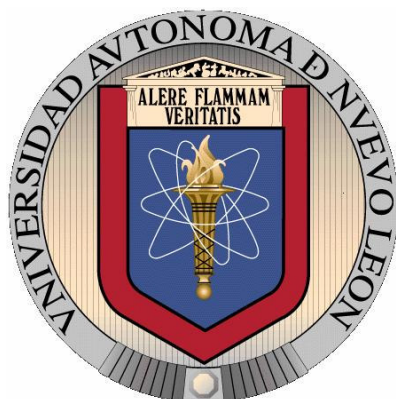


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA
DE PLANTAS TÓXICAS DEL NORTE DE MÉXICO

Por

FLORITA RAMOS CASILLAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación
en Química de Productos Naturales

Diciembre, 2008

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA
DE PLANTAS TÓXICAS DEL NORTE DE MÉXICO

Comité de Tesis

Director de la tesis: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Secretario: Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal: Dra. Julia Verde Star

Vocal: Dra. Delia Elva Cruz Vega

Vocal: Dra. Pilar Carranza Rosales



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA
DE PLANTAS TÓXICAS DEL NORTE DE MÉXICO**

por

FLORITA RAMOS CASILLAS

Como requisito para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Con Acentuación en Química de Productos Naturales

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L., y la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste. IMSS, Monterrey N.L. Bajo la dirección de:

Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Director Interno

Dra. Delia Elva Cruz Vega
Director Externo

Para la realización de este trabajo de investigación y obtener el grado de Doctor en Ciencias, se obtuvo apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Beca Crédito No. 176907
Universidad Autónoma de Nuevo León: Paicyt: SA984-04

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer el gran apoyo que recibí de mi Directora y Co- Directora de tesis la Dra. Azucena Oranday Cárdenas y Dra. Delia Elva Cruz de la Vega, sin su gran ayuda no hubiera podido realizar este trabajo. Así como a la Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Julia Verde Star, y Dra. Pilar Carranza Rosales por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la cual le tengo un gran cariño y respeto por haberme dado grandes oportunidades, experiencias intelectuales y un gran apoyo a mi formación profesional durante la Licenciatura, Maestría y Doctorado. Al Centro de Investigación Biomédicas del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN) por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios (No. de registro 176907).

A la Directora y Jefe del Departamento de Servicios Docentes del CBTis No. 74, Lic. Ma. Del Roble Moncayo Almaguer y al L.A.E. Asención Lira Cedillo, así como a mis compañeros de trabajo, porque tal vez, sin saberlo, fueron una motivación y un apoyo para que yo culminara con esta investigación.

Y muy en especial a mi esposo Perfecto Morales Méndez e hijos: Christian, Erik, Karen, Jessica y David por el apoyo que siempre me han brindado y a todas las personas (Familia Castro y Vigil) que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
1.1. Abstract	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos particulares.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1. Cáncer.....	7
5.1.1. Incidencia de cáncer en México.....	8
5.1.2. Principales neoplasias en México.....	10
5.2. Plantas de importancia medica	12
5.2.1. Plantas medicinales.....	12
5.2.2. Plantas tóxicas	12
5.2.3. Plantas con actividad antineoplásica.....	14
5.2.3.1. Plantas medicinales y/o útiles con actividad antineoplásica.....	14
5.2.3.2. Plantas tóxicas con actividad antineoplásica.....	18
5.3. Descripción de plantas tóxicas evaluadas en este trabajo.....	26
5.4. Técnicas para evaluar la citotoxicidad de extractos vegetales.....	34
5.5. Organismos nacionales y mundiales que reconocen y promueven los fitofármacos.....	35
6. MÉTODOS.....	37
6.1. Material biológico.....	38
6.2. Estrategia de trabajo desarrollada	39
6.2.1. Colecta de plantas	39
6.2.2. Obtención de extractos.....	39

Sección	Página
6.3. Determinación de la actividad tóxica con el Ensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i>	40
6.3.1. Eclosión de huevecillos de <i>A. salina</i>	40
6.3.2. Ensayo de Letalidad de <i>A. salina</i>	40
6.4. Evaluación de la actividad citotóxica por medio de la técnica de proliferación celular WST-1.....	42
6.4.1. Descongelación de líneas celulares.....	42
6.4.2. Mantenimiento de las líneas celulares.....	42
6.4.3. Resiembra de células.....	42
6.4.4. Determinación de proliferación celular con WST-1.....	43
6.5. Identificación de grupos funcionales en extractos con mayor actividad sobre <i>A. salina</i>	44
6.5.1. Reacciones químicas.....	44
6.5.2. Cromatografía en capa delgada (CCD).....	44
6.6. Obtención de saponinas crudas.....	45
6.6.1. Obtención de saponinas cristalizadas.....	45
6.6.2. Identificación de saponinas cristalizadas.....	45
7. RESULTADOS	46
7.1. Obtención del extracto.....	46
7.2. Determinación de la actividad toxica sobre <i>A. salina</i>	47
7.3. Identificación de grupos funcionales en extractos con mayor actividad sobre <i>A. salina</i>	47
7.3.1. Reacciones químicas.....	47
7.3.2.-Cromatografía en capa delgada (CCD).....	49
7.3.2.1. Saponinas.....	49
7.3.2.2. Cumarinas.....	50
7.3.2.3. Alcaloides.....	51
7.3.2.4. Sesquiterpenlactonas.....	52
7.3.2.5. Esteroles.....	53
7.4. Obtención de saponinas.....	54
7.4.1. Confirmación de presencia de Saponinas.....	55
7.4.2. Espectroscopia de ¹ H RMN y ¹³ C RMN.....	56
7.5. Actividad antineoplásica de extractos seleccionados y saponinas.....	57

