radical DPPH^{*}

La cinética realizada con los extractos de *A. potatorum* demostró la ausencia de capacidad de inhibición del radical DPPH^{*} de estos (Gráfica 2), al contrario de los extractos de *R. purshiana* que mostraron capacidad de inhibición del radical DPPH^{*} desde el minuto cero, dicha capacidad incremento en el transcurso de la cinética hasta su finalización en el minuto 10, donde el extracto acuoso y el metanólico lograron inhibir en un 78 y 80% respectivamente la actividad del radical (Gráfica 3).

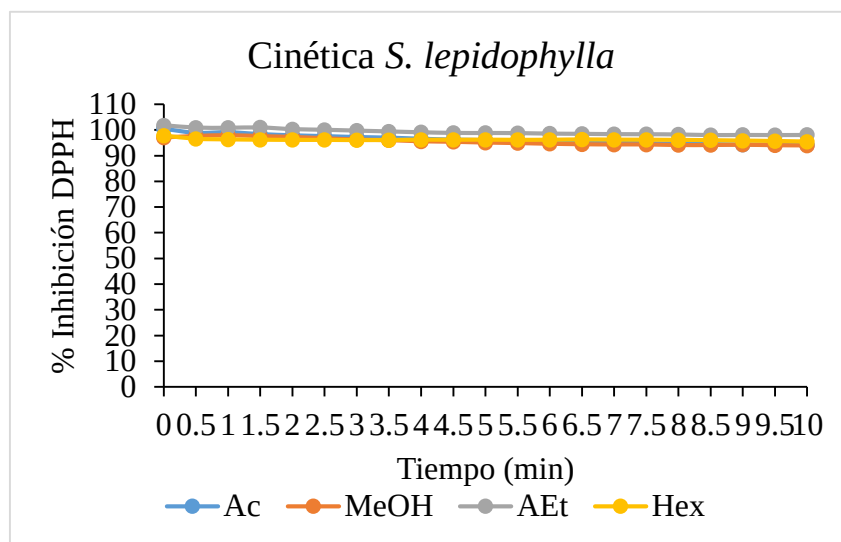


Gráfica 2: Cinética DPPH de los extractos de *A. potatorum*

Los extractos de *S. lepidophylla* no mostraron capacidad de inhibición del radical DPPH[•] en el tiempo de duración de la cinética (Gráfica 4). La actividad de inhibición de los extractos de *G. globosa* se demostró desde el minuto cero y se mantuvo constante hasta el final de la cinética (Gráfica 5), los extractos de acetato de etilo y hexánico mostraron la mayor actividad alcanzando porcentajes de inhibición de 75.4 y 70% respectivamente.

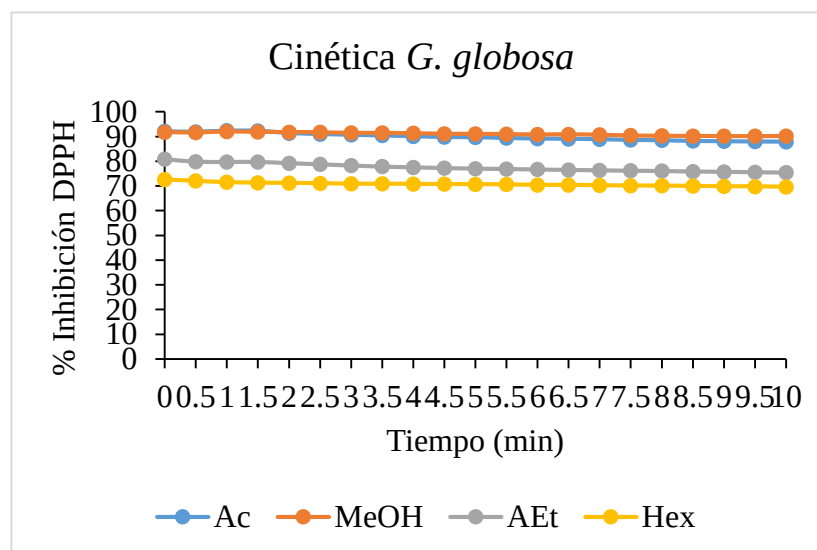


Gráfica 3: Cinética DPPH de los extractos de *R. purshiana*



Gráfica 4: Cinética DPPH de los extractos de *S. lepidophylla*

Los resultados obtenidos para *A. potatorum*, *R. purshiana* y *S. lepidophylla* corresponden al comportamiento de los extractos en el ensayo DPPH *in situ*, sin embargo, a pesar de que las bandas de los extractos de *G. globosa* no presentaron por completo la coloración esperada en el ensayo DPPH *in situ*, estos mostraron poseer actividad para inhibir el radical.



Gráfica 5: Cinética DPPH de los extractos de *G. globosa*

Se utilizó una curva de calibración realizada a partir de una solución stock 0.25 mg/ml (Anexo 5) para determinar la concentración de antioxidantes en equivalentes de trolox “ET” (tabla 11), el cálculo se realizó tomando el valor de la absorbancia obtenido en el punto final de la cinética.

Tabla 11: Concentración de antioxidantes en los extractos (DPPH)

Especie/Extracto	mg ET/g extracto			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	-----	-----	-----	-----
<i>R. purshiana</i>	1.924	1.982	1.764	0.439
<i>S. lepidophylla</i>	-----	-----	-----	-----
<i>G. globosa</i>	0.272	0.213	0.566	0.680

Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

Los resultados obtenidos, expresados en miligramos de equivalentes de trolox por gramo de extracto, muestran una mayor concentración de antioxidantes en los extractos más polares de *R. purshiana*, mientras que la mayor concentración de antioxidantes en *G. globosa* se encuentra en los extractos de menor polaridad.

La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se determinó realizando lecturas de la absorbancia de los extractos a diferentes concentraciones (tabla 12).

Tabla 12: Concentración inhibitoria 50 de los extractos (DPPH)

Especie/Extracto	CI ₅₀ (mg/ml)			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	-----	-----	-----	-----
<i>R. purshiana</i>	11.125 $\pm$ 0.013 ^a	11.858 $\pm$ 0.002 ^b	11.304 $\pm$ 0.017 ^b	34.360 $\pm$ 0.023 ^c
<i>S. lepidophylla</i>	-----	-----	-----	-----
<i>G. globosa</i>	ND	ND	21.606 $\pm$ 0.013 ^a	22.156 $\pm$ 0.020 ^a

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

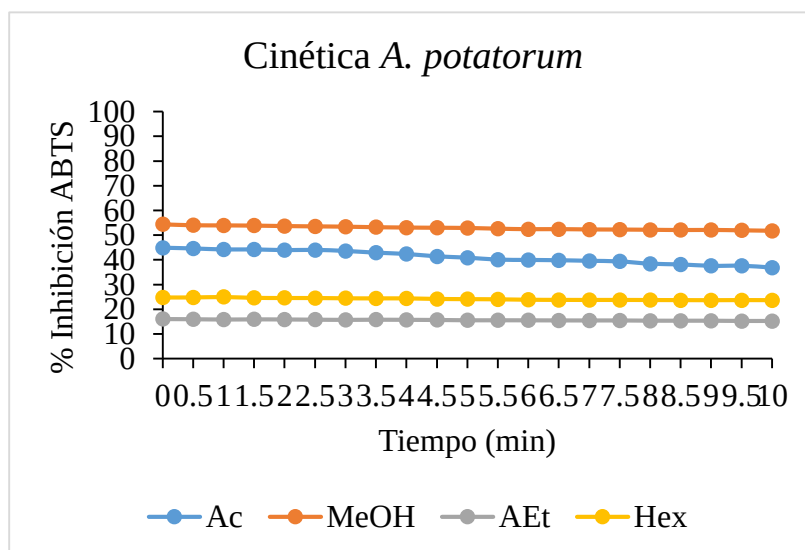
El extracto acuoso de *R. purshiana* demostró requerir de una menor concentración para inhibir un 50% de la actividad del radical respecto a los extractos restantes con un CI₅₀ de 11.125 $\pm$ 0.013 mg/ml, mientras que el extracto de acetato de etilo de *G. globosa* fue el que

mostró un menor valor de CI_{50} (21.606 ± 0.020 mg/ml) en comparación con el extracto hexánico (22.156 ± 0.020 mg/ml). El extracto acuoso de *R. purshiana* y el extracto de acetato de etilo de *G. globosa* como se mencionó con anterioridad, se encuentran entre los extractos que presentaron una mayor concentración de antioxidantes en equivalentes de trolox (1.924 y 0.566 mg ET/g extracto, respectivamente).

7.5.3. Ensayo de captación del radical ABTS⁺

Debido a que no se detectó la actividad de todos los extractos mediante el ensayo DPPH, se realizó el ensayo ABTS⁺, ya que este radical muestra una mayor afinidad para aceptar diversos compuestos como donadores incluyendo aquellos que son hidrofílicos y lipofílicos. Los extractos a una concentración de 17 mg/ml se utilizaron para evaluar el comportamiento de estos frente al radical ABTS⁺ mediante una cinética de 10 minutos.

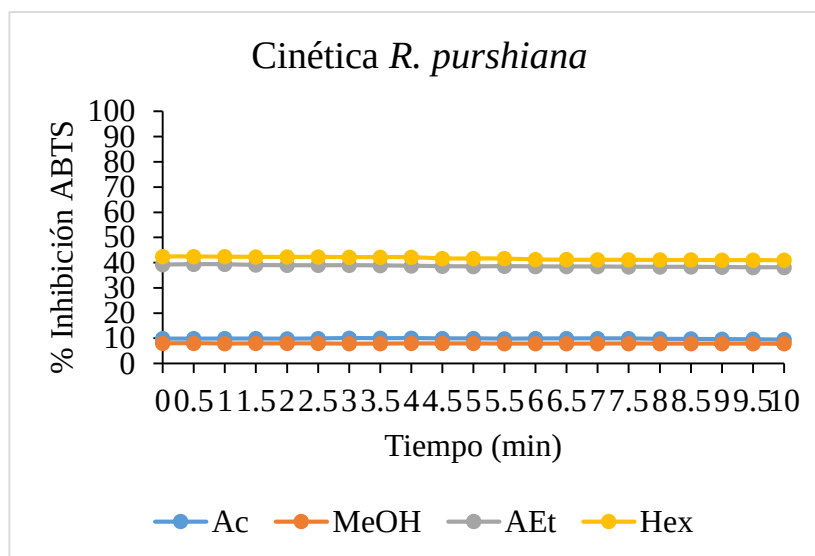
La cinética de *A. potatorum* muestra que todos los extractos inhibieron la actividad del radical ABTS⁺ desde el minuto cero (Gráfica 6). El extracto de acetato de etilo alcanzó el mayor porcentaje de inhibición con un valor de 84.7% en el tiempo final de la cinética.



Gráfica 6: Cinética ABTS de los extractos de *A. potatorum*

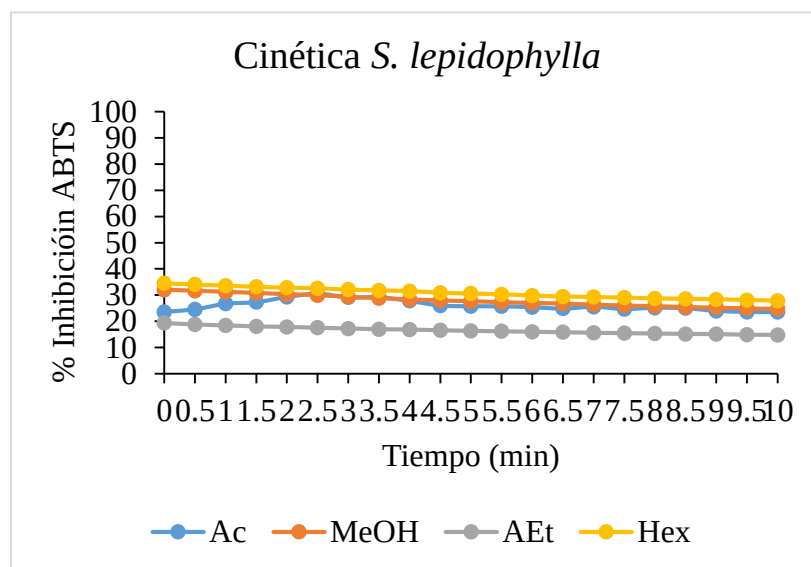
El extracto metanólico de *R. purshiana* logró inhibir desde el minuto cero un 92% de la actividad del radical ABTS, seguido del extracto acuoso que alcanzó un 90% de inhibición (Gráfica 7); estos valores superan en más de un 10% a los obtenidos en el ensayo DPPH.

El comportamiento de los extractos puede considerarse estable durante los 10 minutos de duración de la cinética ya que no se observó ningún incremento ni disminución significativa en el porcentaje de inhibición alcanzado.



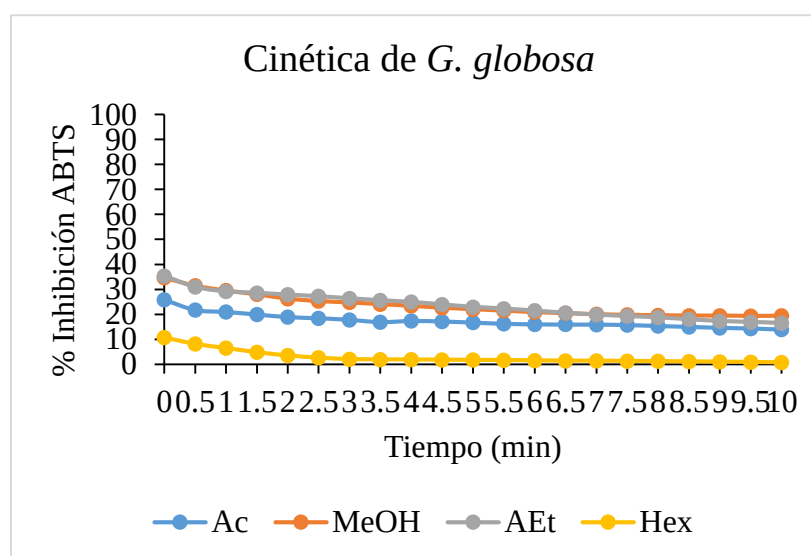
Gráfica 7: Cinética ABTS de los extractos de *R. purshiana*

El extracto de *S. lepidophylla* que mostró una mayor actividad de inhibición fue el de acetato de etilo (85.2%). La actividad de los extractos metanólico, acetato de etilo y hexánico se incrementó ligeramente en el transcurso de la cinética (Gráfica 8). Un comportamiento distinto se observó en el extracto acuoso, el cual mostró una disminución en su capacidad de inhibición del radical desde el minuto uno hasta el minuto cinco de la cinética.



Gráfica 8: Cinética ABTS de los extractos de *S. lepidophylla*

El mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS en los extractos de *G. globosa* fue alcanzado por el extracto hexánico, el cual logró inhibir en un 89% la actividad desde el minuto cero y logró alcanzar un porcentaje de inhibición del 99.3% en el punto final de la cinética (Gráfica 9).



Gráfica 9: Cinética ABTS de los extractos de *G. globosa*

La concentración de antioxidantes en equivalentes de trolox “ET” se determinó utilizando una curva de calibración de una solución stock de trolox a 0.025 mg/ml (Anexo 6) y los valores de absorbancia obtenidos en el punto final de la cinética. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de trolox por gramo de extracto (tabla 13).

Tabla 13: Concentración de antioxidantes en los extractos (ABTS)

Especie/Extracto	mg ET/g extracto			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	0.133	0.100	0.176	0.157
<i>R. purshiana</i>	0.189	0.192	0.126	0.120
<i>S. lepidophylla</i>	0.161	0.157	0.177	0.148
<i>G. globosa</i>	0.180	0.168	0.173	0.207

Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

Los extractos de baja polaridad de las especies *A. potatorum* y *S. lepidophylla* mostraron un valor mayor en la concentración de antioxidantes en ET, por el contrario, los extractos de mayor polaridad de *R. purshiana* fueron los que exhibieron la mayor concentración de antioxidantes.

La mayor concentración de antioxidantes en extractos de *G. globosa* la mostraron el extracto de mayor polaridad (Ac) y el de menor polaridad (Hex). Los valores para *R. purshiana* y *G. globosa* son inferiores en comparación a los obtenidos mediante el ensayo DPPH.

La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se determinó a partir de las lecturas de la absorbancia de los extractos realizadas a diferentes concentraciones (tabla 14).

Tabla 14: Concentración inhibitoria 50 de los extractos (ABTS)

Especie/ Extracto	CI ₅₀ (mg/ml)			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	15.307 $\pm$ 0.008 ^b	19.904 $\pm$ 0.033 ^c	5.528 $\pm$ 0.009 ^a	11.187 $\pm$ 0.002 ^a
<i>R. purshiana</i>	3.138 $\pm$ 0.001 ^a	2.588 $\pm$ 0.003 ^a	13.457 $\pm$ 0.01 ^b	14.316 $\pm$ 0.009 ^b
<i>S. lepidophylla</i>	9.844 $\pm$ 0.002 ^a	10.879 $\pm$ 0.009 ^b	8.675 $\pm$ 0.021 ^a	15.545 $\pm$ 0.011 ^b
<i>G. globosa</i>	6.243 $\pm$ 0.003 ^b	6.587 $\pm$ 0.002 ^c	6.750 $\pm$ 0.01 ^{bc}	8.365 $\pm$ 0.002 ^a

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, p<0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

El extracto de acetato de etilo de *A. potarorum* y *S. lepidophylla* demostraron requerir una menor concentración de antioxidantes (5.528 ± 0.009 y 8.675 ± 0.021 mg/ml respectivamente) para inhibir en un 50% la actividad del radical.

Los extractos acuoso y metanólico fueron los que mostraron un menor valor de CI_{50} para *G. globosa*. El extracto metanólico de *R. purshiana* fue el que mostró el menor valor de CI_{50} (2.588 ± 0.003 mg/ml) respecto al valor obtenido de los extractos de esta especie y las demás.

Los valores de CI_{50} para los extractos de *R. purshiana* y *G. globosa* (Tabla 14) son inferiores comparados a los obtenidos en el ensayo DPPH (*R. purshiana* Ac:11.125, MeOH:11.858 y Hex:34.360 mg/ml; *G. globosa* AEt:21.606 y Hex:22.156mg/ml).

7.6. Análisis químico

7.6.1. Análisis fitoquímico preliminar

Se realizó un conjunto de pruebas fitoquímicas para determinar los grupos de compuestos presentes en los extractos de las cuatro especies vegetales (Tabla 15).

En los extractos de *A. potarorum* fue posible detectar carbohidratos, saponinas, aceites, grasas y compuestos fenólicos por la prueba del cloruro férrico; mientras que en los extractos de *R. purshiana* y *S. lepidophylla* se observaron flavonoides, cumarinas, saponinas, proteínas, aceites, grasas y compuestos fenólicos.

Los extractos de *G. globosa* mostraron flavonoides, cumarinas, alcaloides, carbohidratos, saponinas, aceites, grasas y compuestos fenólicos.

Todos los extractos dieron positivo a la prueba de fitoesteroles.

Tabla 15: Compuestos presentes en los extractos vegetales

Compuestos Especie-extracto		F	C	M	W	Cr	S	P	FE	A	G	FC	FM
<i>A. potatorum</i>	Ac	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	-	-
	MeOH	-	-	-	-	+	+++	-	++	++	-	+	-
	AEt	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	Hex	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-
<i>R. purshiana</i>	Ac	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	-
	MeOH	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+
	AEt	+++	++	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	-
	Hex	++	+	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-
<i>S. lepidophylla</i>	Ac	+	+	-	-	-	+	+	++	-	+	+	-
	MeOH	++	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+	-	+
	AEt	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	Hex	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-
<i>G. globosa</i>	Ac	+	+	+	+	+++	+++	-	+	+	+	+	+
	MeOH	+	+	-	-	+	-	-	+++	++	-	++	-
	AEt	+	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	+	-
	Hex	+	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-	-

Leyenda: F-flavonoides, C-cumarinas, M-alcaloides prueba Mayer, W-alcaloides prueba Wagner, Cr-carbohidratos, S-saponinas, P-proteínas, FE-fitoesteroides, A-aceites, G-grasas, FC-compuestos fenólicos prueba del cloruro férrico, FM-compuestos fenólicos prueba de reducción de magnesio y ácido clorhídrico. Presencia: Intensa (+++), media (++), poca (+) y nula (-).

7.6.2. Cromatografía en capa fina

Los extractos se cargaron en placas cromatográficas para la separación de sus compuestos utilizando una fase móvil de acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) y se revelaron con una solución de hidroxibenzaldehído en ácido sulfúrico (Anexo 9). Los extractos de *A. potatorum* (A.p.), *R. purshiana* (R.p.) y *S. lepidophylla* (S.l.) se cargaron en las placas de acuerdo al tipo de solvente con el que se prepararon, los extractos de *G. globosa* se colocaron en una sola placa.

El extracto acuoso de *R. purshiana* mostró dos bandas bajo la luz uv a una longitud de onda de 254 nm y cuatro bandas después de revelarse con la solución HS con valores de R_f de 0.176, 0.265, 0.368 y 0.559. Los extractos acuosos de *A. potatorum* y *S. lepidophylla* no mostraron bandas (Figura 15).

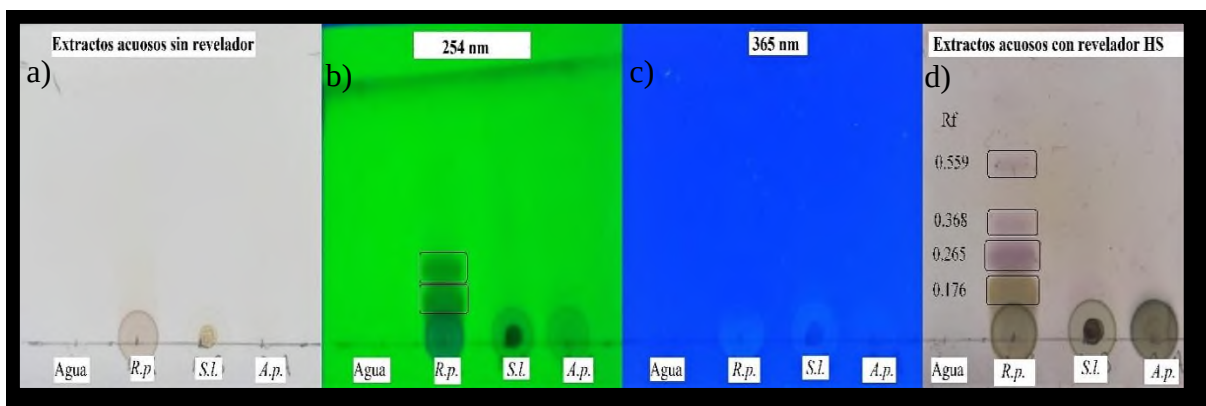


Figura 15: Placa cromatográfica de los extractos acuosos de *A. potatorum*, *R. purshiana* y *S. lepidophylla*, con diferentes reveladores: a) luz visible, b) UV 254 nm, c) UV 365 nm y d) revelador HS.

El extracto metanólico de *A. potatorum* mostró una banda al observarse bajo la luz uv de longitud de onda de 365 nm. En el extracto de *S. lepidophylla* se detectó una banda al observarse a 254 y 365 nm, una banda distinta se reveló con la solución HS con un R_f de 0.853 (Figura 16). En el extracto de *R. purshiana* se detectaron dos bandas previo al revelado, al observarse bajo luz uv de 254 nm mostró una más, al revelarse con la solución HS se observaron cuatro bandas con valores de R_f de 0.147, 0.294, 0.412 y 0.612.

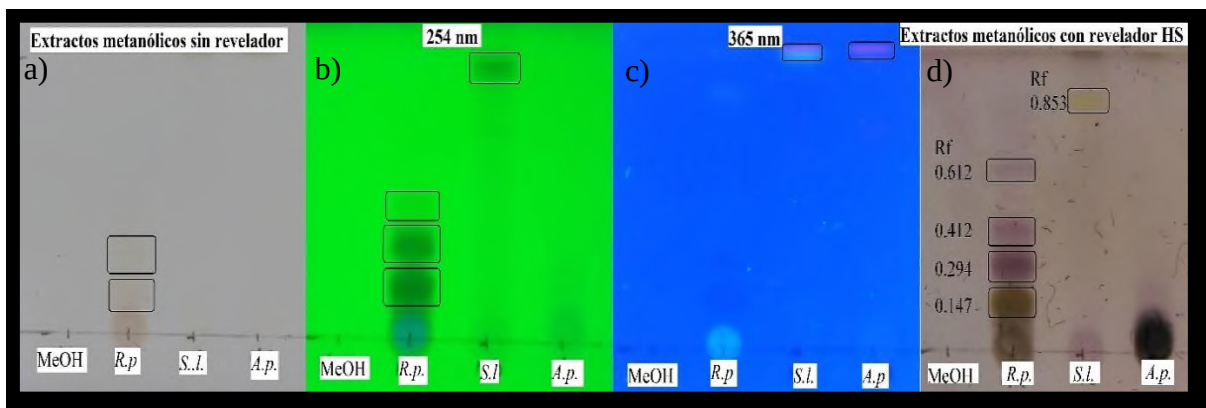


Figura 16: Placa cromatográfica de los extractos metanólicos de *A. potatorum*, *R. purshiana* y *S. lepidophylla*, con diferentes reveladores: a) luz visible, b) UV 254 nm, c) UV 365 nm y d) revelador HS.

Los extractos de acetato de etilo de las tres especies mostraron una mayor cantidad de bandas respecto al extracto acuoso y metanólico. El extracto de *R. purshiana* mostró cuatro bandas

previo al revelado, seis a 254 nm y una a 365 nm, al revelarse con la solución HS se observaron seis bandas de las cuales cuatro coincidían con las observadas a 254 nm. En el extracto de *S. lepidophylla* se detectó una banda previo al revelado, al observarse bajo la luz uv a 254 nm y revelarse con solución HS se detectaron dos bandas con valores de R_f de 0.666 y 0.805 (Figura 17). El número de bandas que se observaron en el extracto de *A. potatorium* es mayor comparado a *R. purshiana* y *S. lepidophylla*, detectándose cuatro bandas previo al revelado, tres a 254 y 365 nm; siete al revelarse con la solución HS. Se observó correspondencia entre las bandas del extracto.

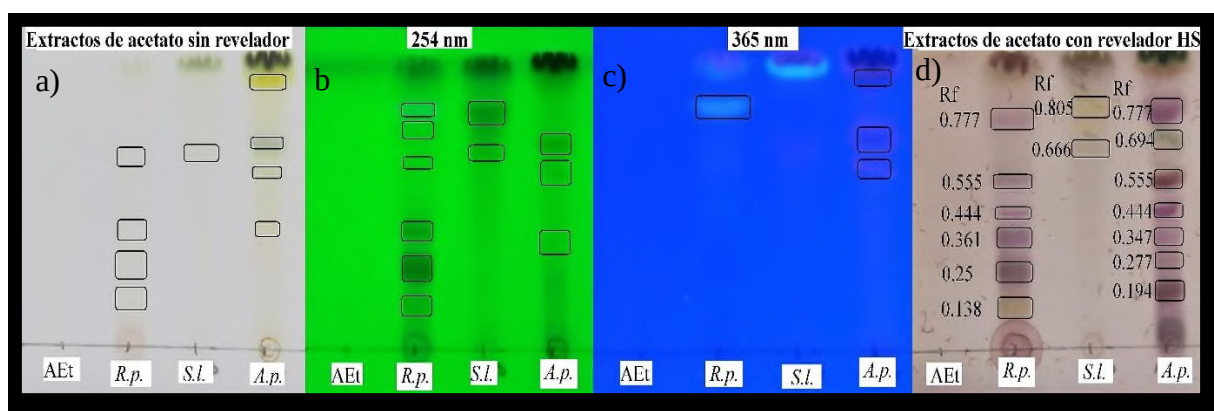


Figura 17: Placa cromatográfica de los extractos de acetato de etilo de *A. potatorium*, *R. purshiana* y *S. lepidophylla*, con diferentes reveladores: a) luz visible, b) UV 254 nm, c) UV 365 nm y d) revelador HS.

En el extracto hexánico de *S. lepidophylla* se observó solo una banda a 365 nm, mientras que en el de *R. purshiana* fue posible detectar dos bandas que coinciden previo al revelado, a 254 nm y con el revelador HS. Una tercera banda se observó con el revelador HS (Figura 18).

El extracto hexánico de *A. potatorium* mostró dos bandas similares al observarse en luz uv de 254 y 365 nm. Dos bandas distintas se detectaron previo al revelado, mientras que al revelarse con la solución HS se observaron cinco bandas de las cuales solo una (R_f de 0.629) coincide con una observada previo al revelado.

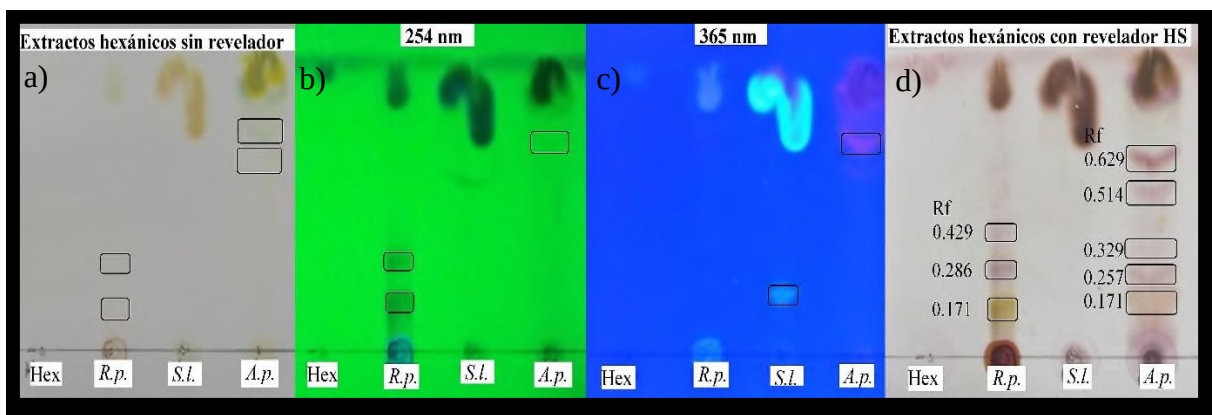


Figura 18: Placa cromatográfica de los extractos hexánicos de *A. potatorum*, *R. purshiana* y *S. lepidophylla*, con diferentes reveladores: a) luz visible, b) UV 254 nm, c) 365 nm y d) revelador HS.

No se observó en el extracto hexánico de *G. globosa* la presencia de bandas, mientras que en el extracto acuoso fue posible detectar una banda a 254 nm, esta banda se observó de nuevo al revelarse la placa con la solución HS (Figura 19). Previo al revelado, se detectaron tres bandas en el extracto metanólico y de acetato de etilo de *G. globosa*, bajo la luz uv de 254 nm estos extractos mostraron seis y cuatro bandas respectivamente. A 365nm se observaron cuatro bandas en cada uno mientras que al revelarse con HS fue posible detectar siete.

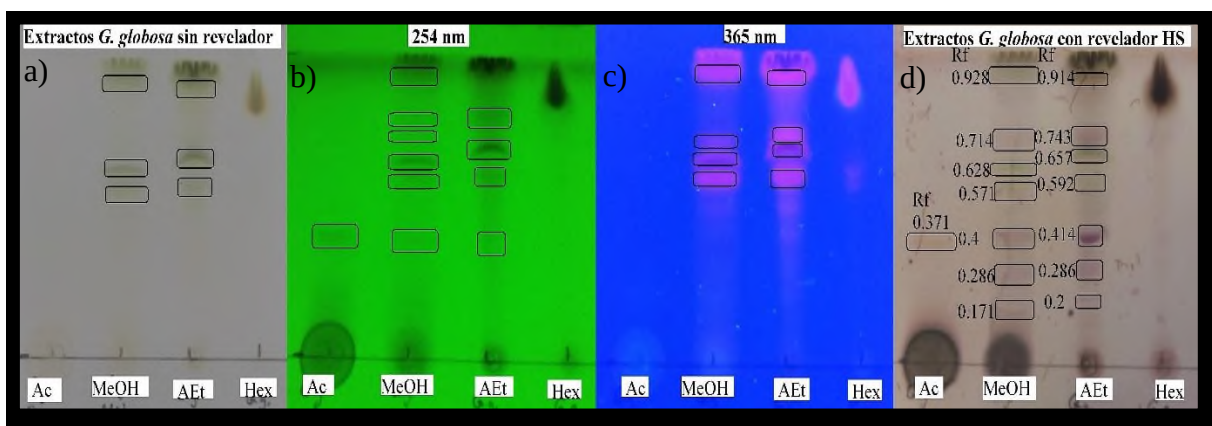


Figura 19: Placa cromatografía de los extractos de *G. globosa*, con diferentes reveladores: a) luz visible, b) UV 254 nm, c) UV 365 m y d) revelador HS.

7.6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentes en los extractos de las cuatro especies vegetales se reportan como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (tabla 16).

Tabla 16: Concentración de compuestos fenólicos en los extractos

Especie/Extracto	mg EAG/g extracto			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	46278±0.017 ^c	13186±0.038 ^b	9897±0.006a ^b	6428±0.007 ^a
<i>R. purshiana</i>	58103±0.133 ^b	60667±0.147 ^b	45282±0.093 ^b	10908±0.002 ^a
<i>S. lepidophylla</i>	21149±0.014 ^c	14830±0.023 ^b	5900±0.004 ^a	5101±0.005 ^a
<i>G. globosa</i>	21919±0.004 ^c	15222±0.016 ^b	10697±0.053 ^{ab}	6624±0.006 ^a

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

Los extractos acuosos de *A. potatorum*, *S. lepidophylla* y *G. globosa* (46278, 21149 y 21919 mg EAG/g extracto; respectivamente) mostraron la mayor concentración de compuestos fenólicos respecto al resto de los extractos de estas especies; mientras que entre los extractos de *R. purshiana* fue el metanólico (60667 mg EAG/g extracto) el que presento la mayor concentración. La menor concentración de estos compuestos la mostró cada uno de los extractos hexánicos de las cuatro especies vegetales.

7.6.4. Cuantificación de flavonoides

Los datos obtenidos mediante el ensayo $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ se reportan como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto (Tabla 17).

Tabla 17: Concentración de flavonoides en los extractos

Especie/Extracto	mg EQ/g extracto			
	Ac	MeOH	AEt	Hex
<i>A. potatorum</i>	0.023±0.001 ^a	0.061±0.002 ^c	0.031±0.002 ^b	0.020±0.001 ^a
<i>R. purshiana</i>	0.175±0.020 ^c	0.134±0.003 ^b	0.033±0.004 ^a	0.023±0.002 ^a
<i>S. lepidophylla</i>	0.034±0.003 ^a	0.078±0.005 ^b	0.029±0.001 ^a	0.023±0.001 ^a
<i>G. globosa</i>	0.072±0.014 ^a	0.291±0.026 ^b	0.463±0.020 ^c	0.040±0.012 ^a

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar. (n=3)

El extracto de acetato de etilo de *G. globosa* (0.463 mg EQ/g extracto), el extracto acuoso de *R. purshiana* (0.175 mg EQ/g extracto) y los extractos metanólicos de *A. potatorum* y *S. lepidophylla* (0.061 y 0.078 mg EQ/g extracto, respectivamente), presentaron la mayor concentración de flavonoides. La menor concentración de estos compuestos la mostró cada uno de los extractos hexánicos de las especies vegetales utilizadas.

7.6.5. Correlación de Pearson: ensayos de actividad antioxidante y cuantificación de compuestos

Los resultados de la correlación entre los compuestos fenólicos y flavonoides con la actividad antioxidante mostrada por los extractos (Anexo 16, 17, 18 y 19), se muestran en la tabla 18.

Tabla 18: Correlación de Pearson: actividad antioxidante y cuantificación de compuestos

Especie	Ensayo	Cuantificación	% correlación	SiBi	Tipo de correlación
<i>A. potatorum</i>	ABTS	Compuestos fenólicos	-27.6	0.724	No significativa
		Flavonoides	-74.1	0.259	
<i>R. purshiana</i>	DPPH	Compuestos fenólicos	98.5	0.015	Significativa
		Flavonoides	68.7	0.313	No significativa
	ABTS	Compuestos fenólicos	82.7	0.173	No significativa
		Flavonoides	96.7	0.033	Significativa
<i>S. lepidophylla</i>	ABTS	Compuestos fenólicos	-7.0	0.930	No significativa
		Flavonoides	-12.3	0.877	
<i>G. globosa</i>	DPPH	Compuestos fenólicos	-85.7	0.143	No significativa
		Flavonoides	-2.9	0.971	
	ABTS	Compuestos fenólicos	-54.4	0.456	No significativa
		Flavonoides	-71.7	0.283	

Leyenda: SiBi-Significancia bilateral

Existe una correlación significativa en los extractos de *R. purshiana* para los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante por DPPH, así como para flavonoides y la actividad antioxidante por ABTS.

8. DISCUSIÓN

8.1. Citotoxicidad de los extractos

El ensayo realizado en *A. salina* indica que solo tres de los 16 extractos poseen toxicidad. El extracto metanólico de las hojas de *A. potatorum* mostró mayor toxicidad ($DL_{50}= 33.5 \mu\text{g/ml}$) sobre los nauplios de *A. salina*, comparado con el valor reportado por Khade *et al.* (2011) para un extracto etanólico de hojas de *Agave tequilana* ($DL_{50}= 923.10 \mu\text{g/ml}$) que presentó ligera toxicidad al estudiarse bajo condiciones similares a las de este estudio. Entre los extractos de *R. purshiana* sólo el extracto acuoso posee ligera toxicidad, el extracto metanólico demostró no ser tóxico ($DL_{50}>1000 \mu\text{g/ml}$) y presentó menor toxicidad en comparación al valor reportado por Karchesy *et al.* en el 2016 ($DL_{50}= 393 \mu\text{g/ml}$) para un extracto obtenido con metanol.