Sección	Página
7.5.1. Citotoxicidad del extracto acetónico y etanólico de <i>A. lechuguilla</i> sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	57
7.5.2. Citotoxicidad de la saponinas de. <i>A. lechuguilla</i> sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	59
8. DISCUSIÓN.....	61
9. CONCLUSIONES.....	67
10. RECOMENDACIONES.....	68
11. LITERATURA CITADA	69
12. APÉNDICES.....	78
APÉNDICE A.- PRUEBAS QUÍMICAS.....	78
APÉNDICE B.- ESPECTROS DE LA SAPONINA CRISTALIZADA OBTENIDOS POR ¹ H RMN y ¹³ C RMN.....	80
APÉNDICE C.- ESTRUCTURA DE SAPONINAS ESTEROIDALES.....	83
APÉNDICE D.- PLANTAS TOXICAS LOCALIZADAS EN NUEVO LEON.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Rendimiento de trece extractos obtenidos de plantas tóxicas.....	46
II. Toxicidad de trece extractos de plantas tóxicas sobre <i>A. salina</i>	48
III. Grupos funcionales identificados en extractos más activos sobre <i>A. salina</i>	48
IV. Rendimiento de saponinas obtenidas de hojas de <i>A. lechuguilla</i>	54
V. ¹ HRMN, ¹³ CRMN (δ en ppm) de la saponina aislada.....	56
VI. Toxicidad de los extractos y saponinas de <i>A. lechuguilla</i> sobre células tumorales.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución de neoplasias malignas por entidad de residencia.....	9
2. Primeras cinco neoplasias según su topografía en México.....	10
3. <i>A. gregii</i>	26
4. <i>A. berlandieri</i>	28
5. <i>A. lechuguilla</i>	30
6. <i>B. nigra</i>	32
7. Metodología realizada a partir de la colecta hasta la evaluación de la actividad antineoplásica de las plantas toxicas seleccionadas.....	38
8. Bandas observadas en una CCD para saponinas de <i>A. lechuguilla</i> . Extracto acetónico y extracto etanólico.....	49
9. Bandas observadas en una CCD para cumarinas de <i>A. lechuguilla</i>	50
10. Bandas observadas en una CCD para alcaloides de <i>A. lechuguilla</i>	51
11. Bandas observadas en una CCD para sesquiterpenlactonas de <i>A. lechuguilla</i>	52
12. Bandas observadas en una CCD para esteroides de <i>A. lechuguilla</i>	53
13. Bandas observadas en una CCD para saponinas de <i>A. lechuguilla</i> . Saponina cruda y saponina cristalizada	55
14. Citotoxicidad del extracto acetónico de <i>A. lechuguilla</i> sobre líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	58
15. Citotoxicidad del extracto etanólico de <i>A. lechuguilla</i> sobre líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	58
16. Citotoxicidad de saponinas crudas de <i>A. lechuguilla</i> sobre líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	59
17. Citotoxicidad de saponinas cristalizadas de <i>A. lechuguilla</i> sobre líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.....	60

NOMENCLATURA

mg	Miligramos
µg	Microgramos
mL	Mililitros
DL ₅₀	Dosis letal media
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
BSLA	Ensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i>
HeLa	Línea celular tumoral humana de carcinoma de cérvix
MCF-7	Línea celular tumoral humana de adenocarcinoma de glándula mamaria
Vero	Línea celular normal de riñón de mono verde africano
CCD	Cromatografía en capa delgada
¹ HRMN	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
¹³ CRMN	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
WST-1	Sal de tetrazolio