El extracto metanólico de *S. lepidophylla* fue el único de esta planta que mostró toxicidad, al realizar la revisión bibliográfica no se encontraron antecedentes de este ensayo para especies de Selaginella. Ninguno de los extractos obtenidos de la parte aérea de *G. globosa* demostró toxicidad frente a *A. salina*. El extracto acuoso no presentó toxicidad como lo reportan Bussman *et al.* (2011) para un extracto obtenido a partir de las hojas ($DL_{50}= >1000 \mu\text{g/ml}$), esto puede deberse a que las condiciones de extracción y de colecta no fueron similares. El extracto metanólico mostró toxicidad inferior respecto al valor reportado por Hamiduzzaman & Zafrul (2012) para este extracto obtenido de la planta completa ($DL_{50}=20.35\pm0.36 \mu\text{g/ml}$), una de las principales diferencias en la obtención del extracto en este trabajo respecto al de Hamiduzzaman & Zafrul fue que sólo se utilizó la parte aérea de la planta, mientras que ellos al emplear la planta completa pudieron obtener los metabolitos que se acumulan en las raíces, esto pudo incrementar la concentración de los metabolitos con actividad.

Los extractos que presentaron poca o nula toxicidad no se excluyeron de la siguiente etapa del estudio, esto debido a que no se descartó la posibilidad de que presenten compuestos que puedan actuar de forma específica sobre un tipo de células sin afectar al resto, lo cual podría justificar la ausencia de toxicidad mediante este ensayo que debe utilizarse sólo como un

punto de partida para el tamizaje de extractos citotóxicos (Martínez *et al.*, 2006). De haber presentado toxicidad frente a *A. salina*, se podría considerar mayor la probabilidad de que los extractos sean citotóxicos, sin embargo, la falta de toxicidad de un extracto también es de interés, ya que el poseer actividad citotóxica en una línea celular y no afectar a organismos simples y sensibles como *A. salina*, es de importancia para el desarrollo de un medicamento herbolario o fármaco específico para un tipo de cáncer, esto debido a que el daño de células sanas es uno de los efectos secundarios más comunes en algunos de los fármacos que se encuentran en el mercado.

El género *Agave* posee especies que presentan notables propiedades farmacológicas entre las que se encuentra la actividad citotóxica, *Agave potatorum* es una de estas especies. Este tipo de maguey es utilizado ampliamente en Oaxaca para la producción de mezcal debido a los compuestos aromáticos volátiles que presenta y como planta medicinal para el tratamiento del cáncer de pulmón, además de otras enfermedades (Alegría, 2016; Martínez *et al.*, 2012). En el presente estudio se encontró que los extractos de acetato de etilo y hexánico presentan actividad citotóxica con valores de CI_{50} menores a 2 $\mu\text{g/ml}$ en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. A pesar de que no se encontraron antecedentes de este tipo de estudios en *A. potatorum*, existen reportes de especies pertenecientes al género *Agave* que poseen actividad citotóxica, como es el caso de *A. americana*, el extracto etanólico de hojas de esta especie mostró actividad mediante el ensayo MTT en la línea de cáncer de ovario PA-1 con un valor de CI_{50} de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (Khade *et al.*, 2011). La actividad de los extractos del género *Agave* puede estar relacionada a la presencia en estos de saponinas, glicósidos y fructanos, estos compuestos han mostrado citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (HeLa), cáncer de piel (HEp-2) y cáncer de colon (Caco-2) (Díaz *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016; Sigma-Aldrich, 2017).

La cáscara del árbol *Rhamnus purshiana* es utilizada en la formulación de suplementos para dieta, además de la medicina tradicional, es en estos productos donde se destaca la actividad laxante y anticancerígena de esta especie (Estrada *et al.*, 2012). Estudios realizados a extractos de *R. purshiana* han confirmado su capacidad citotóxica en líneas celulares de leucemia, cáncer de páncreas, cáncer de hígado (Lin *et al.*, 2002) y cáncer de colon (Murillo

et al., 2008). La citotoxicidad de esta especie se ha relacionado a la presencia de emodina (considerada un inhibidor de la tirosina quinasa) y aloe-emodina, esta última ha demostrado mediante estudios *in vitro* capacidad para inducir la expresión de p53 y p21, proteínas que detiene el ciclo celular en la fase G1 (Karmakar *et al.*, 2014; Ongito, 2011). Sin embargo, en el estudio realizado en la línea celular MCF-7 ninguno de los extractos de esta especie mostró actividad citotóxica, esto puede deberse a múltiples factores, entre los que se pueden encontrar: especificidad de los compuestos para determinados tipos de cáncer y baja presencia de estos en los extractos, a pesar de los resultados obtenidos no se descarta la posibilidad de que presenten actividad en otras líneas celulares.

Especies del género *Selaginella* como *S. moellendorffii* y *S. bryopteris*, han presentado en sus extractos flavonoides y otros metabolitos que poseen actividad citotóxica (Kumar *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2017), estos compuestos podrían estar presentes en otras especies del género como *Selaginella lepidophylla*. Esta planta nativa del desierto de Chihuahua (Figueroa *et al.*, 2004), cuenta con un estudio realizado mediante el ensayo MTT de un extracto acuoso (infusión-parte aérea) en la línea celular de cáncer de colon HT-29, donde se encontró que el extracto es capaz de disminuir aproximadamente un 80% de la actividad enzimática mitocondrial de las células utilizando una concentración mayor a 7.5 mg/ml, mientras que a dosis inferiores a 2.5 mg/ml se observa un incremento en la actividad enzimática, requiriéndose una dosis elevada del extracto en comparación con otras especies (Herrera *et al.*, 2015). Este antecedente podría justificar junto a otros factores la falta de actividad de los extractos de *S. lepidophylla* analizados en este trabajo.

A través de diferentes estudios se ha demostrado que extractos obtenidos a partir de *Gomphrena globosa* poseen actividad citotóxica, anticancerígena y/o antineoplásica (André *et al.*, 2003; Orhan, 2012). En este estudio los extractos obtenidos de la parte aérea con agua y metanol no mostraron actividad citotóxica. Los extractos de acetato de etilo (AEt) y hexano (Hex) presentaron actividad (CI_{50} = 0.118 y 27.710 μ g/ml, respectivamente) destacando el extracto AEt, que posee el menor valor de CI_{50} . Los extractos AEt y Hex poseen una CI_{50} 1,605 y 5.84 veces menor de acuerdo al valor reportado por Latha & Rajendran (2013) para un extracto de cloroformo (CI_{50} = 189.5 μ g/ml) de la parte aérea de la planta probado en una

línea celular de cáncer de piel (A-431), mediante el ensayo MTT. El antecedente y los resultados obtenidos en este estudio indican mayor actividad citotóxica en los extractos menos polares, Latha & Rajendra (2013) sugieren que dicha actividad puede deberse a los compuestos fenólicos presentes en estos extractos, aunque no se descarta la posibilidad de que metabolitos como las betacianinas (que han demostrado actividad antioxidante y quimiopreventiva) sean los responsables de la citotoxicidad mostrada (Spóma & Slawomir, 2016).

8.2. Actividad antioxidante de los extractos

En la actualidad, se han determinado diversos factores que podrían estar implicados en el desarrollo del cáncer, entre estos se encuentra el estrés oxidativo, el cual es capaz de alterar la estructura y función de las células acelerando el deterioro celular y la carcinogénesis (Delgado *et al.*, 2010; Venéreo, 2002). El estrés oxidativo es ocasionado por los radicales libres, que pueden ser generados por las células cancerígenas y desempeñan un papel importante en la propagación del cáncer, debido a que son capaces de ocasionar un daño en el ADN mediante la modificación de las bases nitrogenadas (Martínez, 2007). La actividad de los radicales libres puede disminuirse e inhibirse en su totalidad mediante la administración de compuestos antioxidantes, reduciendo así el riesgo del cáncer e inhibiendo la proliferación del daño (Shekhar & Anju, 2014). Existen reportes de compuestos antioxidantes aislados de especies vegetales que presentan actividad anticancerígena o citotóxica, es por ello que en este estudio se determinó si los extractos mostraban este tipo de actividad, ya que la información obtenida podría servir como punto de partida para la elucidación del mecanismo de acción.

El ensayo DPPH *in situ* fue el primero en realizarse, en este se logró observar compuestos con actividad antiradical en los cuatro extractos de *R. purshiana* y *G. globosa*. Al realizar el ensayo DPPH *in vitro*, las cinéticas obtenidas durante 10 min a una concentración de 17 mg/ml corroboraron que los extractos de *R. purshiana* y *G. globosa* presentan actividad antiradical mediante este ensayo. La cantidad de miligramos de equivalentes de trolox por gramo de extracto obtenidos en los extractos de *R. purshiana* (Ac=1.924, MeOH=1.982,

AEt=1.764 y Hex=0.439 mg ET/g extracto), fue inferior a la reportada por Pereira (2016) para un extracto metanólico (3.22 g ET/ 100 g extracto), lo que indica una mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Los valores de CI_{50} son mayores en los extractos menos polares de esta especie. Los extractos de *G. globosa* poseen una menor cantidad de miligramos de equivalentes de trolox por gramo de extracto, comparado con el valor reportado para el extracto acuoso a partir de flores (7.443 mg ET/g extracto) obtenido por Lin *et al.* (2015). Los extractos menos polares (actividad citotóxica) de la parte aérea de esta especie mostraron un mayor valor de CI_{50} respecto a los extractos acuoso ($CI_{50}=421\pm11.4\text{ }\mu\text{g/ml}$) y metanólico ($CI_{50}=427.6\pm11.2\text{ }\mu\text{g/ml}$) obtenidos a partir de las inflorescencias de esta especie por Silva *et al.* (2012).

Los extractos de *A. potatorum* (actividad citotóxica) y *S. lepidophylla* no mostraron actividad antiradical mediante el ensayo DPPH, es por ello que con el fin de conocer la actividad de estos extractos se realizó el ensayo ABTS. Las cinéticas de los extractos de las cuatro especies demostraron la actividad antiradical de estos, alcanzando (en algunos casos) más del 80% de inhibición del ABTS. No se encontraron antecedentes para los extractos de *A. potatorum*, sin embargo, puede destacarse el extracto de acetato de etilo, ya que presentó la mayor concentración de antioxidantes (mg ET/ g extracto) y el menor valor de CI_{50} . La cantidad de miligramos de equivalentes de trolox por gramo de extracto obtenidos en los extractos de *R. purshiana* Ac=0.189, MeOH=0.192, AEt=0.177 y Hex=0.148 mg ET/g extracto) fueron menores al valor reportado por Pereira (2016) (5.10 g ET/ 100g extracto), sin embargo, el extracto metanólico demostró poseer buena capacidad antiradical con un bajo valor de CI_{50} (2.588 mg/ml).

Los extractos de *S. lepidophylla* mostraron una baja concentración de antioxidantes, el menor valor de CI_{50} lo presentó el extracto de acetato de etilo. No se encontraron antecedentes para este ensayo. Lin *et al.* (2015) reportaron para un extracto acuoso obtenido de las flores de *G. globosa* una concentración de compuestos antioxidantes de 11.63 mg ET/g extracto, este valor es entre 57 y 68 veces mayor que el de los extractos obtenidos en este estudio, el valor de CI_{50} fue similar para los extractos de mayor polaridad (Ac, MeOH y AEt).

Las CI_{50} de los extractos para el ensayo ABTS son inferiores respecto a las determinadas mediante el ensayo DPPH, esto puede deberse entre otros factores, a la capacidad que tiene el radical ABTS para reaccionar fácilmente con diferentes compuestos reductores en un amplio rango de pH, incluyendo antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Mesa *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos se consideran el principal grupo de antioxidantes en las plantas, estos compuestos son los más empleados y estudiados en los ensayos para la elucidación del mecanismo de acción de compuestos antioxidantes en células cancerígenas (González *et al.*, 2015). La presencia de estos compuestos en un extracto puede determinarse mediante ensayos espectrofotométricos, como el ensayo de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos mediante este ensayo demostraron una mayor concentración de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de *R. purshiana* y los extractos acuosos de *A. potatorum*, *S. lepidophylla* y *G. globosa*; que se debe principalmente a la naturaleza polar de estos compuestos (Méndez, 2016). La concentración de los compuestos fenólicos en *A. potatorum* fue 60.2 y 33,551 veces mayor en los extractos acuoso y metanólico respecto a los valores reportados por Rizwan *et al.* (2012) para extractos de hojas de *A. attenuata* preparados con metanol y hexano (MeOH= 0.393 y Hex= 0.105 mg EAG/g extracto). Los cuatro extractos obtenidos de *R. purshiana* presentaron una elevada cantidad de miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, destacando el extracto metanólico cuya concentración es aproximadamente 1,450 veces mayor a la reportada para un extracto similar (41.79 ± 1.36 mg EAG/g extracto) por Pereira (2016).

En el extracto acuoso de *S. lepidophylla*, Herrera *et al.* (2015) reportaron una concentración de compuestos fenólicos de 0.008 mg EAG/ g extracto, este valor es considerablemente inferior a la concentración presente en los cuatro extractos analizados de esta especie. El extracto acuoso de *G. globosa* presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos, que es 4,537 veces mayor a la reportada por Lin *et al.* (2015) para el extracto acuoso de flores de esta especie (4.83 ± 0.20 mg EAG/g extracto); el extracto metanólico y hexánico exhibieron menor concentración de estos compuestos en relación al extracto acuoso, sin embargo, al ser comparado con valores reportados para estos extractos (MeOH= 41.02 ± 0.049 y

Hex=57.12±0.265 mg EAG/g extracto) la concentración obtenida fue 371 y 115 veces mayor respectivamente (Hamiduzzaman *et al*, 2012).

Las concentraciones de compuestos fenólicos obtenidas en los extractos de las cuatro especies, son mayores a las reportadas en los antecedentes encontrados, estas concentraciones dependen de diversos factores entre los que se encuentra el órgano de la planta utilizado como material vegetal en el estudio, ya que la acumulación de los compuestos no es homogénea entre los órganos de la planta.

Uno de los grupos principales que forman parte de los compuestos fenólicos son los flavonoides, este grupo presenta 13 subclases, las de mayor interés farmacológico son: flavonas, flavonoles, isoflavonas, catequinas y flavononas; que presentan en su estructura una gran cantidad de grupos hidroxilos útiles en la captura de los radicales libres (Balasundram *et al.*, 2006; Reis, 2013; Tovar, 2013). Existen flavonoides que además de poseer actividad antioxidante, han demostrado actividad citotóxica y capacidad para inhibir el crecimiento y proliferación de células de cáncer humanas (Elansary, 2014); debido a ello, se consideró entre las técnicas a desarrollar la cuantificación de estos compuestos en los extractos mediante el ensayo NaNO₂-AlCl₃.

Los extractos metanólico y hexánico de *Agave potatorum* mostraron una baja concentración de flavonoides respecto a los valores reportados en extractos de *A. attenuata* (MeOH=3.048 y Hex= 0.433 mg EC/g extracto) por Rizwan *et al.* (2012), los resultados obtenidos en este trabajo se compararon entre especies del mismo género debido a que no se encontraron antecedentes para *A. potatorum*. El extracto metanólico de *R. purshiana* obtenido por Pereira (2016) presentó una concentración de flavonoides de 19.51 mg EQ/ g extracto, este valor es considerablemente mayor a las concentraciones determinadas en este estudio (Ac=0.175, MeOH=0.134, AEt=0.033 y Hex=0.023 mg EQ/g extracto).

No se encontraron antecedentes de cuantificación de flavonoides para *S. lepidophylla*, sin embargo, al comparar los valores obtenidos con los reportados por Sousa *et al.* (2012) para extractos de acetato de etilo (155.7±6.21 mg EC/g extracto) y etanólico (62.13±4.10 mg EC/g

extracto) de *S. convoluta*, las concentraciones obtenidas de flavonoides en este estudio son inferiores. El extracto acuoso de *G. globosa* (0.45mg ER/ g extracto) obtenido por Lin *et al.* (2015) mostró una concentración de flavonoides similar a la obtenida en el extracto hexánico (0.040 mg EQ/g extracto), e inferior respecto a las concentraciones presentes en los extractos restantes de esta especie (Ac=0.072, MeOH=0.291 y AEt=0.463 mg EQ/g extracto).

Los resultados muestran una mayor concentración de flavonoides en los extractos polares de *A. potatorum*, *R. purshiana* y *S. lepidohylla*; mientras que en *G. globosa* se observó mayor concentración en un extracto de menor polaridad. La presencia y variación en la concentración de los flavonoides en los cuatro extractos de cada especie se debe principalmente a la amplia polaridad de estos, que se atribuye a las sustituciones que presentan en su estructura química (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Entre los primeros pasos para la elucidación del mecanismo de acción de un antioxidante, se encuentra el establecimiento de correlaciones entre los ensayos y las cuantificaciones realizadas (Mesa *et al.*, 2010). Es por ello que se determinó la correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos y cuantificaciones mediante el método de Pearson (Tabla 18). Los resultados solo mostraron una correlación significativa entre compuestos fenólicos-ensayo DPPH y flavonoides-ensayo ABTS de los extractos de *R. purshiana*, lo cual indica que la actividad detectada mediante estos ensayos podría estar relacionada principalmente a la presencia de estos compuestos en los extractos de esta especie, sin embargo, no se encontraron estudios que corroboren esta correlación.

8.3. Perfil fitoquímico

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo: primario (encargado de la síntesis de los compuestos de principal necesidad) y secundario (produce compuestos que pueden presentar actividad biológica) (Villa *et al.*, 2011). Los metabolitos generados por el metabolismo secundario son sintetizados en respuesta a la adaptación de las plantas al medio, desempeñan una o varias funciones específicas en la planta que los posee y presentan una distribución limitada (Ávalos & Pérez, 2009). La actividad de los extractos obtenidos de plantas está

relacionada a la concentración y naturaleza de los compuestos que posee, es por ello que la determinación de los tipos de metabolitos presentes en un extracto es de suma importancia.

La fase móvil seleccionada para el análisis por cromatografía en capa fina (acetato de etilo-metanol-agua 100:13.5:10), es utilizada para el estudio de grupos de compuestos como: antraglicósidos, principios amargos, alcaloides, flavonoides y saponinas (Wagner & Bladt, 2001). Las placas se revelaron bajo luz uv de 254 nm (longitud de onda de excitación del indicador presente en la placa) y 365 nm, revelando bandas a 254 nm para dos extractos de *A. potatorum* (color: Café-AEt, verde-Hex), cuatro de *R. purshiana* (color: café-Ac, MeOH, AEt, Hex), dos de *S. lepidophylla* (color: café-MeOH, AEt) y tres de *G. globosa* (color: verde tonalidad baja-Ac, MeOH, verde tonalidad alta-AEt). Estas bandas podrían corresponder a los siguientes compuestos detectables a 254 nm: antraglicósidos, cumarinas, flavonoides, alcaloides, polifenoles, iridoides, cetonas, aldehídos, ácidos o esteres. Se observaron bandas a una longitud de 365 nm en tres extractos de *A. potatorum* (color: Magenta-MeOH y Hex, Púrpura-AEt), uno de *R. purshiana* (color: Turquesa-AEt), dos de *S. lepidophylla* (color: Turquesa-MeOH, Hex) y dos de *G. globosa* (color: magenta-MeOH, AEt). Las bandas observadas podrían corresponder a los siguientes compuestos detectables a 365 nm: terpenoides, principios amargos, glicósidos, saponinas, cumarinas, flavonoides o antraglicósidos (Sherma & Fried, 2005; Wagner & Bladt, 2001).

Utilizando una solución del revelador HS (hidrozibensaldehído-ácido sulfúrico), se detectó la presencia de posibles componentes de aceites esenciales y saponinas (color lavanda, rosa y púrpura en bandas) en el extracto de acetato de etilo y el hexánico de *A. potatorum*, en los cuatro extractos de *R. purshiana* y en los extractos metanólico y de acetato de etilo de *G. globosa*. En los extractos metanólico y de acetato de etilo de *S. lepidophylla* se observaron posibles feniletanoides (bandas color amarillo) (Gómez, 2011). Los valores de R_f determinados después de revelar la placa con la solución HS no se consideraron útiles para la elucidación de metabolitos específicos, esto debido a la falta de un compuesto de referencia y a que este valor puede variar fácilmente de acuerdo a la composición de la fase móvil, el tipo de fase estacionaria y la temperatura a la que se realizó el análisis. Sin embargo, de acuerdo a las fases utilizadas, aquellas bandas que mostraron un bajo valor de R_f podrían

indican la presencia de compuestos polares como alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, derivados de estos, entre otros; mientras que las bandas con un valor de R_f alto indicarían la presencia de alcanos, alquenos aromáticos, derivados de estos, entre otros (Koreeda, 2011).

La detección de los grupos de compuestos presentes en los extractos de las cuatro especies se realizó mediante técnicas específicas. Se detectó en los extractos de *A. potatorum* la presencia de fitoesteroles, carbohidratos, saponinas, aceites, grasas y compuestos fenólicos; algunos de estos metabolitos se han detectado en otras especies de Agave como *A. sisalana*, donde se detectó en un extracto acuoso de hojas la presencia de saponinas y otros compuestos como terpenos, glicósidos, taninos y flavonoides (Ade *et al.*, 2011). Se observó la presencia de aceites, cumarinas, compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides, proteínas y saponinas en los extractos de *R. purshiana*; los antecedentes de esta especie muestran (además de polifenoles, aceites y cumarinas) la presencia de antraglicosidos, taninos y ceras (Angeh, 2006; Estrada *et al.*, 2006; Karmakar *et al.*, 2014).

Los ensayos realizados en *S. lepidophylla* muestran la presencia de fitoesteroles, flavonoides, cumarinas, saponinas, proteínas, aceites, grasas y compuestos fenólicos; estos compuestos con excepción de los fitoesteroles han sido reportados en esta especie además de alcaloides, carbohidratos, terpenoides, lípidos, quinonas y taninos (Hernández, 2010; Meléndez *et al.*, 2014; Yobi *et al.*, 2012). En los extractos de *G. globosa* se encontraron flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, carbohidratos, aceites, compuestos fenólicos y grasas; estos compuestos ya se han detectado en esta especie en conjunto con taninos, quinonas, terpenos, esteroides, fitoesteroles y azúcares reductores (Arthi & Prasanna, 2016; Rufino *et al.*, 2011).

La variación observada en la concentración y tipo de metabolitos presentes en los extractos analizados está en función de factores como: el origen, tipo, grado de procesamiento y contenido de humedad del material vegetal; además de las características de la extracción (tiempo, tipo y temperatura de extracción; concentración y naturaleza del solvente) (Tiwari *et al.*, 2011).

9. CONCLUSIONES

El conocimiento adquirido de generación en generación por los médicos tradicionales continúa siendo una fuente confiable para el análisis de nuevas especies vegetales con potencial actividad citotóxica, como las que se seleccionaron para este trabajo (*Agave potatorum*, *Rhamnus purshiana*, *Selaginella lepidophylla*).

Los extractos de Acetato de etilo de *A. potatorum* y *G. globosa* presentaron mayor actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7, sin embargo, no mostraron toxicidad en *A. salina*. El extracto de *A. potatorum* mostró actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS presentando el menor valor de CI_{50} entre los extractos de esta especie. Mientras que en el extracto de *G. globosa* se observó actividad antioxidante con el ensayo DPPH y ABTS, los valores de CI_{50} fueron inferiores a los que presentó el extracto hexánico que posee también actividad citotóxica. Los extractos de ambas especies mostraron gran concentración de compuestos fenólicos y la presencia de grupos de metabolitos de distinta naturaleza.

El resto de los extractos que no mostraron actividad citotóxica presentaron actividad antioxidante y una buena concentración de compuestos fenólicos, estos extractos podrían contemplarse como una fuente de compuestos antioxidantes.

10. PERSPECTIVAS

Realizar análisis químicos que permitan elucidar los metabolitos responsables de la actividad citotóxica presentes en los extractos de acetato de etilo y hexánicos de *A. potatorum* y *G. globosa*.

Establecer una correlación entre la actividad citotóxica y antioxidante de los extractos de acetato de etilo y hexánicos de *A. potatorum* y *G. globosa*.

Determinar el mecanismo de acción de los compuestos activos.

Valorar la factibilidad de realizar ensayos en otras líneas celulares con los extractos que no presentaron toxicidad en *A. salina* y citotoxicidad en la línea celular MCF-7, con el fin de detectar posibles compuestos activos específicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aarland, R.C., Peralta Gómez, S., Morales Sánchez, C., Parra Bustamante, F., Villa Hernández, J.M., Díaz de León Sánchez, F., Pérez Flores, L. J., Rivera Cabrera, F. & Mendoza Espinosa, J.A. (2015). A pharmacological and phytochemical study of medicinal plants used in Mexican folk medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 14(4):550-557.
- Adams, R.P., Kendall, E. & Kartha, K.K. (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(2):107-110.
- Ade Ajayi, A.F., Hammuel, C., Ezeayanso, C., Ogabiela, E.E., Udiba, U.U., Anyim, B. & Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7):180-183.
- Agrawal, R.C. & Pandey, S. (2013). Evaluation of anticarcinogenic activity of herbal medicinal plant *Aloe vera* in Swiss albino mice. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3(2):1-6.
- Alam, S., Katiyar, D., Goel, R., Vats, A. & Mittal, A. (2013). Role of herbals in cancer management. *The Journal of Phytopharmacology*, 2(6):46-51.
- Alegría Herrera, E.Y. (2016). Efecto de fracciones orgánicas de *Agave angustifolia* Haw sobre deterioro cognitivo e inmunomodulación. Tesis, Instituto Politécnico Nacional. México.
- Alonso Castro, A.J., Villareal, M.A., Salazar Olivo, L.A., Gómez Sánchez, M., Domínguez, F. & García Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133:945-972.
- American Cancer Society & American Joint Committee on Cancer (2009). *Breast Cancer Staging*. 7 Ed.1-2.
- American Cancer Society (2016). *Breast Cancer*. American Cancer Society. 127.
- André, A.C.G.M., Dias, D.A., Pereira, P.S., Abreu, L.C.P. & França, S.C. (2003). Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de célula e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(2):22-24.

- Angeh, J.E. (2006). Plants containing chemotherapeutic activity. University of Pretoria Ed.
- Arencibia Arrebola, D.F., Rosario Fernández, L.A. & Curveco Sánchez, D.L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *RETEL, Revista de toxicología en línea*. 40-52.
- Arthi, V. & Prasanna, G. (2016). HPTLC finger print and in vitro antioxidant activity of *Gomphrena globosa* L. flowers. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 39(1):208-215.
- Arung, E.T., Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Kusuma, I.W., Yulia, D. & Sandra, F. (2009). Anticancer Properties of Diethyleter Extract of Wood from Sukun (*Artocarpus artilis*) in Human Breast Cancer (T47D) Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8:317-324.
- American Type Culture Collections “ATCC” (2012). Thawing, Propagating and Cryopreserving Protocol: NCI-PBCF-HTB22 (MCF-7). Protocol.
- American Type Culture Collections “ATCC” (2013). Breast cancer and normal cell lines. Catalogue.
- American Type Culture Collections “ATCC” (2016). MCF-7 (ATCC HTB®-22™). Recuperado el 25 de mayo de 2017 de: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#generalinformation>
- Avalos Soto, J. (2014). Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) de origen regional (Ébano, San Luis Potosí) comparada con la comercializada en la India. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Baharum, Z., Akim, A.M., Taufiq-Yap, Y. H., Abdul Hamid, R. & Kasran, R. (2014). In vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of *Theobroma cacao*. *Molecules*, 19:18317-18331.
- Balachandran, P. & Govindarajan, R. (2005). Cancer an ayurvedic perspective. *Pharmacological research*. 51:19-30.
- Balasundra, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99:191-203.
- Bautista Castellanos, A.I., Velasco Velasco, V.A., Ruíz Lunas, J., Guzmán Sebastián, K.C., Montañó Lugo, M.L. & Jiménez Zarate, M.T. (2015). Usos del *Agave potatorum* Zucc en Oaxaca. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 2(2):51.
- Bennett, L.L., Rojas, S. & Seefeldt, T. (2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 4(4):215-222.

- Bhanot, A., Sharma, R. & Noolvi, M.N. (2011). Natural sources as potential anticancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine*. 3: 9-26.
- Breastcancer.org (2015). Tratamientos y efectos secundarios: Quimioterapia. Recuperado el 23 de mayo de 2017 de: http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/quimioterapia?gclid=CjwKEAjwu4_JBRDpgs2RwsCbt1MSJABOY8an6VEc_W4dZQlNMYwN02eFUVfyYKuNuewxMaZYFHCTThoCFZbw_wcB
- Bussmann, R.W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruíz, D., Saleda, J., Martínez, M., Carrillo, L., Walker, K., Kuhlman, A. & Townesmith, A. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 137:121-140.
- Castro Díaz, S.L. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseria laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Castro Mejía, J., Castro Barrera, T., Arredondo Figueroa, J. L., Hernández Hernández, L. H. & Castro Mejía, G. (2009). La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. *Contactos*, 73:5-15.
- Capataz Tafur, J., Orozco, S., R. Vergara R. & R. Hoyos S. (2007). Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en condiciones de laboratorio. *Facultad Nacional de Agronomía en Medellín* 60(1): 3703-3715.
- Cartaya, O. & Reynaldo, I.(2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2):5-14.
- Chanda, S. & Nagani, K. (2013). *In vitro* and *in vivo* methods for anticancer activity evaluation and some indian medicinal plants possessing anticancer properties: An overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(2): 140-152.
- Consenso Mexicano de Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario (2013). Consenso mexicano de diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Coord. Cárdenas Sánchez, J., Bargalló Rocha, E., Erazo Valle, A., Maafs Molina, E. & Poitevin Chacón, A. 5 rev.
- Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G. & Sumaya Martínez, M.T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 50:10-15.
- Díaz Leal, A.M., Uribe, J., Gutiérrez, A., Torres Torres, N., Palacio Tovar, A.R. & Noriega, L.G. (2017). Agavaceae extract comprising steroidal saponins to treat or prevent metabolic disorder related pathologies. Patente: WO2017064530A1. Instituto

- Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. Research Journal, 2(4):119-122.
- Endrini, S., Suherman & Widowati, W. (2015). Antioxidant activity and anticarcinogenic properties of combination extract of Soursop (*Annona muricata* L.) and Pearl Grass (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam) Malaysian Journal of Analytical Sciences, 19(2):284-290.
- Escobar M., L., Rivera, A. & Aristizábal Q., F.A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *VITAE*. 17(1): 67-74.
- Esquivel Gutiérrez, E.R., Noriega Cisneros, R., Bello González, M.A., Saavedra Molina, A. & Salgado Garcigía, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *BIOLÓGICAS*. 14(1): 45-52.
- Estanislao Gómez, C.C., Ordaz Pichardo, C., San Martín Martínez, E., Pérez Hernández, N., Pérez Ishiwara, G. & Gómez García, M. C. (2016). Cytotoxic effect and apoptotic activity of *Parmentiera edulis* DC. hexane extract on the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6:015-022.
- Estévez Carmona, M.M., Narvaéz Morales, J., Barbier Oliver, C. & Meléndez Camargo, M.E. (2013). Molecular mechanisms involved in the protective effect of the chloroform extract of *Selaginella lepidophylla* (Hook. et Grev.) Spring in a lithiasic model. *Urolithiasis*, 41:205-215.
- Estrada López, R.J., Mata Serpas, N.A. & Velasco Sibrián, S.C. (2006). Análisis de posibles adulteraciones y falsificaciones en cinco especies vegetales de mayor comercialización en el país. Tesis. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Estrada Muñiz, E., Guerrero Palomo, G. & Vega, L. (2012). Natural products: New anticancer agents derived from plants. *Current Topics in Toxicology*, 8:19-32.
- Félix Valdez, L.I. (2014). Patrones de diversidad y estructura genética de *Agave potatorum* Zucc e implicaciones en su manejo in situ. Tesis. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México.
- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sariago Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., Scull Lizama, R. & Gutiérrez Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible

- acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*, 61(3):254-258.
- Ferraz Filha, Z. S., Lombardi, J. A., Guzzo, L. S. & Saude Guimaraes, D. A. (2012). Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. *Rev Brass Pl Med Botucatu*, 14(2):358-361.
- Figuerola Soto, C.G., Iturriaga, G. & Valenzuela Soto, E.M. (2004). Actividad de Trehalosa-6-fosfato sintasa en plantas de *Selaginella lepidophylla* en respuesta a hidratación y desecación. *Rev Fitotec Mex*, 27(1):17-22.
- Flores Hernández, F.Y. (2009). Evaluación de la eficacia en el tratamiento de neoplasias de un producto herbario. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.
- Fuchs Tarlovsky, V. (2013). Role of the Antioxidants in Cancer Therapy. *Nutrition*, 29:15-21.
- García Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc (Agavaceae): Nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, 91:71-93.
- García Rojas, M I., Mayoral García, M., Pintor Sill, J. R., Malvaez Montesanos, N., Méndez Méndez, P. M., Sánchez Sánchez, M. & Velásquez Paz, A. (2011). Perfil epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en Oaxaca 2000-2010. *Rev Eviden Invest Clin*, 4(1):10-14.
- García Triana, B.E., Saldaña Bernabeu, A. & Saldaña García, L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 12(2):187-196.
- Garza Ocañas, L. (1990). Citotoxicidad *in vitro*: Estudio del potencial de diversas líneas celulares en la evaluación de toxicidad de sustancias. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
- Gechey, T.S., Hille, J., Woerdenbag, H.J., Benina, M., Mehterov, N., Toneva, V., Fernie, A.R. & Mueller Roeber, B. (2014). Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.005>
- Gheno Heredia, Y.A. (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 de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México.

- Giavina Bianchi, P.F., Castro, F.F.M., Machado, M.L.S. & Duarte, A.J.S. (1997). Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 79:449-454.
- Gilman, E.F. & Howe, T. (2014). *Gomphrena globosa*, Globe Amaranth. *IFAS Extension*, University of Florida, FPS.234.
- Gómez Aguirre, Y.A. (2011). Identificación estructural de compuestos mayoritarios en plantas silvestres de *Castilleja tenuiflora* Benth y su acumulación en cultivos de raíces in vitro. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.
- Gómez Dantés, H., Lamadrid Figueroa, H., Cahuana Hurtado, L., Silverman Retana, O., Montero, P., González Robledo, M. C., Fitzmaurice, C., Pain, A., Allen, C., Dicker, D. J., Hamavid, H., López, A., Murray, C., Naghavi, M., & Lozano, R. (2016). The burden of cancer in Mexico 1990-2013. *Salud pública de México*, 58(2):118-131.
- González Jiménez, F.E., Hernández Espinosa, N., Cooper Bribiesca, B.L., Núñez Breton, L.C. & Reyes Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Vertientes*, 18(1):16-21.
- Gupta, M.P. (2006). Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador and Peru. Report. United Nations Industrial Development Organization Andean Products-High Plateau and Central Valleys.
- Hamiduzzaman, Md., Dey, A., Hossain, Md. M. & Zafrul Azom, A.T.M. (2012). Investigation of biological properties of *Gomphrena globosa* (L), family Amaranthaceae. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8):4230-4232.
- Hamiduzzaman, Md. & Zafrul Azam, A.T.M. (2012). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Gomphrena globosa* (L.). *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 15(2):183-185.
- Hamiduzzaman, Md. (2014). Evaluation of anti-diarrheal activity of *Gomphrena globosa* (L.) in animal model. *ASA University Review*, 8(1):219-223.
- Hanks, A.K. (2000). Cancer and traditional chinese medicine: treating the side effects of chemotherapy and radiation with traditional chinese herbs. *Eastland Press*. 1-14.
- Hernández Derramadero, F. (2010). Búsqueda de metabolitos secundarios con acción hipocolesterolemizante a partir de *Selaginella lepidophylla* (Hook. Grev) Spring. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hernández Sosa, E., Mora González, Néstor., Morris Quevedo, H.J., Delgado Cobas, L., Martínez Manrique, C.E. (2012). Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas. Recuperado el 27 de junio del 2016 de: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol32_1_13/ibi10113.htm

- Herrera Carrera, E., Moreno Jimenez, M.R., Rocha Guzmán, N.E., Gallegos Infante, J. A Díaz Rivas, J.O., Gamboa Gómez, C.I. & González Laredo, R.F. (2015). Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflamtory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. *Cogent Food & Agriculture*, 1:1059033.
- Instituto Mexicano del Seguro Social “IMSS” (2015). Cáncer de mama. Recuperado el 21 de mayo de 2017 de: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía “INEGI” (2005). Mujeres y hombres en Oaxaca. Reporte de datos nacionales.
- International Agency for Research on Cancer (2014). Breast Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention, 7(1):1-23.
- Ionis, P., Anastasis, S. & Andreas, Y. (2015). Graviola: A systematic review on its anticancer properties. *American Journal of Cancer Prevention*. 3(6):128-131.
- Karchesy, Y.M., Constantine, G. & Karchesy, J.J. (2016). Biological screening of selected pacific northwest forest plants using th Brine Shrimp (*Artemia salina*) toxicity assay. *SpringerPlus*, 5(510):1-9.
- Karmakar, P.R., Kyal, C.K. & Mondal, I. (2014). A review on herbs used in cancer. *Ind Res J Pharm & Sci*, 1(1):23-32.
- Kim, D-O., Jeong, S. W. & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81:321-326.
- Khade, K.V., Dubey, H., Tenpe, C.R., Yeole, P.G. & Patole, A. M. (2011). Anticancer activity of the ethanolic extracts of Agave americana leaves. *Pharmacology online*, 2:53-58.
- Knaul, F. M., Arreola Ornelas, H., Velázquez, E., Dorantes, J., Méndez, O. & Ávila Burgos, L. (2009). El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S286-S295.
- Koreeda, M. (2011). Thin-Layer Chromatography (TLC). Chem 216 S11 Notes.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. & Etherton, T. D. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 (9B).
- Kumar Mishra, P., Venkata Raghuram, G., Bhargava, A., Ahirwar, A., Samarth, R., Upadhayaya, R., Kumar Jain, S. & Pathak, N. (2011). In vitro and in vivo evaluation of the anticarcinogenic and cancer chemopreventive potential of a flavonoid-rich

- fraction from a traditional Indian herb *Selaginella bryopteris*. *British Journal of Nutrition*, 106:1154-1168.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G. & Troncoso, A. M. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 25(4): 726-732.
- Lakhar, S., Kalita, P. & Chakraborty, A. (2015). An overview on properties. Therapeutic efficacy of the indian magical herb “Sanjeevani”. *Am J Pharm Heath Res*, 3(2).
- Lam, M. (2003). Beating cancer with natural medicine. ISBN:1-4107-3244-4.
- Lans, C. (2007). Etnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(13):1-12.
- Larson Guerra, J. & Neyra, L. (2004). Programa de recursos biológicos colectivos. CONABIO. *Biodiversitas*, 53:1-15.
- Latha, S.T. & Rajendran, N.N. (2013). Apoptosis effect of isolated phenolic seoiridoid glucoside from aerial parts of *Gomphrena globosa* in A-431 cell lines. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(5):3829-3839.
- Leos Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.
- Lin, C.G., Gen, C.S., Qing, X.Y., Fu, C., Ying, Z.Y., Xia, L.C. & Qing, G.Y. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17:243-249.
- Lin, L., Liu, L., Chiang, L. & Lin, C. (2002). In vitro antihepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research*, 16(5):440-444.
- López Tello, P. & Pérez Roncero, L. (2010). Dispensación de complementos alimenticios. *Farmacia Profesional*, 24(4):48-55.
- Lozano Ascencio, R., Gómez Dantés, H., Lewis, S., Torres Sánchez, L. & López Carrillo, L. (2009). Tendencias del cáncer de mama en América Latina y El Caribe. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S147-S156.
- Mancilla Margalli, N.A. (2006). Caracterización molecular de fructanos en *Agave* y *Dasyllirion spp*. Identificación de fructosiltransferasas y su expresión en *Pichia pastoris*. Tesis. Instituto Politecnico Nacional. Guanajuato, México.