1. RESUMEN

En México, desde 1990 los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general. La tasa de incidencia y la mortalidad han mostrado una tendencia ascendente; por lo que es necesario desarrollar nuevos agentes con actividad antitumoral. El objetivo de este trabajo fue la obtención de compuestos con actividad antineoplásica de plantas tóxicas del norte de México. En este estudio, seleccionamos cuatro especies de plantas tóxicas: *Acacia berlandieri*, *Acacia gregii*, *Brassica nigra* y *Agave lechuguilla*, colectadas en el Estado de Nuevo León. La selección de las plantas fue basada en información etnobotánica. Se realizaron extractos metanólicos, hexánicos y acetónicos de c/planta. En total se obtuvieron 13 extractos que fueron evaluados por medio del Ensayo de Letalidad de *Artemia salina* (BSLA). Los extractos con una $DL_{50} \leq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, se consideraron como activos y pasaron a una segunda evaluación por un método de citotoxicidad *in vitro* (ensayo WST-1), sobre dos líneas celulares tumorales MCF-7 y HeLa. Se determinaron los grupos fitoquímicos presentes mediante pruebas químicas y cromatografía en capa delgada. En base a los resultados de la evaluación citotóxica y determinación fitoquímica, se aislaron las saponinas presentes (crudas y cristalizadas) las cuales fueron analizadas por espectroscopía ($^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$), y evaluadas sobre las dos líneas tumorales. Además con el objeto de determinar selectividad se realizó la evaluación citotóxica sobre una línea celular normal (Vero) tanto a los extractos como a las saponinas. En la prueba de BSLA, fueron cuatro extractos los que presentaron una $DL_{50} \leq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$: extracto hexánico de *A. berlandieri* y el hexánico, acetónico y etanólico de *A. lechuguilla* con una DL_{50} de 86.3, 53.5, 56.3 y 46.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Se continuó con el estudio citotóxico sobre las líneas tumorales con los extractos acetónico y metanólico de *A. lechuguilla* por presentar la mejor actividad. Los extractos restantes de *A. berlandieri*, *A. gregii*, *B. nigra* no presentaron actividad relevante ($DL_{50} > 100\mu\text{g}/\text{mL}$). Se detectó la presencia de alcaloides, esteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, y saponinas con el estudio fitoquímico de los extractos de *A. lechuguilla*. A partir de este extracto se aislaron saponinas crudas y cristalizadas. Los estudios citotóxicos sobre las dos líneas celulares tumorales mostraron la mejor actividad sobre la línea celular HeLa: extracto acetónico y etanólico de *A. lechuguilla* IC_{50} de 142 y 89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, saponinas crudas y cristalizadas IC_{50} de 95 y 78.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Los resultados de citotoxicidad sobre la línea normal Vero mostraron que las saponinas cristalizadas son menos tóxicas que el extracto y saponinas crudas ($IS= 2.2$). Con la información del $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ podemos aseverar que el compuesto aislado es una saponina 5 β -esteroidal a la cual se atribuye la actividad citotóxica observada. De las cuatro plantas tóxicas del norte de México analizadas, *A. lechuguilla* fue la que presentó compuestos con actividad antineoplásica relevante, por lo que es recomendable la continuidad de este trabajo, aislando los compuestos fitoquímicos restantes y ampliando la evaluación citotóxica a otras líneas celulares tumorales.

1.1. Abstract

Malignant tumors represent the second cause of death in the general population in Mexico since 1990. The rates of incidence and mortality have shown an ascending tendency, therefore it is necessary to develop new agents with antitumoral activity. The objective of this work was to obtain compounds with antineoplastic activity of toxic plants from the north of Mexico. In this study, we selected four species of toxic plants: *Acacia berlandieri*, *Acacia gregii*, *Brassica nigra* and *Agave lechuguilla*, collected in Nuevo León. The selection of the plants was based on ethnobotanics information. Methanolic, hexanic and acetonetic extracts were obtained from each plant, 13 extracts were obtained and evaluated using the Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA). Extracts with $LD_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ were considered active and went through a second evaluation of cytotoxicity *in vitro* (WST-1 assay), over two tumoral cellular lines MCF-7 and HeLa. The present phytochemical groups were determined by means of chemical tests and chromatography in thin layer. Based on the results of the cytotoxic evaluation and phytochemical determination, the present saponins were isolated (crude and crystallized) and were analyzed by spectroscopy ($^1\text{HRMN}$ and $^{13}\text{CRMN}$), and evaluated on the two tumor cellular lines. In addition, with the purpose of determining selectivity, the cytotoxic was carried out on a normal cellular line (Vero) with the extracts as well as saponins. In BSLA, four extracts displayed $LD_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$: hexanic extract of *A. berlandieri* and the hexanic, acetonetic and ethanolic of *A. lechuguilla* with a LD_{50} of 86.3, 53.5, 56.3 and 46.3 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The cytotoxic study on the tumor cellular lines with the acetonetic and methanolic extracts of *A. lechuguilla* were continued since they displayed relevant activity ($LD_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). The presence of alkaloids, sterols, coumarins, sesquiterpenelactons, and saponins was detected with the phytochemical study of the extracts of *A. lechuguilla*. From this extract, crude and crystallized saponins were isolated. The cytotoxic studies on the two tumor cellular lines displayed the best activity on the cellular line HeLa: acetonetic and ethanolic extract of *A. lechuguilla* IC_{50} of 142 and 89 $\mu\text{g/mL}$, saponins crude and crystallized IC_{50} of 95 and 78.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of cytotoxicity on the normal line Vero showed that the crystallized saponins are less toxic than the extract and crude saponins ($IS = 2.2$). With the information of $^1\text{HRMN}$ and $^{13}\text{CRMN}$ we can assert that the isolated compound is a 5- β steroidal saponin, to which cytotoxic activity is attributed. Of the four toxic plants from the north of Mexico that were analyzed, *A. lechuguilla* was the only one displayed compounds with relevant antineoplastic activity. We recommended to continue working with this plant phytochemical compounds and extending the cytotoxic evaluation to other tumor cellular lines.

2. INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer representa un grave problema de salud pública. Desde 1990 los tumores malignos son la segunda causa de muerte en la población en general y la primera en mujeres mayores de 25 años (Mohar *et al.*, 1997; SSA, 2000). El tratamiento ampliamente usado para algunos tipos de cáncer es la quimioterapia, siendo bien conocidos los efectos colaterales de toxicidad a nivel gastrointestinal, renal e inmunológico. Por lo que es necesario el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos que puedan aportar al paciente con cáncer una mejor calidad de vida (Kimura, 2000). La quimioterapia es uno de los tratamientos mas utilizados para combatir el cáncer que incluye compuestos sintéticos, semisintéticos y de origen natural; dentro de estos últimos se encuentran una gran variedad de compuestos de origen vegetal (Barret, 2001). El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos de Norteamérica ha encontrado compuestos con actividad anticancerígena en 35,000 especies de plantas. Estudios pioneros de la actividad de compuestos de plantas como *Catharanthus roseus* (vincristina) y *Taxus brevifolia* (taxol), proveen evidencias de que las plantas pueden ser un recurso de agentes quimioterapéuticos potenciales contra el cáncer (Roja, 2000).

En nuestro país se han reportado más de 1000 especies de plantas medicinales y solamente en menos del 20% se ha demostrado científicamente su valor terapéutico (García *et al.*, 2001). Por otra parte se han reportado alrededor de 220 plantas tóxicas de México entre las que se encuentran algunas con compuestos con actividad anticancerígena como es el caso de *Melia azedarach* (Itokawa *et al.*, 1995), de donde se han extraído dos azadiractinas de un extracto etanólico con actividad citotóxica contra líneas celulares de leucemia linfocítica. Sin embargo la mayoría de las plantas tóxicas

no han sido estudiadas con este propósito, por lo que se desconoce la actividad de sus compuestos. Con este trabajo se pretendió evaluar la actividad antitumoral de plantas tóxicas del norte de México en dos líneas celulares humanas: MCF-7 (Adenocarcinoma de glándula mamaria) y HeLa (Carcinoma de cérvix) y en la línea celular Vero con el objetivo de ver la especificidad.

Observando que las tasas de incidencia de las principales neoplasias malignas van en aumento y a pesar de que ciertos casos se han reportado bajo control, la mortalidad ha mostrado una tendencia ascendente; por lo que es necesario desarrollar nuevos agentes con actividad antitumoral (kimura, 2000).

3. HIPÓTESIS

Extractos de plantas tóxicas del norte de México pueden presentar actividad antineoplásica sobre dos líneas celulares tumorales: MCF-7 (Adenocarcinoma de glándula mamaria) y HeLa (Carcinoma de cérvix).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar compuestos con actividad antineoplásica de plantas tóxicas del Norte de México.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la actividad tóxica de extractos obtenidos de *A. berlandieri*, *A. gregii*, *B. nigra* y *A. lechuguilla* sobre *A. salina*.
- Determinar la citotoxicidad de extractos crudos sobre dos líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), HeLa (Carcinoma de cérvix) y la línea celular normal Vero (riñón de mono verde africano).
- Determinar la citotoxicidad de compuestos obtenidos sobre las líneas celulares antes mencionadas
- Identificar los compuestos aislados por $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$.

5. ANTECEDENTES

5.1. CÁNCER

El cáncer es un grupo heterogéneo y numeroso de enfermedades malignas, caracterizadas por una proliferación celular anormal, de origen genético monoclonal, autónoma, progresiva y destructiva, que sin tratamiento conduce a la muerte precoz del individuo. El rasgo biológico más característico es la metastatización (Hsu, 2005).

El cáncer es el resultado de la falta de control de la reproducción celular en un tejido en el que, previa intervención de factores etiológicos sobre una o varias células, éstas se reproducen sin regulación ni finalidad, de forma autónoma, anárquica e irrefrenable aunque cese el estímulo causal. Las células cancerígenas se diferencian de las normales porque se multiplican en forma desordenada, se disponen desordenadamente, pierden la forma original y adquieren características primitivas, el núcleo se destaca por su tamaño, escasa mitocondrias, ribosomas libres y en gran cantidad, poseen abundante cantidad de agua y ácidos nucleicos que se hallan en mitosis, pueden llegar a tener 2 o más núcleos acompañándose de pérdida de la apoptosis (Haupt, 2003). Aparece así un nuevo tejido, patológico, distinto del normal, con tendencia a expandirse localmente a través de vías linfáticas o hemáticas. Con formación de nuevos focos o metástasis en órganos distantes, donde se repite la expansión. Todo el proceso es destructivo para los tejidos normales y, dejado a su evolución natural, acaba con la vida del huésped (Barón, 1992; Isefuku, 2006).

5.1.1. INCIDENCIA DE CÁNCER EN MÉXICO

Recientemente se constituyó un Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), en colaboración con la Asociación Mexicana de Patólogos, la Dirección General de Epidemiología y el Instituto Nacional de Cancerología. El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país. En 1995, por medio del RHNM, se registraron 75 675 casos nuevos de cáncer en México. Cabe destacar que dicho registro no tiene base poblacional, sino sólo representa la frecuencia relativa de tumores malignos con diagnóstico histológico de un centro hospitalario; sin embargo, ilustra el problema de cáncer en nuestro país a partir de los casos nuevos notificados anualmente (SSA, 2003). El cáncer constituye un problema de salud pública. El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país. La detección, diagnóstico y manejo terapéutico de las neoplasias malignas requieren de una estructura organizada de médicos, paramédicos, técnicos, instituciones y tecnología de elevado costo. La evaluación de la incidencia de Cáncer es una herramienta importante en las decisiones de prevención y tratamiento del mismo. Los datos que aquí se exponen provienen del RHNM.