- Martínez Hormaza, L., Quintero Rodríguez, G., Márquez Montiel, L., González Lacaut, J.A., Álvarez Reyes, A. & Zarragoitía, A. (2006). Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el método de la *Artemia salina*. *Acta Farm Bonaerense*, 25(3):429-431.
- Martínez Ramírez, S., Trinidad Santos, A., Robles, C., Galvis Spinola, A., Hernández Mendoza, T.M., Santizo Rincón, J.A., Bautista Sánchez, G. & Pedro Santos, E.C. (2012). Crecimiento y sólidos solubles de *Agave potatorum* Zucc. inducidos por riego y fertilización. *Rev Fitotec Mex*, 35(1):61-68.
- Martínez Ramírez, S. & Bautista Sánchez, G. (2013). Adaptabilidad de *Agave potatorum* Zucc a las condiciones ambientales y socioeconómicas de Río Azucena, San Juan Mixtepec, Oaxaca. *Temas de ciencia y Tecnología*, 17(50):3-12.
- Martínez Vázquez, J.B. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca, México.
- Meléndez Camargo, M.E., Contreras León, I. & Silva Torres, R. (2014). Diuretic effect of alkaloids fraction extracted from *Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev) Spring. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(1):92-99.
- Méndez Sánchez, Laura Isabel (2016). Actividad hipoglucémica de plántulas *in vitro* de *Azadirachta indica*. Tesis. Universidad del Papaloapan. Oaxaca, México.
- Mesa Vanegas, A.M., Gaviria, C.A., Cardona, F., Sáez Vega, J. A., Trujillo, S. B. & Rojano, B. A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Rev. Cubana Plant Med.* 15(2). Versión online: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol_15_2_10/pla03210.htm
- Moreno Escobar, J. A., Bazaldúa, S., Villarreal, M. L., Bonilla Barbosa, J. R., Mendoza, S. & Rodríguez López, V. (2011). Cytotoxic and antioxidant activities of selected Lamiales species from Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 1-6.
- Mota Carrillo, E.O., Osuna Fernández, A.M. & Osuna Fernández, H.R. (2013). Germinación de semillas de maguey papalometl (*Agave cupreata*) con tratamiento de escarificación. Congreso Mexicano de Botánica.
- Muñoz Juárez, M.A. & Gutiérrez, D.M. (2008). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol. Reporte de investigación. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Murillo, G., Naithani, R. & Mehta, R.G. (2008). Efficacy of herbal products in colorectal cancer prevention. *Current Colorectal Cancer Reports*, 4:34-42.

- Nahak, G. & Sahu, R. K. (2010). In vitro antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *Nature and Science*, 8(4):22-28.
- Narod, S. A. (2009). Screening for BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Mexico: The public health perspective. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S191-S196.
- Nassr-Allah, A. A., Aboul-Enein, A. M., Aboul-Enein, K. M., Lightfoot, D. A., Cocchetto, A. & El-Shemy, H. A. (2009). Anticancer and antioxidant activity of some Egyptian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(10):799-808.
- Nataru, S., Pulicheria Y. & Gaddala, B. (2014). A review on medicinal plants as a potential source of cancer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and. Research*. 26 (1): 235-248.
- National Cancer Control Programme (2015). Diagnosis, staging and treatment of patients with breast cancer. National Clinical Effectiveness Committee, 8.
- National Cancer Institute “NCI” (2012). What you need to know about Breast Cancer. U. S. Department of Health and Human Services, National Instituto of Health; 1-46.
- National Comprehensive Cancer Network “NCCN” (2015). Breast Cancer. Clinical Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines), v 3.
- Nigenda G., Caballero M. & González Robledo, L. M. (2009). Barreras de acceso al diagnóstico temprano del cáncer de mama en el Distrito Federal y en Oaxaca. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S254-S262.
- Ongito, R.A. (2011). Rhamnaceae family as a source of herbal and conventional medicines. Thesis. University of Nairobi.
- Organización Mundial de la Salud “OMS” (2015). Cáncer de mama: prevención y control. Recuperado el 21 de mayo de 2017 de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>
- Organización Mundial de la Salud “OMS” (2016). *Cáncer*. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Orhan, I. (2012). Biotechnological production of plant secondary metabolites. *Bentham Science Publishers*, 262.
- Parra, A. L., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I. & Iglesias Buela, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the médium lethal dose (LD50) value in mice, determine oral acute toxicity plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5):395-400.

- Patil U. S. & Deshmukh, O. S. (2016). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used as traditional medicine. *Int J Pharm Bio Sci.* 7(1):77-81.
- Pehlivan Karakas, F., Yildirim, A. & Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology.* 36:641-652.
- Pereira Aranda, M. R. (2016). Determinación de la capacidad antioxidante de productos alimenticios derivados de plantas. Tesis. Universidad de Jaén.
- Pérez Leal, R., García Mateos, M. R., Martínez Vásquez, M. & Soto Hernández, M. (2006). Actividad Citotóxica y Antioxidante de *Petiveria alliacea* L. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 12(1):51-56.
- Pino Pérez, O. & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg*, 22(1):34-43.
- Ponce R. L., Cabana, M., Vaira, M. & Giunta, S. A. (2007). Bioensayos para determinar la toxicidad y la bioactividad de alcaloides de *Coronopus dydimus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5):268-269.
- Porter, P. L. (2009). Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S141-S146.
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical Techniques*. New India Publishing Agency. 5:19-22.
- Raja Kannan, R. R., Arumugam, R. & Meenakshi, S. (2010). Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents from seagrasses of Gulf of Mannar Biosphere Reserve, South India. (2)3:1526-1530.
- Ramos Lôbo, C. (2012). Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma revisão de literatura. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, 2:171-178.
- Reis Giada, M.L. (2013). Oxidative stress and chronic degenerative diseases – A role for antioxidants. INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/51687>
- Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M. & de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *Int J Mol Sci*, 13:6440-6451.
- Rodeiro, I., Alemán, C., Acosta, C.P., Gámez, R. & Alfonso, J.L. (2004). Evaluación citotóxica del D-002: una droga con actividad antiulcerosa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 35 (2): 109-112.

- Rodilla Calvelo, F. (2015). Mecanismos de Acción Antitumoral. Boletín Oncológico: área sanitaria de Teruel. Recuperado el 30 de mayo de 2016, de <http://www.boloncol.com/boletin-15/mecanismos-de-accion-antitumoral-2.html>
- Rufino Arcanjo, D.D., Oliveira Sena, I.V., Carvalho Medeiros de Albuquerque, A., Melo Neto, B., Citó Lopes Resende Santana, L., Branco Silva, N.C., Marilza Moita, M., das Graças Freire de Medeiros, M., dos Santos Soares, M.J., Campos de Andrade, N. & das Graças Lopes Citó, A.M. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10):208-215.
- Rupa, P. & Lakshi Bhavani, N. (2014). Diversity, conservation status and medicinal importance of *Selaginella* spp. International Science Congress Association, 74-88.
- Safarzadeh, E., Sandoghchian Shotorbani, S. & Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducer of apoptosis in cancer treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(Suppl 1): 421-427. doi: 10.5681/apb.2014.062
- Sánchez, L. & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense* Sw. Fundación Universitaria Juan de Castellanos.
- Sánchez, P.M., Villareal, M.L., Herrera Ruiz, M., Zamilpa, A., Jiménez Ferrer, E. & Trejo Tapia, G. (2013). In vivo anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and in vitro plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 150:1032-1037.
- Sánchez Pérez, A.F., Arroyo Becerra, A. & Villalobos López, M.A. (2017). No estaban muertas, andaban de parranda: El fenómeno de resurrección en las plantas, su posible origen y devenir natural. *Revista digital IPN*, 11-14.:
- Santos Zea, L., Rosas Pérez, A.M., Leal Díaz, A.M. & Gutiérrez Uribe, J.A. (2016). Variability in saponin content. Cancer antiproliferative activity and physicochemical of concentrated *Agave sap*. *Journal of Food Science*, Doi:10.1111/1750-3841.13376
- Schlaepfer, L. & Mendoza Espinoza, J.A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41 (4): 18-27.
- Segretín, M.E. (2008). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I: ¿Qué son y cómo se hacen los cultivos celulares? *ArgenBio*. 1:1-6.
- Shekhar, T. C. & Anju, G., (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn leaves. *American Journal of Ethnomedicine*. 1(4):244-249.

- Sherma, J. & Fried, B. (2005). Handbook of thin-layer chromatography. *Chromatographic science series*, 3ed. 89:1331.
- Sigma-Aldrich (2017). Agave (Agave sisalana). Plant Profiler. Merck. Recuperado el 26 de julio de 2017 de: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/nutrition-research/learning-center/plant-profiler/agave.html>
- Silva, L.R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil Izquierdo, A., Pinho, B.R. & Andrade, P.B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with celular and non-celular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135:756-763.
- Spóma Kucab, A. & Slawomir Wybraniec, E.H. (2016). High-speed counter-current chromatography in separation of betacyanins from flowers of red *Gomphrena globosa* L. cultivars. *Journal of Chromatography B*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.005>
- Sousa de Sá, P.G., Leite Guimarães, A., de Oliveira, A.P., de Siqueira Filho, J.A., Paviotti Fontana, A., Fonseca Damasceno, P.K., Rodrigues Cardoso Branco, C., Branco, A. & Guedes da Silva Almeida, J.R. (2012). Feoís totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Sleaginellaceae) *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, 33(4):561-566.
- Subsecretaria de gobierno y normatividad ambiental (2008). Doradilla (*Selaginella lepidophylla* Hook et Grev.). Manual que establece los criterios técnicos para el aprovechamiento sustentable de recursos forestales no maderables de clima templado-frio. 100-101.
- Sumithra P., Gricilda Shoba F.*, Vimala G., Sathya J., Sankar V., Saraswathi R. and Jayapriya G. (2014). Anticancer Activity of *Annona squamosa* and *Manilkara zapota* Flower Extract against MCF.7 cell line. *Der Pharmacia Sinica Journal*. 5:98-104.
- Sydiskis, R.J. & Owen, D.G. (1987). Aloe emodin and other anthraquinones and anthraquinone-like compounds from plants virucidal against herpes simplex viruses. United states patent. Patent number:4,670,265.
- Universidad Nacional Autónoma de México “UNAM” (2009). Cola de caballo (*Equisetum hyemale* L.). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 23 de julio de 2017 de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Equisetum%20hyemale&id=7166>
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1):98-106.

- Torres-Mejía, G. & Ángeles-Llerenas, A. (2009). Factores reproductivos y cáncer de mama: principales hallazgos en América Latina y el mundo. *Salud Pública de México*, 51 suppl:S165-S171.
- Tovar Corona, A., Vázquez Cuchillo, O., Moreno Luna, F.B. & Hernández Tosca, D. (2016). Sistema biotecnológico para reducción de cromo (VI) en aguas residuales. *Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales*, 3:163-174.
- Tovar del Río, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira.
- Van Den Berg, A.J.J., Radema, M.H. & Labadie, R.P. (1987). A high-yielding callus culture of *Rhamnus purshiana* by visual selection. *Journal of natural products*, 50(5):940-943.
- Vera Marín, B. (2014). Conocimiento tradicional e inventario de plantas medicinales en el corregimiento de San Cristóbal (municipio de Medellín, Antioquia). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Vega Ávila, E., Espejo Serna, A., Alarcón Aguilar, F. & Velasco Lezama, R. (2009). Cytotoxic activity of four mexican medicinal plants. *Proc.West.* 52:78-82.
- Venéreo Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2):126-133.
- Venket Rao, A. & Agarwal, S. (2000). Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5):563-569.Doi: 10.1080/07315724.2000.10718953
- Vettraino A.M., Hüberli, D., Swain, S., Smith, A. & Gaberloto, M. (2006). A new report of *Phytophthora ramorum* on *Rhamnus purshiana* in Northern California. *Plat Dis*, 90:246. Doi:10.1094/PD-90-0246C.
- Vides Porras, A. & Álvarez Castañeda, A. (2013). La medicina tradicional como un modelo de atención integral en salud. *Revista. Universidad del Valle de Guatemala*. 25: 58-60.
- Villa Ruano, N., Pacheco Hernández, Y., Lara Zaragoza, E.B., Franco Monsreal, J., Cardeña Bozziere, I.M. Galvart Valencia, O.T. & Ruíz Gómez, L.M. (2011). *Temas de Ciencia y Tecnología*, 15(43):13-20.
- Wagner, H. & Bladt, S. (2001). Plant Drug Analysis. A Thin-Layer Chromatography Atlas. *Springer*, 2nd ed.

- Waize Bucay, J. & Martínez Rico, I.M. (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista ADM*, 68(2):73-88.
- World Health Organization “WHO” (2010). Guidelines for management of Breast Cancer. *EMRO Technical Publications Series*, 31.
- Yalko, M., Rhodes, C. J., Moncola, M., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1-40.
- Yobi, A., Wone, B.W.M., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J. & Cushman, J.C. (2012). Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait. *The Plant Journal*, 72:983-999.
- Yu, S., Yan, H., Zhang, L., Shan, M., Chen, P., Ding, A. & Yau Li, S.F. (2017). A review on the phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics of amentoflavone a naturally-occurring biflavonoid. *Molecules*, 22, 299. Doi: 10.3390/molecules22020299
- Zorrilla García, A. E., Eirez Izquierdo, M. & Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 23(1): supl. 1.

12. ANEXOS

Anexo 1. Formato de entrevista	84
Anexo 2. Nauplios de <i>Artemia salina</i> utilizados en el ensayo de toxicidad	86
Anexo 3. Células de la línea MCF-7 utilizadas en el ensayo SRB	86
Anexo 4. Curvas de los controles utilizados en el ensayo SRB	87
Anexo 5. Curva trolox para el ensayo de captación del radical DPPH	88
Anexo 6. Curva trolox para el ensayo de captación del radical ABTS	88
Anexo 7. Curva de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos	89
Anexo 8. Curva de quercetina para la cuantificación de flavonoides	89
Anexo 9. Solución HS	90
Anexo 10. Reactivo Mayer	90
Anexo 11. Reactivo Wagner	90
Anexo 12. Solución de Fehling	90
Anexo 13. Resultados de la encuesta	91
Anexo 14. Cálculo del CI_{50} para el ensayo de captación del radical DPPH	94
Anexo 15. Cálculo del CI_{50} para el ensayo de captación del radical	95
Anexo 16. Correlación de Pearson para resultados del ensayo DPPH y cuantificación de compuestos fenólicos	97
Anexo 17. Correlación de Pearson para resultados del ensayo DPPH y cuantificación de flavonoides	98
Anexo 18. Correlación de Pearson para resultados del ensayo ABTS y cuantificación de compuestos fenólicos	99
Anexo 19. Correlación de Pearson para resultados del ensayo ABTS y cuantificación de flavonoides	101
Anexo 20. Fichas informativas de las especies seleccionadas	103

Anexo 1. Formato de entrevista

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA
JAEI JARIM AGUILAR RAMIREZ

ENCUESTA: Plantas Medicinales para el tratamiento del cáncer y sus síntomas.

___ Jugo

INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

INFORMACIÓN GENERAL DE LA PLANTA

Nombre Común: _____

Nombre científico: _____

Hábitat: _____

COLECTA DE LA PLANTA

Lugar: _____

Temporada de colecta: _____

Tratamiento/manipulación _____

Estadio de la planta: _____

___ Durante la floración ___ Antes de florear
___ Después de la floración

TIPO DE CÁNCER PARA EL QUE SE UTILIZA:

___ Mama

___ Colon

___ Cérvico-uterino

___ Próstata

___ Pulmón

___ Leucemia

___ Hígado

___ Riñón

___ Estómago

___ Ovario

___ Laringe

___ Bronquios

___ Cerebro

___ Páncreas

Otro: _____

ACTIVIDAD RELACIONADA ADEMÁS DE LA ANTICANCERÍGENA:

___ Si

¿Cuál?