Entre 1922 y 2001 la proporción de muertes por cáncer en México pasó de 0.6 a 13.1% de las defunciones totales ocurridas por todas las causas y en toda la población. En el 2001 se registraron 102,657 tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por 100,000 habitantes, se observó que el grupo de 0 a 4 años presentó mayor número de casos que los de 5 a 14, posteriormente se aprecia un aumento progresivo hasta alcanzar el máximo en el grupo de 70 y más años. De acuerdo al sexo, 34.8% fueron en hombres y 65.2% en mujeres, en ambos fue mayor el número de casos registrados en el grupo de 0 a 4 años y posteriormente se observó un aumento progresivo, en este aspecto, es importante destacar en

las mujeres el aumento más intenso a partir de los 20 años (28) mientras que en los hombres se apreció hasta los 40 años (50.5). Del total de neoplasias malignas registradas en el 2001, el 36.3% fueron reportadas por el IMSS, el 26.7% por el sector privado y en tercer lugar la SSA con el 22.8%.

Las entidades con mayor mortalidad por cáncer presentaron las siguientes tasas por 100,000 habitantes: Distrito Federal 73%, Sonora 72%, Baja California Sur 68%, Nuevo León y Sinaloa 66% (Fig. 1).

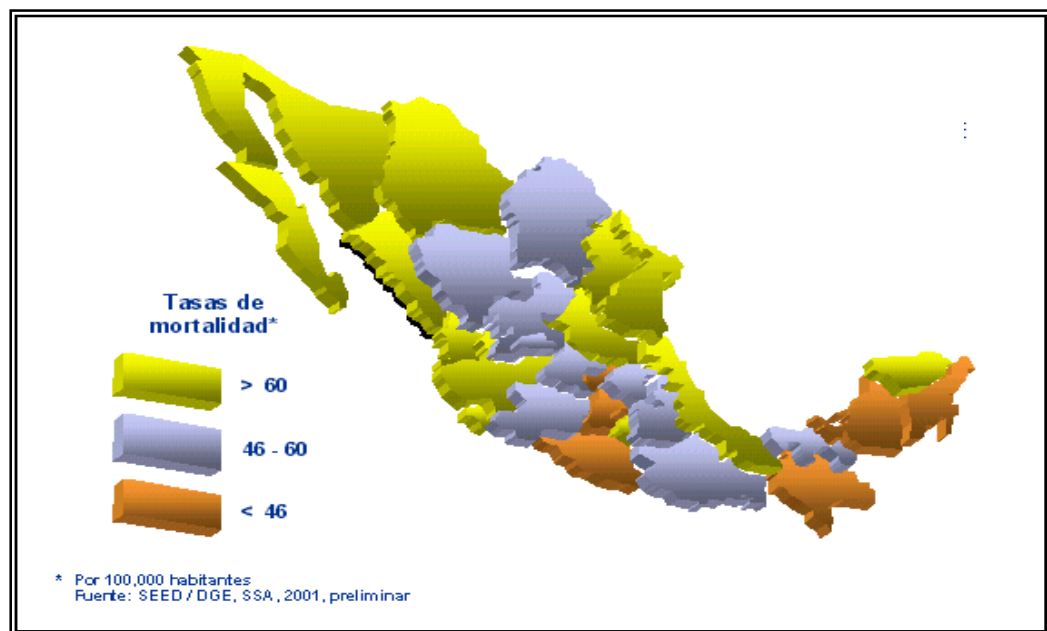


Figura 1.-Distribución de neoplasias malignas por entidad de residencia.

5.1.2. Principales neoplasias en México

Las principales neoplasias malignas y el porcentaje de incidencia en México según su topografía son las siguientes: El cuello del útero 21.5%, glándula mamaria (femenino) 10.6%, glándula prostática 5%, estómago 3.9%, ganglio linfático 3.7 % (Fig. 2).

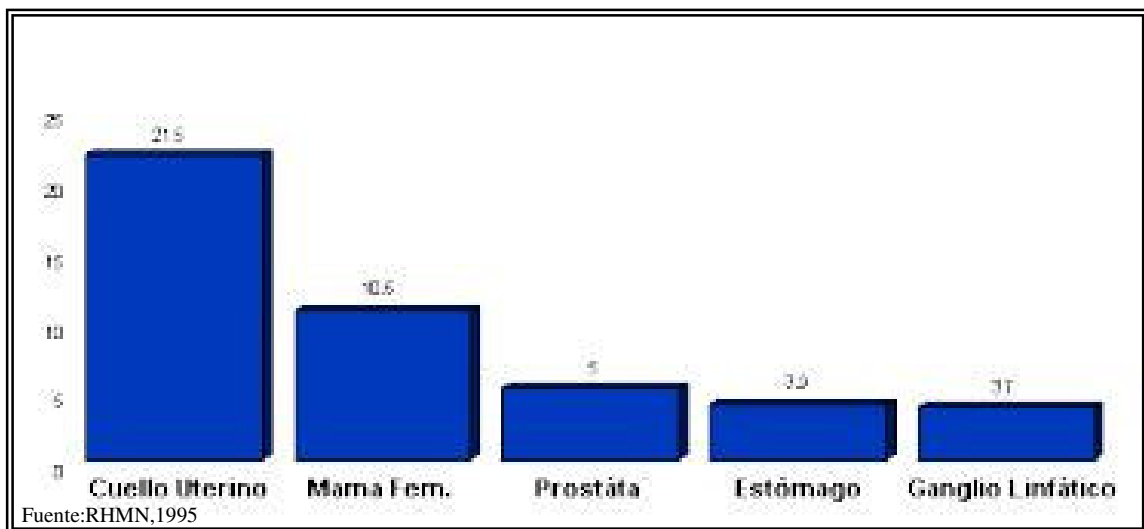


Figura 2. Primeros cinco lugares de neoplasias según su topografía en México.

De acuerdo con el RHNM el cáncer cérvico uterino ocupó el primer lugar respecto a localización con 41,326 casos, lo que corresponde al 22.5% del total registrado. Con respecto a la entidad federativa, el Distrito Federal, Jalisco y Veracruz son los estados que reportaron los más altos porcentajes, y los estados de Quintana Roo, Baja California Sur los menores. Sonora, con 680 casos representó el 1.6%.

El cáncer de mama femenino ocupó la segunda posición respecto a localización con 19,909 casos, lo que corresponde al 10.8% del total registrado. También ocupó el segundo lugar en la población femenina en el trienio 1993-1995 (10.8%). El grupo de edad más afectado es el de 40 a 44 años. Los tipos histológicos que pueden presentar este tipo de neoplasias son los adenocarcinomas (96.8%), carcinoma SAI (2.5%), sarcomas y tumores malignos sin especificar (0.3%) y Linfoma no Hodgkin (0.2%).

El Distrito Federal, Nuevo León, Jalisco y Veracruz registraron los más altos porcentajes, mientras que Quintana Roo, Tlaxcala, Baja California Sur y Campeche, los menores. Sonora, con 401 casos representó el 2%.

El cáncer de mama femenino ocupó la segunda posición respecto a localización con 19,909 casos, lo que corresponde al 10.8% del total registrado (trienio 1993-1995).

5.2. Plantas de importancia médica

5.2.1. Plantas Medicinales

Desde hace muchos siglos se han empleado las propiedades curativas de las plantas y actualmente se continúan investigando basándose en los usos tradicionales que les daban nuestros ancestros. El continente Americano es un inmenso almacén farmacéutico para la humanidad donde una variedad de especies de plantas permanecen todavía sin explorar. Desafortunadamente todavía no son completamente aceptadas por la mayoría de los médicos científicos (Schielcher, 1994).

El valor medicinal de las plantas se debe a la presencia de metabolitos secundarios. La mayoría de estos compuestos son desconocidos, muchos de ellos han sido identificados, aislados e inclusive sintetizados; formando parte de medicamentos oficiales de patente. Los alcaloides se encuentran en el 20% de las familias de plantas y le siguen en menor proporción los glicósidos (cianogénicos, esteroideos, cardiotónicos, etc.), proteínas, aminas, ácidos orgánicos, oxalatos, alcoholes, resinas, minerales. Según la forma y la dosis en que se administre estos compuestos pueden ser medicinales o tóxicos (Hoffman, 1999).

5.2.2. Plantas Tóxicas

Expertos en toxicología vegetal han calculado que crecen en el planeta alrededor de 700 especies tóxicas. Entre estas plantas se encuentra la cicuta, que causó la muerte de Sócrates en el siglo V, A. C. Algunas de estas plantas calificadas como tóxicas pueden ser también medicinales (SSA, 2001). Existe otro grupo de plantas que son tóxicas solamente en dosis altas. Los compuestos tóxicos pueden estar en toda la planta o en

alguna de sus partes, o bien, la toxicidad de la planta puede aumentar o disminuir si la planta está fresca o seca. (Pamplona, 2000). En México se han recopilado alrededor de 220 plantas tóxicas. Muchas de estas especies que vegetan en territorio mexicano se encuentran muy ligadas a actividades humanas, por lo que el contacto con ellas es más usual de lo que en general se supone. En el Estado de Nuevo Leon, las plantas tóxicas se consideran entre las causas más importantes que ocasionan pérdidas económicas a la ganadería. En el apéndice D se muestra una tabla con la especie, nombre común, familia, distribución y toxicidad de algunas plantas tóxicas localizadas en el Estado de Nuevo Leon (Aguilar, 1982; Maldonado, 1993).

5.2.3. Plantas con actividad antineoplásica

5.2.3.1. Plantas medicinales y/o útiles con actividad antineoplásica

Astragalus membranaceus Fish. Con nombre común: Huang Qi. Pertenece a la familia. Leguminosae. Su acción farmacológica es muy variada: propiedades hepatoprotectoras, antioxidantes, antivirales, mejora la oxigenación tisular periférica, propiedades radioprotectoras, propiedades antiinflamatorias, propiedades antibacterianas, propiedades hipotensoras y propiedades anticoagulantes. Pacientes con tumor maligno fueron tratados con quimioterapia y otro grupo también recibió el mismo tratamiento complementado con inyecciones de extracto de *A. membranaceus* y se observó en estos últimos inhibición en el desarrollo del tumor así como en los efectos adversos de la quimioterapia y elevación de la función inmunológica (Duan, 2002).