___ No

ÓRGANO UTILIZADO:

___ Hojas

___ Raíz

___ Tallos

___ Fruto

___ Corteza

___ Flores

___ Rizoma

___ Bulbo

PREPARACIÓN:

☐ Planta sola

☐ Planta en combinación con otra

Nombre:

Parte utilizada:

SECADO Y CONSERVACIÓN

Secado: ☐ Si
☐ No

Método _____

Conservación: _____

MÉTODO DE PREPARACIÓN

☐ Infusión

☐ Decocción

☐ Inhalación

☐ Jarabe

☐ Cataplasma

☐ Maceración

☐ loción

☐ Baño

☐ Compresa

☐ tintura

☐ colirio

☐ Enjuague bucal

☐ Irrigación

Otro: _____

ADMINISTRACIÓN

Dosis:

Población dirigida: ☐ Adultos ☐ Niños ☐ Jóvenes

Sexo: ☐ Hombre ☐ Mujer

Modo de consumo: _____

NOTAS:

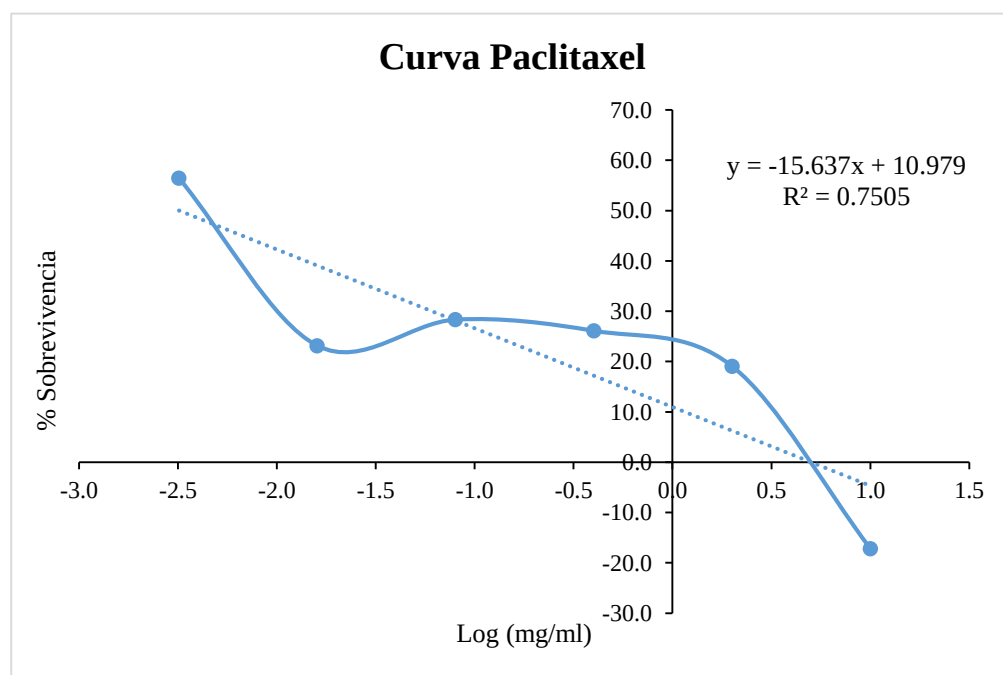
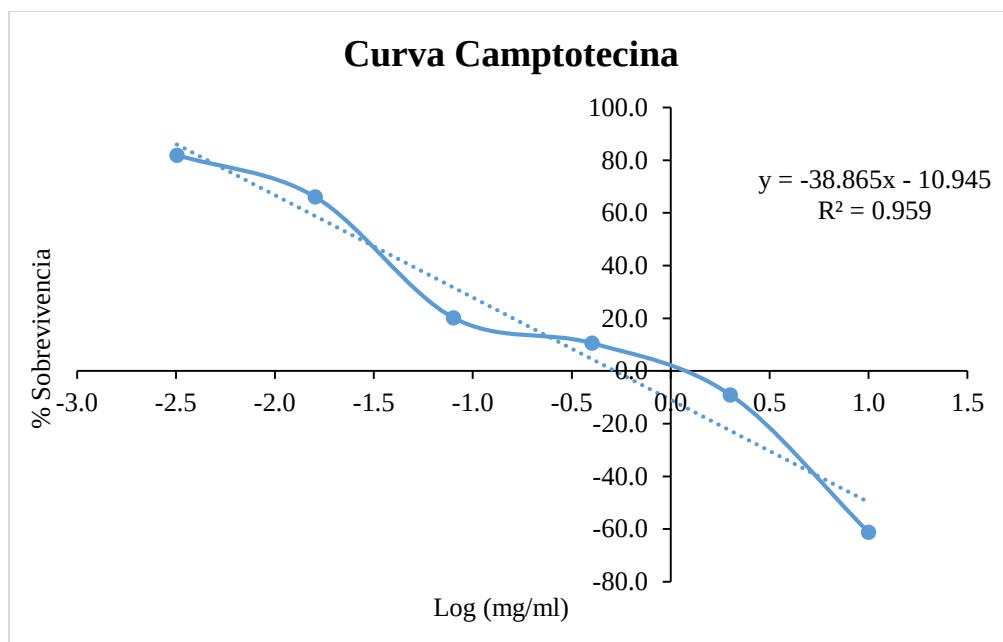
Anexo 2. Nauplios de *Artemia salina* utilizados en el ensayo de toxicidad



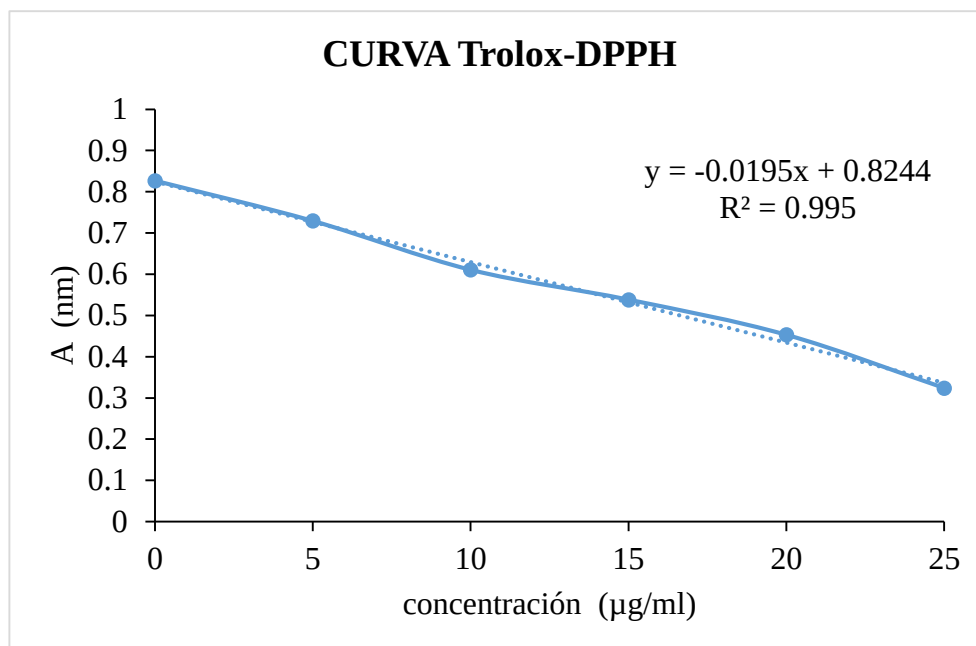
Anexo 3. Células de la línea MCF-7 utilizadas en el ensayo SRB



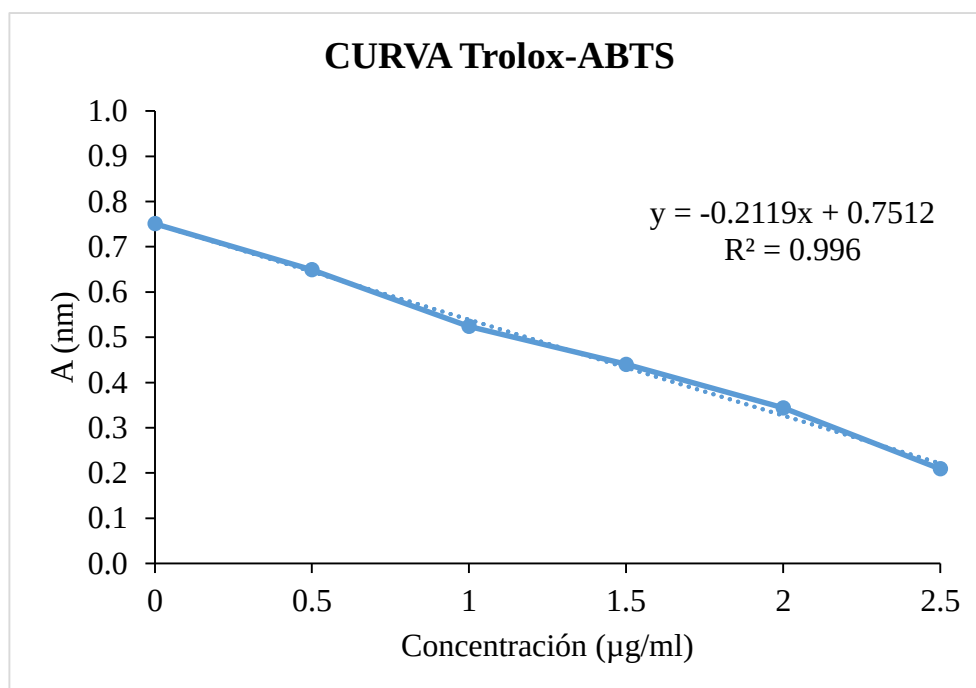
Anexo 4. Curvas de los controles utilizados en el ensayo SRB



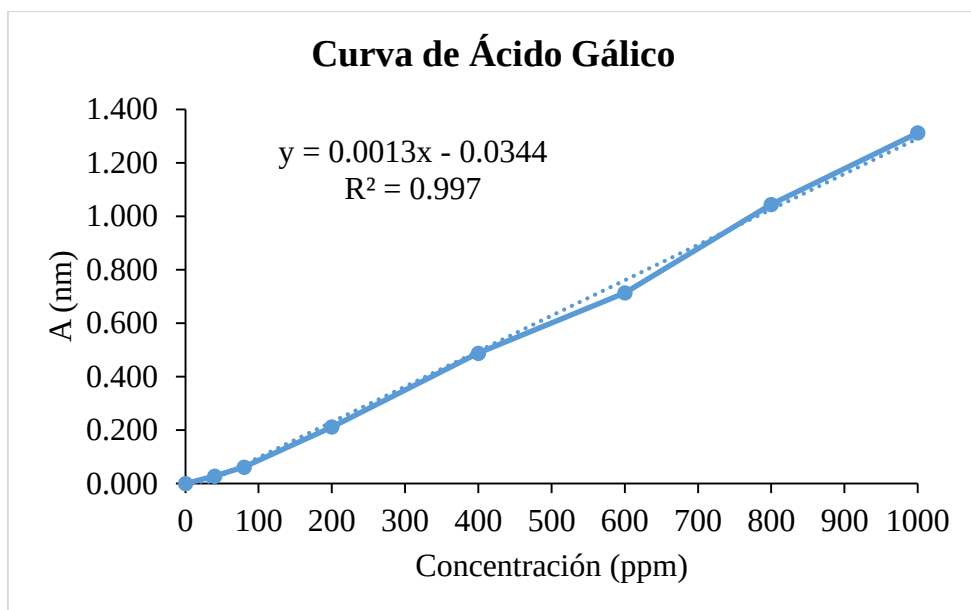
Anexo 5. Curva trolox para el ensayo de captación del radical DPPH[•]



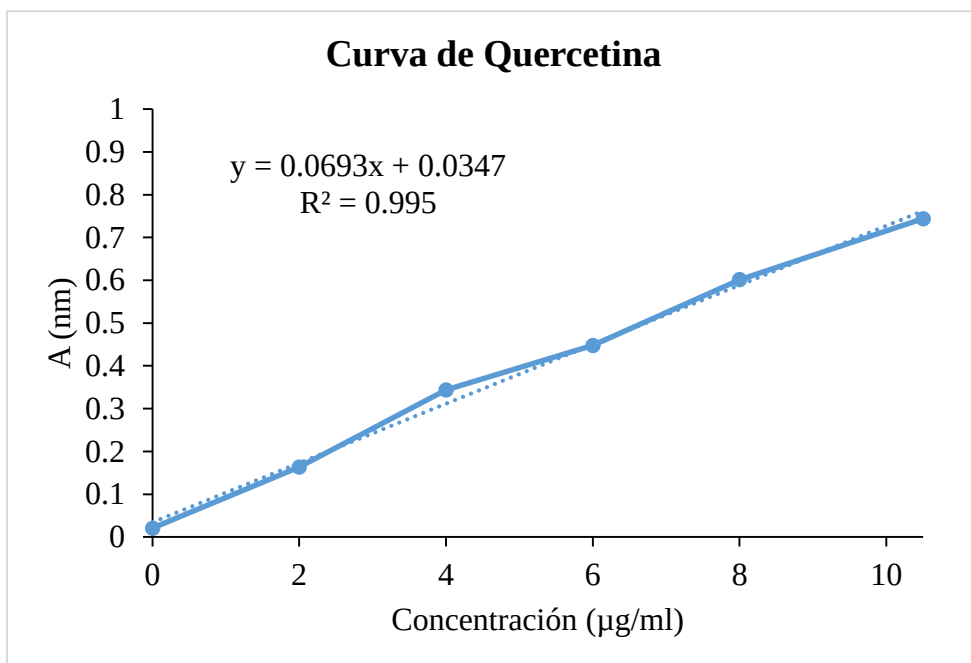
Anexo 6. Curva trolox para el ensayo de captación del radical ABTS^{•+}



Anexo 7. Curva de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos



Anexo 8. Curva de quercetina para la cuantificación de flavonoides



Anexo 9. Solución HS

5 mg de 4-hidroxibenzaldehido

900 ml de etanol

100 ml de ácido sulfúrico

Anexo 10. Reactivo Mayer

13.58 g de cloruro de mercurio

50 g de yoduro de potasio

1 L de agua destilada

Anexo 11. Reactivo Wagner

12.7 g de yodo

20 g de yoduro de potasio

1L de agua destilada

Anexo 12. Solución de Fehling

A. 34.66g de sulfato de cobre

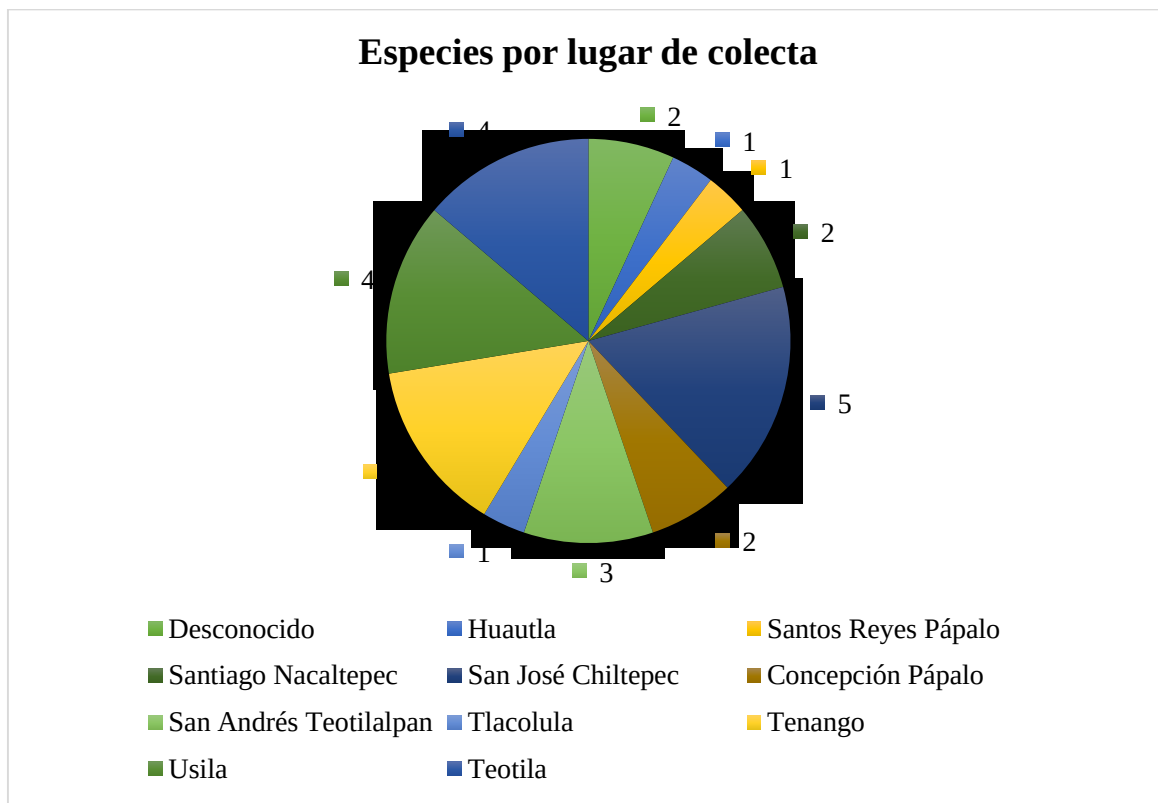
0.5L de agua destilada

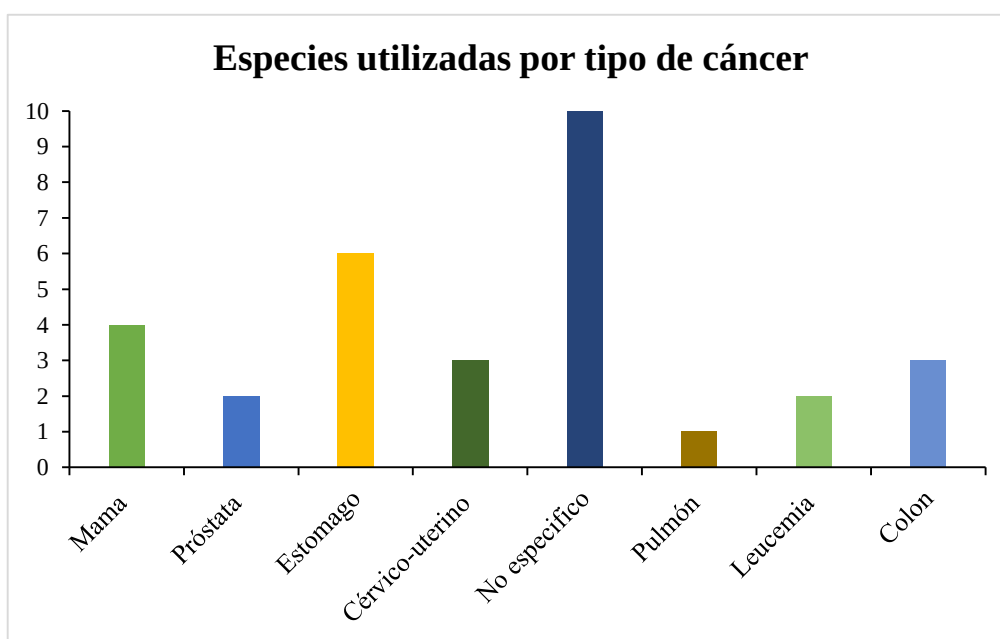
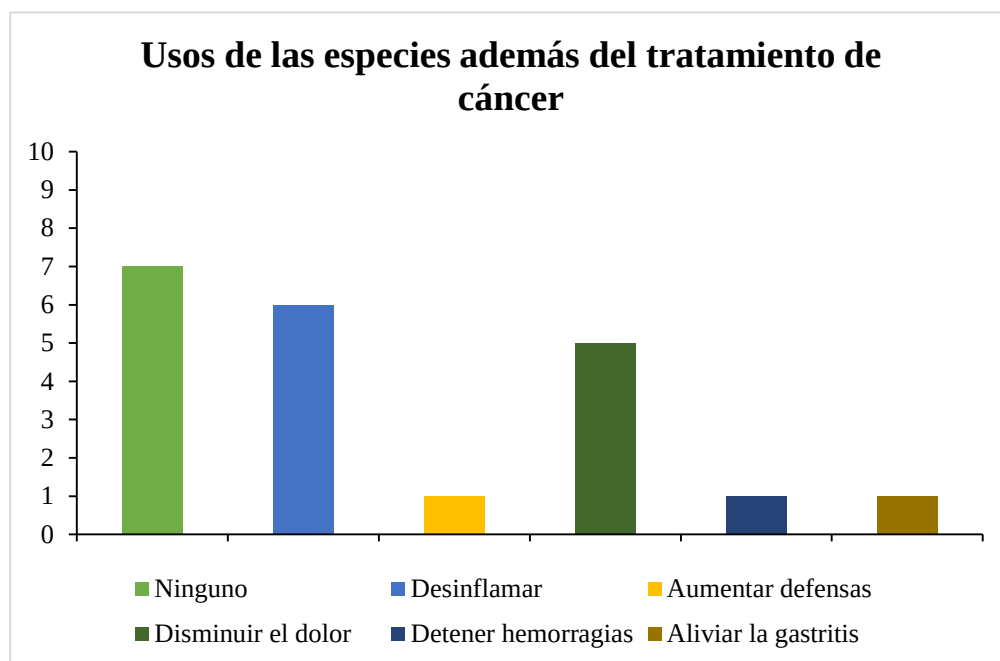
B. 173 g de tartrato sódico y potásico