Acacia victoriae Benth. Con nombre común: Bramble wattle, Gundabluey, Elegant wattle. Pertenece a la familia: Leguminosae. Fueron extraídos tres compuestos (fracción 35-F035, avicina D y G) de *A. victoriae* y se evaluó la citotoxicidad mostrando una inhibición marcada de líneas celulares tumorales de humano y ratón e inducción de apoptosis (Mujoo, 2001).

Psoralea corylifolia con nombre común: Babachi, Bemchi, Bawchi, Babachi. De la familia: Papilionaceae. Se utiliza principalmente la raíz, y las hojas son buenas para la diarrea. La fruta es diurética e útil en el tratamiento de vomitar y bronquitis, inflamación, anemia, etc. Mejora crecimiento y la tez del pelo. Las semillas son laxantes, anti-piréticas, antihelmínticas. El aceite de semilla se utiliza externamente en el tratamiento de la elefantiasis. Su semilla es purgativa, antihelmíntica, para curar heridas,

estimulante, afrodisíaco. Un extracto etanólico de *P. corylifolia* fue evaluado como antineoplásico en la línea celular Hep-2 con un LC₅₀ de 22 µg/ml. *P. Coryfolia* en una prueba adicional contra células de carcinoma de pulmón (A549) presentó un LC₅₀ de 58 µg /ml (Whelan, 2003).

Asclepias syriaca L. con nombre común: Algodoncillo. Pertenece a la familia Asclepiadaceae. Dos compuestos (polyas I y polyas II), aislados e identificados de hojas de *A. syriaca* fueron caracterizados como agentes citotóxicos y citostáticos contra células T-8 y Walker 256 (Rotinberg, 2000).

Brassica juncea (L.) Czern. Con nombre común: moztasa parda. Pertenece a la familia: Brassicaceae. Se utiliza como condimento. Estudios morfológicos e histológicos de ratas tratadas con *B. juncea* revelaron que la media de neoplasmas en colon e intestino fue significativamente bajo (Khan *et al.*, 1996).

Allium chinense Don. Con nombre común: Rakkyo; Scallion chino; Scallion japonés. Pertenece a la familia: Liliaceae. La planta entera es astringente, carminativa y expectorante Se utiliza en el tratamiento de la sensación y del dolor de la congestión en el pecho, la angina de pecho, bronquitis, diarrea y tenesmo en casos de la disentería. Fueron aisladas saponinas de *A. chinense* mostraron potente actividad citotóxica contra células leucémicas murinas (L1210) (Candra, 2002).

Agave americana L. con nombre comun: Pita. Pertenece a la familia: Agavaceae. El agave se cultiva aún por la fibra textil de sus hojas, llamada pita. El zumo azucarado extraído de la savia del tallo antes de la floración se fermenta para producir una bebida alcohólica, llamada pulque, que a su vez se destila para obtener el mezcal. Algunas variedades se utilizan en jardinería. Se aisló una saponina (25R)-3 beta,6 alpha-dihydroxy-5 alpha-spirostan-12-one 3,6-di-O-beta-D-glucopyranoside de *A. americana*.

Esta saponina mostró actividad citotóxica contra la línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60 con una IC₅₀ de 4.3 µg/mL (Yokosuka *et al.*, 2000).

Agave fourcroydes . con nombre común: Henequén. Pertenece a a la familia: Agavaceae. Es utilizada para el aprovechamiento de la fibra textil de la hoja, usada para hacer cuerdas, cordones, alfombras, etc. Se aisló una saponina de las hojas de *A. fourcroydes* y mostró actividad citotóxica contra células HeLa con una IC₅₀ de 7.5µg/mL (Ohtsuki, 2004).

Tithonia diversifolia es una planta utilizada para combatir diarrea, diabetes dolor menstrual, malaria entre otros. Del extracto etanólico de esta planta se aislaron sesquiterpenlactonas (tirofundina, tagetinina) y flavonoides (luteolina, hispidulina) que mostraron actividad citotóxica contra la línea celular tumoral de leucemia HL-60 con valores de IC₅₀ entre 0.13-13 µM (Kuroda, 2007).

Hibiscus cannabinus es una planta nativa de África, utilizada como forraje y fuente de fibra para papel. Se han evaluado la citotoxicidad de lignanos aislados de extractos acetónicos de esta planta, observándose actividad sobre la línea celular tumoral HeLa (Moujir, 2007).

Polygonatum punctatum es una planta de América, utilizada para curar granos, salpullido y heridas; también es una planta ornamental. Saponinas esteroidales (polipuntosidos A-D) fueron aisladas de esta planta y se demostró su actividad citotóxica contra la línea celular tumoral HeLa (Yang, 2006).

Azadirachta indica (Neem) es originaria de la India. Es utilizada como insecticida. Se inyectó extracto acuoso de las hojas de esta planta en roedores con carcinoma de Erlich y B16 melanoma, observándose después de cuatro semanas, una reducción

significativa del crecimiento del tumor y un aumento en la supervivencia de los roedores (Baral, 2004).