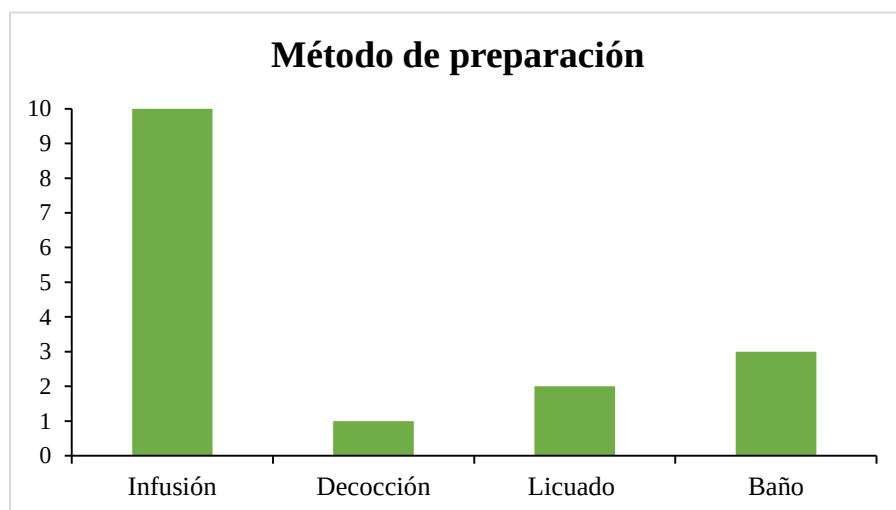
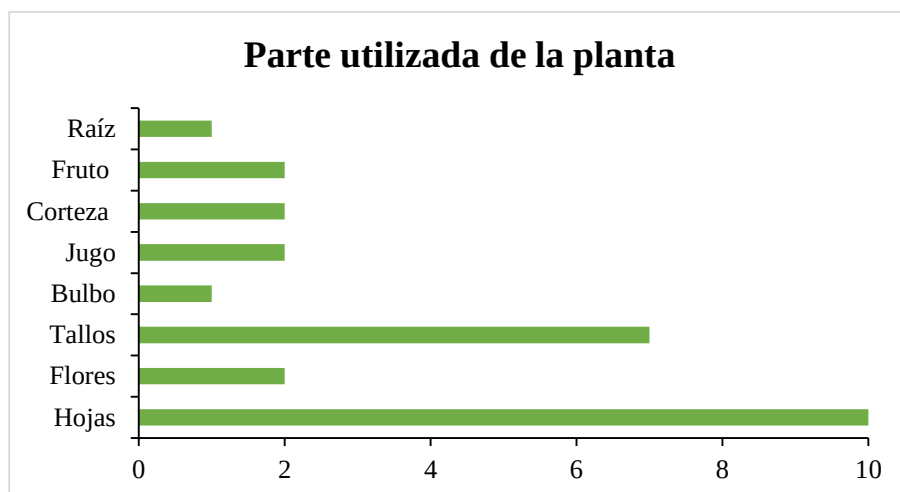
50 g de hidróxido de sodio

0.5 L de agua destilada

Anexo 13. Resultados de la encuesta







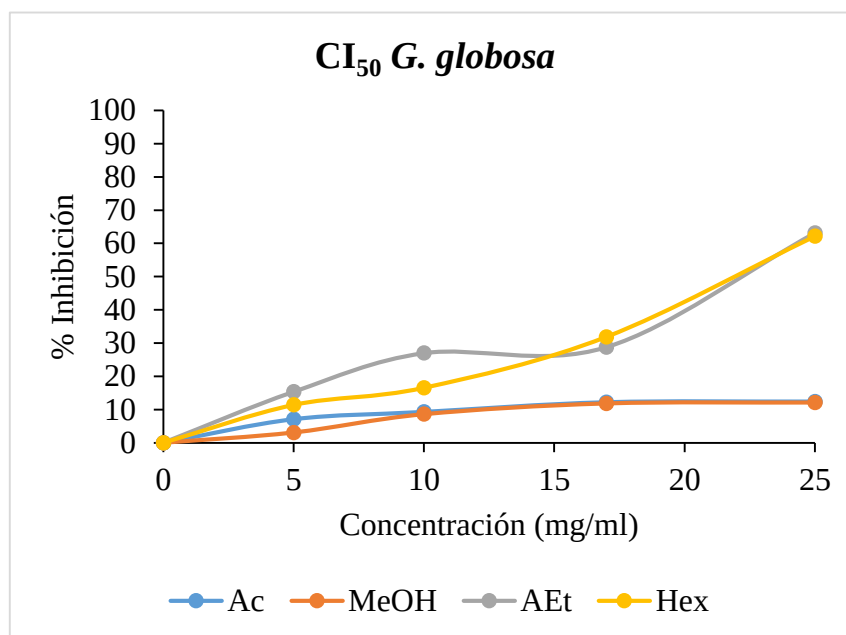
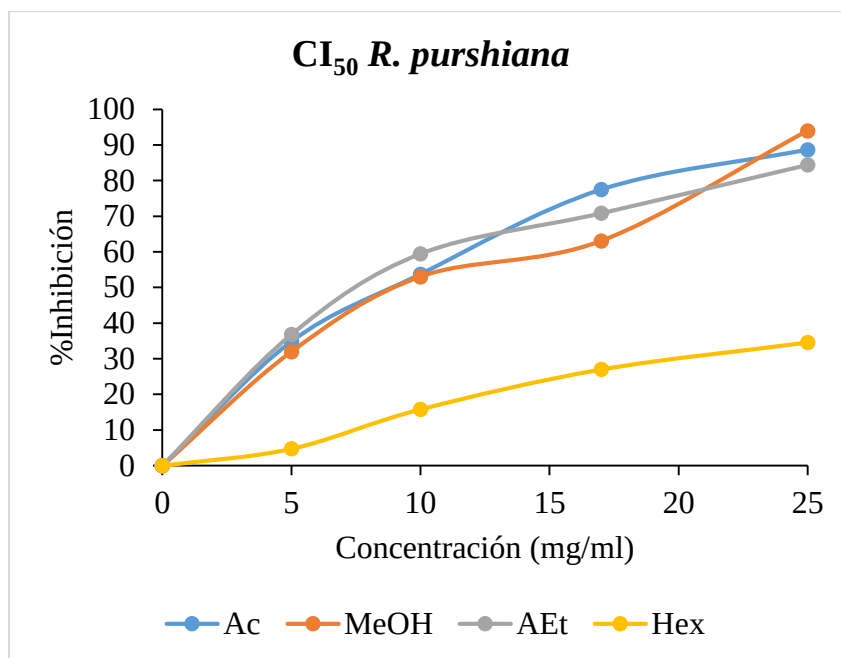
Preguntas y puntuación de las respuestas.

Nota Los puntos se asignaron de acuerdo a la relevancia que tenía la pregunta para el trabajo: alta-4 puntos, media-3 puntos y baja-2 puntos.

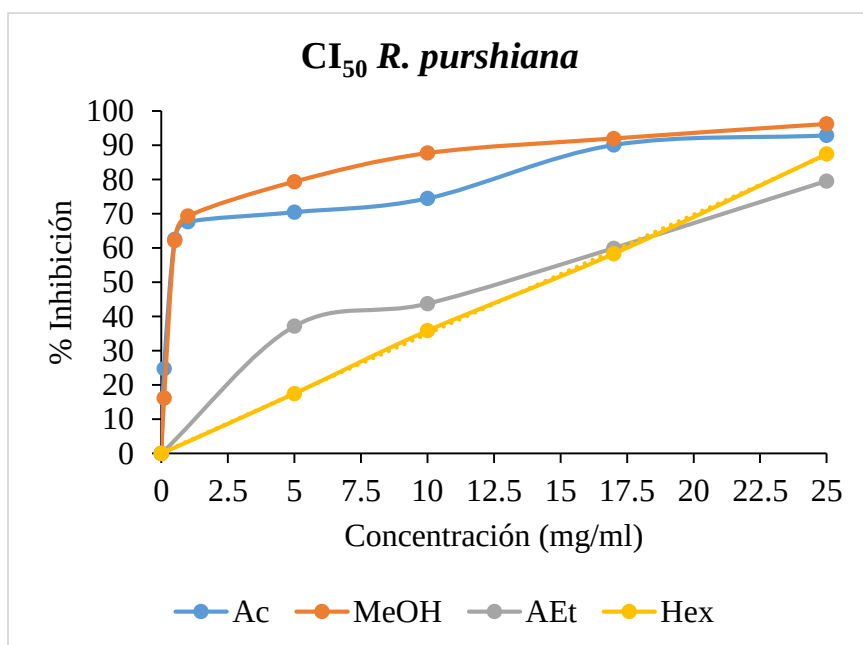
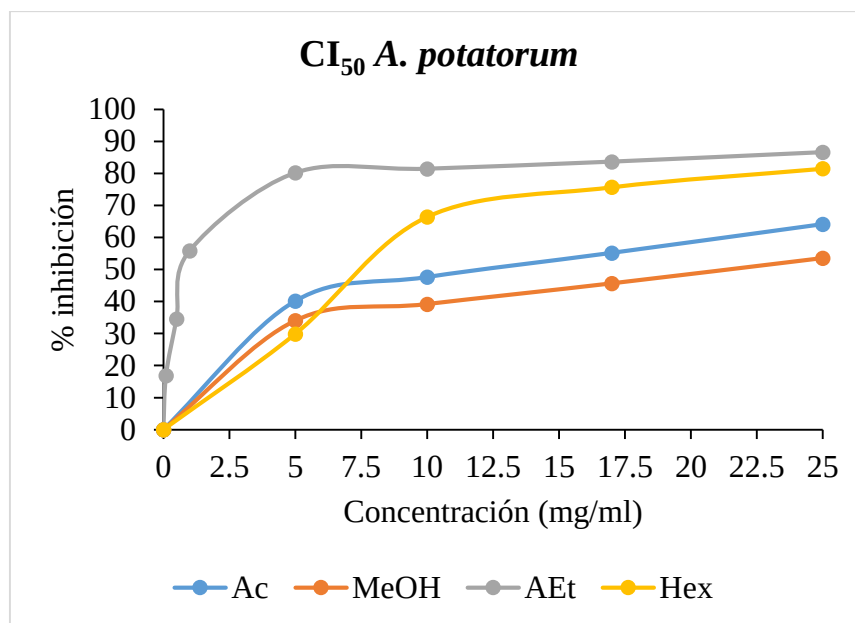
Planta ideal:30 puntos

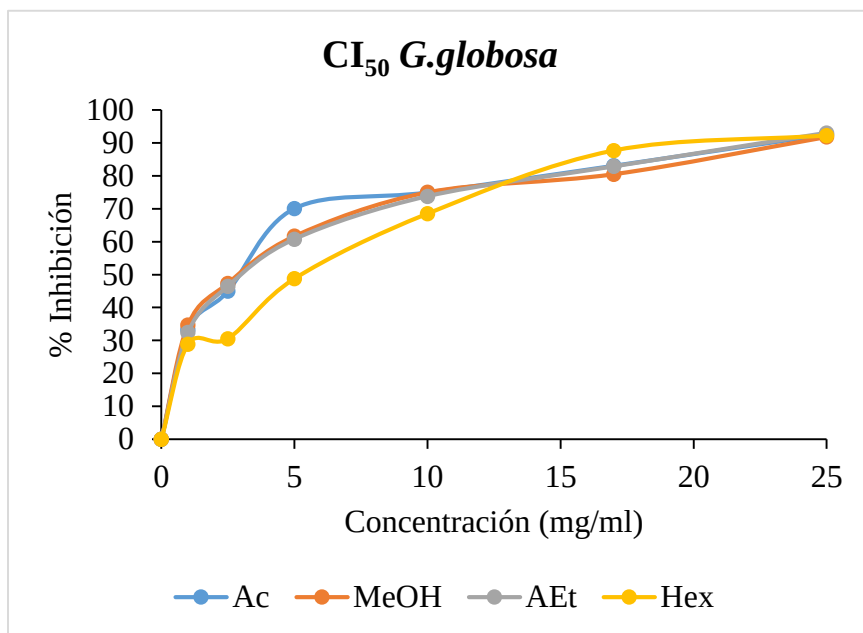
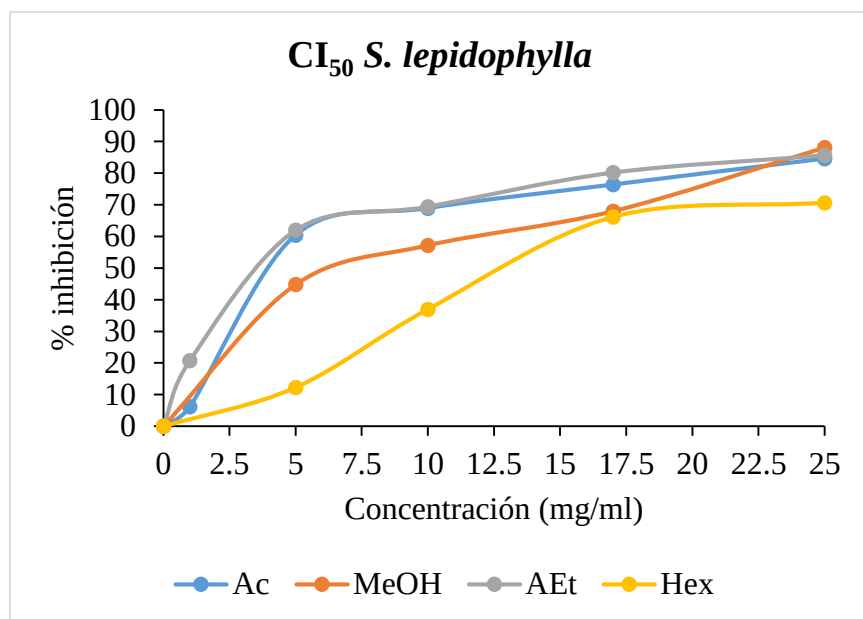
¿Es fácil de colectar durante el año?	Si (4)	No (0)
¿Se puede colectar en cualquier estadio?	Si (3)	No (0)
¿Es utilizada para un tipo específico de cáncer?	Si (4)	No (0)
¿Es utilizada para tratar otro padecimiento además del cáncer?	Si (2)	No (0)
¿Se utiliza un órgano específico de la planta?	Si (3)	No (0)
¿la planta se utiliza en combinación con otra?	Si (0)	No (3)
¿se conoce la cantidad de planta utilizada?	Si (2)	No (0)
Número de médicos tradicionales que la recetan	Uno(0)	≥2 (2)
¿Existen estudios de actividad citotóxica de la planta?	Si (4)	No (0)
¿Existen estudios de actividad antioxidante de la planta?	Si (3)	No (0)

Anexo 14. Cálculo del CI_{50} para el ensayo de captación del radical DPPH*



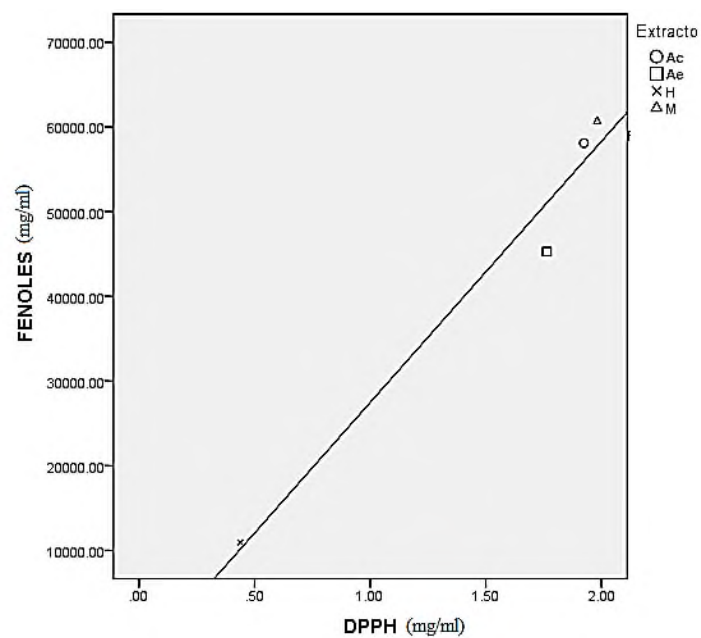
Anexo 15. Cálculo del CI_{50} para el ensayo de captación del radical $ABTS^+$



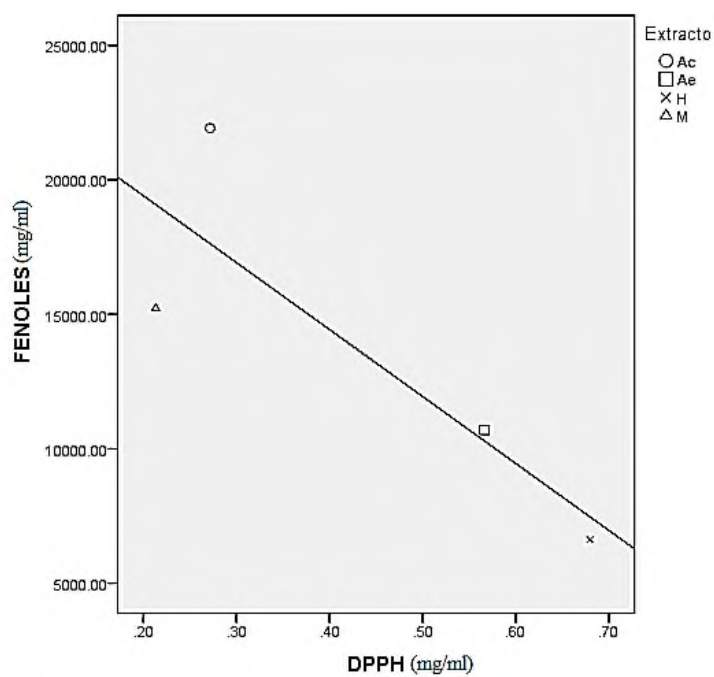


Anexo 16. Correlación de Pearson para resultados del ensayo DPPH y cuantificación de compuestos fenólicos

A) Extractos de *R. purshiana*

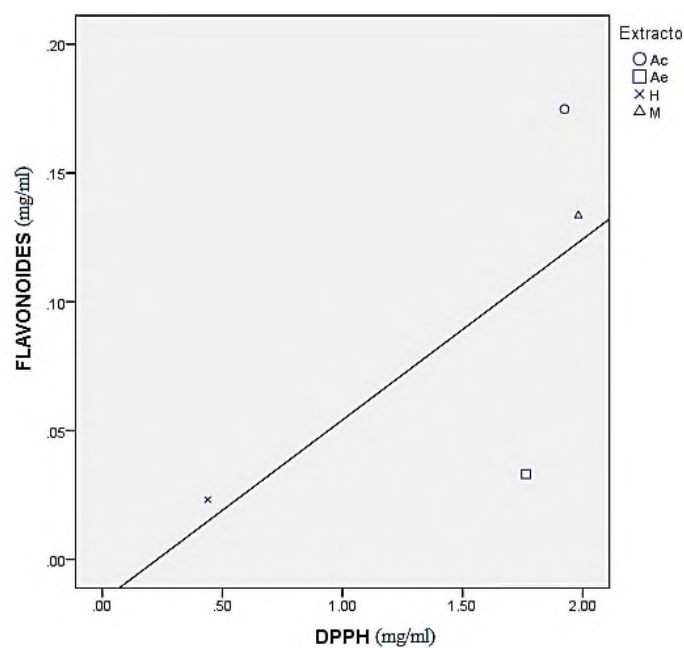


B) Extractos de *G. globosa*

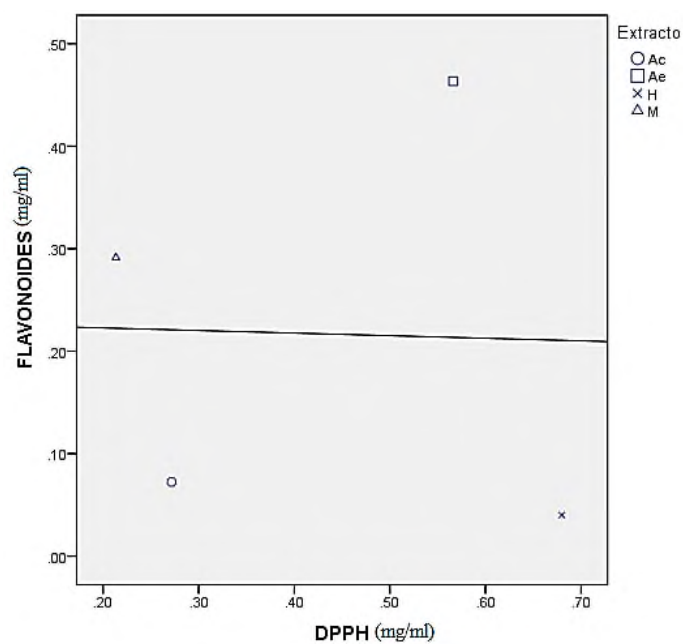


Anexo 17. Correlación de Pearson para resultados del ensayo DPPH y cuantificación de flavonoides

A) Extractos de *R. purshiana*

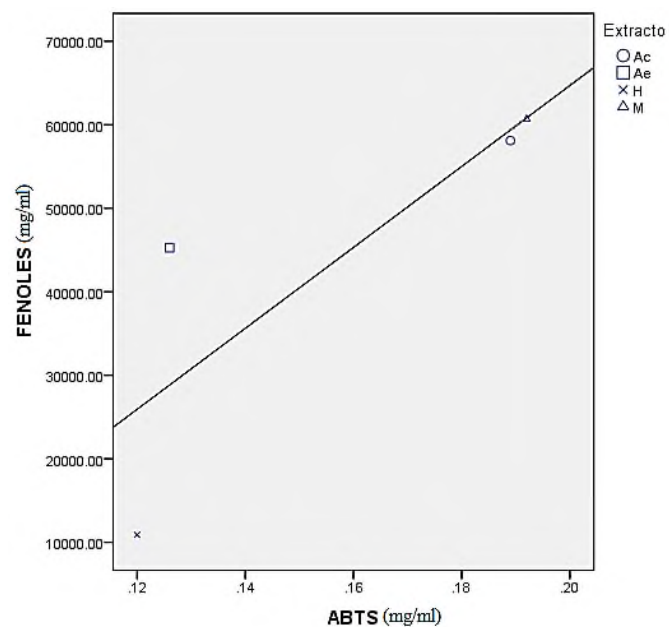


B) Extractos de *G. globosa*

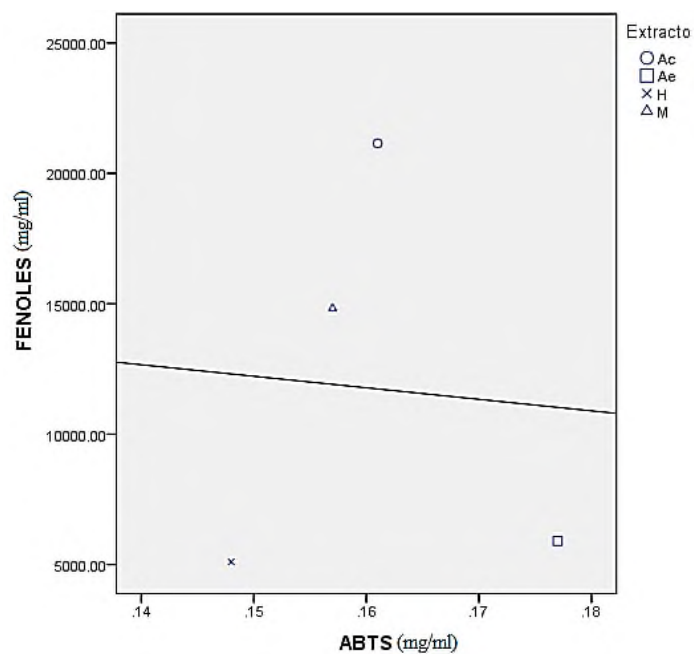


Anexo 18. Correlación de Pearson para resultados del ensayo ABTS y cuantificación de compuestos fenólicos

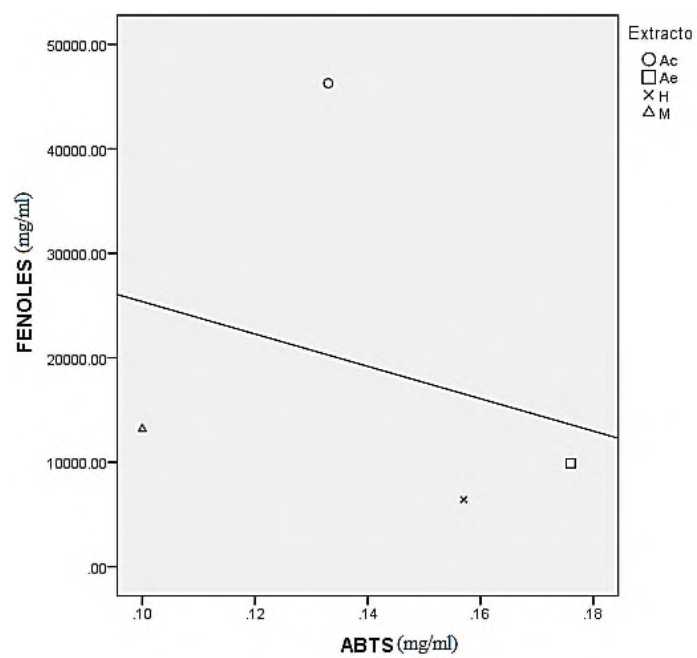
A) Extractos de *R. purshiana*



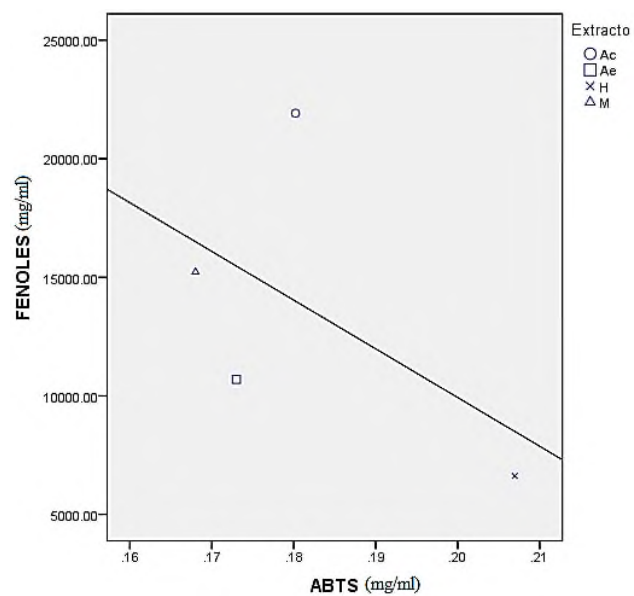
B) Extractos de *S. lepidophylla*



C) Extractos de *A. potatorum*

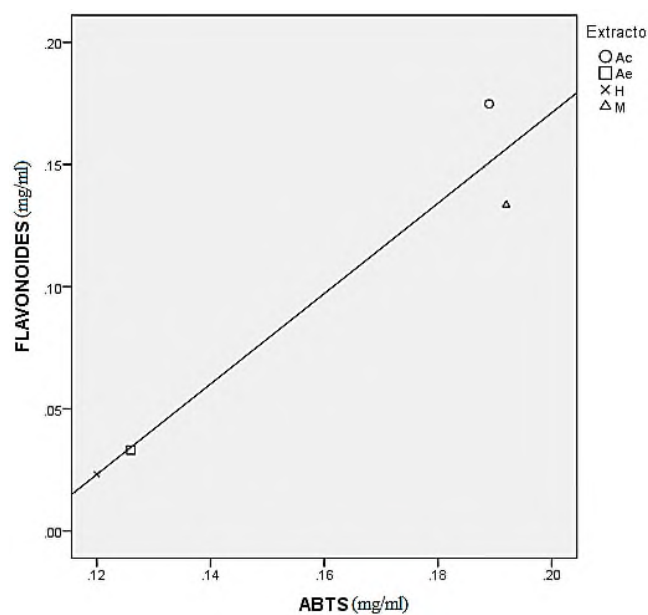


D) Extractos de *G. globosa*

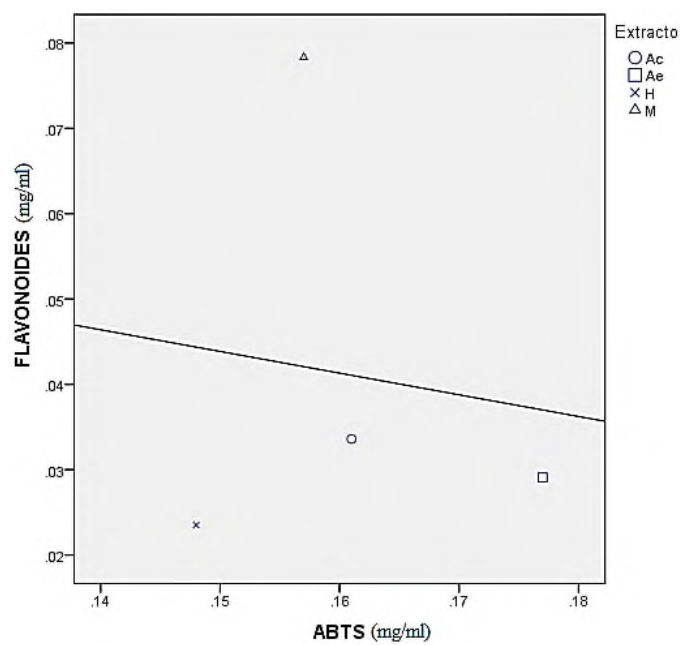


Anexo 19. Correlación de Pearson para resultados del ensayo ABTS y cuantificación de flavonoides

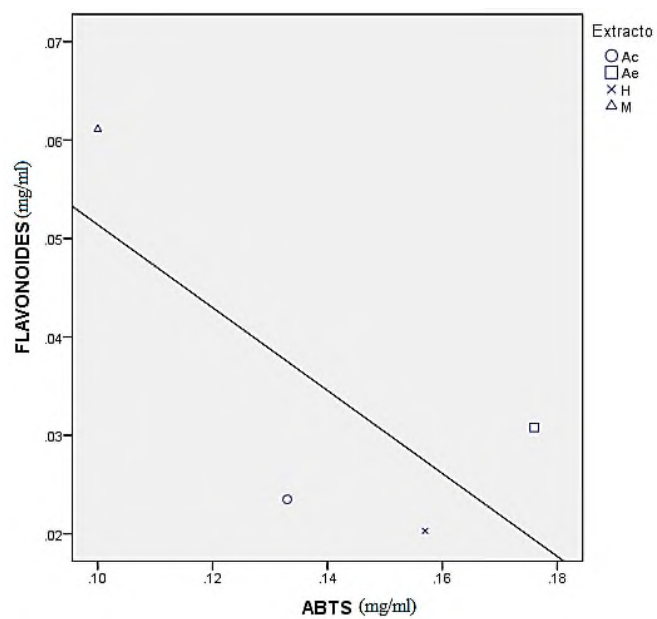
A) Extractos de *R. purshiana*



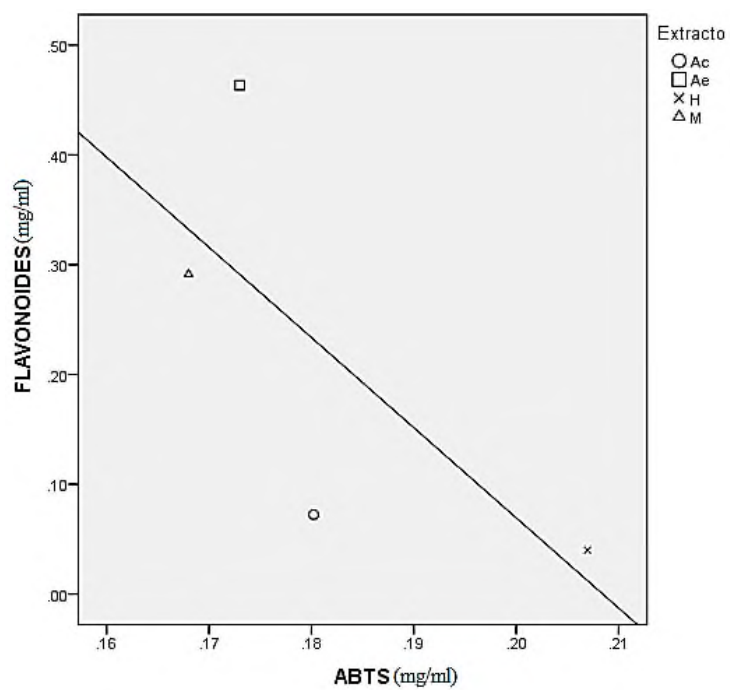
B) Extractos de *S. lepidophylla*



C) Extractos de *A. potatorum*



D) Extractos de *G. globosa*



Anexo 20. Fichas informativas de las especies seleccionadas

Agave potatorum (Maguey de Papalomé)

Nombre común: maguey tobala, maguey del pasmo, maguey de papalomé o papalometl (Mancilla, 2006).

Hábitat: Esta especie crece y reside en sitios ubicados entre 1300 a 2400 m sobre el nivel del mar en suelos arenosos derivados de rocas calizas. Es parte de la selva baja caducifolia y el matorral xerófilo (García, 2010).

Distribución: En Puebla y ampliamente en Oaxaca (Huajuapán, Coixtlahuaca, Cuicatlán, Etla, Centro, Ixtlán, Miahuatlán, Mixe, Tlacolula, Sola de Vega, Zaachila y Zimatlán) (Larson & Neyra, 2004; Martínez & Bautista, 2013).

Usos: Producción de mezcal, ornamental, como alimento y en remedios de medicina tradicional. La base de las hojas se utiliza para elaborar dulce de maguey y la estructura floral como alimento, mientras que la savia se usa en medicina tradicional para disminuir dolores internos y externos. La planta se siembra en macetas o jardines para decoración (Bautista *et al.*, 2015). Las hojas de esta especie se utilizan para la producción de mezcal, el bagazo que se obtiene al final del proceso cuenta ya con estudios para su aprovechamiento como soporte en la elaboración de biofiltros (Tovar *et al.*, 2016).

Descripción: *A. potatorum* es una planta perenne que puede presentar de 30 a 100 hojas suculentas y erectas (15 a 35 cm de largo y 8 a 10 cm de ancho) dispuestas de forma simétrica alrededor de un tallo pequeño, conformando una roseta abierta. Su inflorescencia paniculada alcanza hasta seis metros de altura. Las flores de esta especie forman racimos y presentan color verde claro a amarillo, o con tonos verde a rojizo (Félix, 2014). Esta especie cuenta con más de 33 variedades y es de importancia en México debido a su uso en actividades nutricionales, forestales, económicas y culturales (Mota, 2013).

***Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada)**

Nombre común: Cáscara sagrada, cáscara amarga.

Hábitat: Es posible encontrar esta especie en bosques de coníferas.

Distribución: México y la costa del pacífico.

Usos: Esta especie considerada como una planta venenosa presenta compuestos con efecto laxante y de estimulación pancreática. Se utiliza en medicina tradicional para tratar: estreñimiento, artritis, presión arterial, hemorragia, diabetes, cáncer de colon y problemas renales (López & Pérez, 2010; Ramos, 2012). Se ha propuesto que esta especie presenta también actividad como: antifúngico, antimutagénico, anticancer, antioxidantes; además de ser útil en el tratamiento de fiebres, trastornos oculares y enfermedades respiratorias (Aarland *et al.*, 2015; Giavina *et al.*, 1997). Asimismo, se han encontrado compuestos con actividad antiviral, útiles para el tratamiento del herpes (Sydiskis & Owen, 1987).

Descripción: *R. purshiana* es un arbusto caduco alto que alcanza entre 6 y 15 m de altura, presenta hojas alternas y ovales de color verde oscuro (Vettraino *et al.*, 2006). Las inflorescencias son racimos axilares con varias flores pequeñas de color blanco verdoso, los frutos maduros son pequeñas drupas de color negro. La corteza presenta una coloración de gris pardusca a marrón-rojiza, la cara interna es amarilla-rojiza o casi negra mientras que la fractura es de color amarillo (Estrada *et al.*, 2006). La corteza fresca presenta un sabor amargo y puede causar un efecto laxante demasiado fuerte, es por ello que se almacena al menos durante un año antes de su uso (Van Den Berg *et al.*, 1987).

***Selaginella lepidophylla* (Doradilla)**

Nombre común: Doradilla, planta de la resurrección, flor de Jericó, siempre viva, flor de piedra, flor de roca, magóra (Lakhar *et al.*, 2015).

Hábitat: Esta especie reside en zonas áridas y bosques de coníferas entre los 1000 a 3000m sobre el nivel del mar. Es posible encontrarla cerca de ríos y arroyos.

Distribución: Esta especie es nativa de México y es posible encontrarla en los siguientes estados: Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí (Estévez *et al.*, 2013; Subsecretaría de fomento y normatividad ambiental, 2008).

Usos: Medicinal y ornamental. En medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades del riñón, úlceras gástricas, infecciones de estómago, dolor de huesos, diarrea, reumatismo, infecciones urinarias, cáncer, neumonía, dolor de cabeza y fiebre. La infusión de esta especie completa se consume para aliviar los resfriados, la decocción de la doradilla con “cola de caballo” se consume para el tratamiento de enfermedades renales (Gechey *et al.*, 2014; Rupa & Lakshi, 2014; UNAM, 2009).

Descripción: *S. lepidophylla* presenta tallos arrosetados y ramificados desde la base con una altura de hasta 5 cm, sus hojas axilares son ovado oblongas mientras que las laterales son ampliamente ovadas y rojas en el envés. Se reproduce por esporas (Sánchez *et al.*, 2017). Esta especie es considerada una planta de la resurrección debido a la capacidad que posee de secarse, enrollarse y sobrevivir periodos de sequía, sin embargo; después de repetidas sequías y rehidrataciones pierde viabilidad para regresar a su estado natural (Adams *et al.*, 1990).

***Gomphrena globosa* (Amaranto globo)**



Siempre viva (Vera, 2014)

Nombre común: Amaranto globo, siempre viva.

Hábitat: Crece en suelo drenado, en zonas cálidas.

Distribución: Esta especie se encuentra en Norte América, Sur América e India (Hamiduzzaman, 2014).

Usos: Medicinal y Ornamental. En medicina tradicional se utiliza la raíz para el tratamiento de la caída dental (Waize & Martínez, 2011). Las hojas son utilizadas como antiespasmódico, mientras que las flores se usan como sedantes y para tratar heridas (Gupta, 2006). Se utiliza también para detener hemorragias de la nariz, como calmante de los nervios, para tratar problemas de la próstata (Lans, 2007).

Descripción: *G. globosa* es un arbusto anual erecto o rastrero que alcanza una altura entre 0.2 y 0.4 m. Presenta un tallo cilíndrico grueso, hojas verdes opuestas de 7 a 11 cm de largo e inflorescencias simples con flores de color magenta, rosa, amarillo o blanco (Gilman & Howe, 2014; Vera, 2014).