Glicine soya es originaria de China. Utilizada como alimento. Una isoflavona (2',6'-O-diacetyloninin) fue aislada de la soya y se observó actividad citotóxica contra la línea celular tumoral humana de carcinoma de estomago (Hs 740.T, Hs 756 T), adenocarcinoma mamario (Hs 578 T, Hs 742.T), y carcinoma de próstata (DU 145, LNCaP-FGC) (Hosny, 2002).

Annona muricata es de origen americano. Se utiliza como alimento. Se han aislado de las hojas de *A. muricata*, acetogeninas () con actividad citotóxica significativa contra la línea celular tumoral hepática Hepg-2 (Chang, 2001).

Larrea tridentata (*Creosote Bush*) se encuentra en regiones áridas de Estados Unidos de Norteamérica y México. Se utiliza en catarros, gripe, diarrea e infecciones urinarias. Se ha observado la disminución en el crecimiento de la línea celular tumoral MCF-7 cuando han sido tratadas con extractos crudos acuosos de *L. tridentata* (Van, 2007).

Hediotys difusa es una hierba que se utiliza en medicina tradicional china para fortalecer el sistema inmunológico. Se han aislado antraquinonas (2-hydroxy-3-methylantraquinona y 1-methoxy-2-hydroxyanthraquinona) de un extracto acuoso de esta hierba con gran actividad citotóxica sobre la línea celular tumoral hepática HepG-2 (Shi, 2008).

5.2.3.2. Plantas tóxicas con actividad antineoplásica

Argemone mexicana L. con nombre común: Amapolilla, chicalote. Pertenece a la familia Papaveraceae Se utiliza en la medicina popular para disolver nubes de los ojos e inflamaciones de los ojos y las hojas en infusión como remedio para la tos (Gutiérrez, 1981). En un estudio, para demostrar actividad antineoplásica de *A. mexicana* se aislaron las siguientes fracciones de un extracto clorofórmico de la parte aérea de la planta: dos alcaloides tipo benzofenantridina: N-dimetiloxisanguinarina y pancorina; tres alcaloides tipo benzilisoquinoleina: (+)-1,2,3,4-tetrahydro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimetoxifenilmetil-6,7-metilenedioxisoquinoleina ((+)-argenaxina), (+)-higenemina y (+)-reticulina. N-dimetiloxisanguinarina es un nuevo compuesto y (+)-argenaxina ya había sido aislada de una fuente natural. Además fueron aislados seis compuestos conocidos no alcaloides. Todos los compuestos fueron caracterizados según su espectro y evidencias químicas. Algunos alcaloides aislados fueron evaluados para su toxicidad en líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) y cáncer gástrico humano (NUGC). Celeritrina mostro actividad significativa contra la línea celular (NUGC), mientras que Angolina inhibió ambas líneas. (+)-Argenaxina mostró moderada actividad contra (NUGC) (Chang, 2003).

Cannabis sativa L. con nombre común: Marijuana, mariguana, cáñamo, bhang, charas, dagga, ganja, hachis, hemp, kif, ta ma, pertenece a la familia Moraceae. Se considera venenosa-tóxica: Se fuman las hojas y espigas florecidas, secas y molidas; a menudo se mezclan con tabaco en la elaboración de cigarros. El efecto principal es la euforia. Se ha mencionado la existencia desde una leve sensación de facilitar las alucinaciones, de exaltación de sentimientos y alegría interna, hasta depresión y

ansiedad. Aparte de afectar el sistema nervioso central, la acción de la droga parece ser secundaria. Esta acción consiste en acelerar el pulso y elevar la presión sanguínea, temblor, vértigos, dificultad en la coordinación muscular, aumento de la sensibilidad táctil y dilatación pupilar (Evans, 1982). Un estudio sobre esta planta analizó el efecto de aracidonyl ethanolamida (AEA), agente activo de *C. sativa*, contra líneas celulares de carcinoma de cervix. Se utilizó fragmentación de DNA y actividad de la caspasa-7 como marcadores de apoptosis. Las líneas celulares fueron expuestas a diferentes dosis de AEA con o sin antagonistas de AEA. La expresión de los receptores fueron analizados en el cultivo de células y en biopsias de carcinoma de cervix. Se encontró que el compuesto canabinoide induce apoptosis inhibiendo la expresión del receptor-1 vainilloide (VR1) necesario para la formación de CB-1 y CB-2 receptores que regulan el efecto protector. Por otro lado, se observó la expresión de tres formas de receptores en las biopsias de CxCa. Estos resultados sugieren que el blanco específico VR1 atacado por cannabinoides endógenos o moléculas sintéticas ofrece una atractiva oportunidad para el desarrollo de nuevas drogas anticancerígenas (Contassot, 2004). Los compuestos cannabinoides de *C. sativa* influyen en el control de la proliferación y apoptosis de numerosos tipos de células cancerosas (Bifulco *et al.*, 2003).

Convolvulus arvensis L. con nombre Común correhuela, pertenece a la familia: Convolvuláceae. La resina tiene una acción laxo-purgante similar a la de la jalapa, pero más suave; los alcaloides le confieren una acción hipotensora y vasodilatador coronario; los flavonoides, una actividad colagoga. En uso tópico se emplea como cicatrizante y estimulante de la bilis. Tónico de la digestión. Estreñimiento ocasional, disquinesia hepatobiliar, hipertensión, insuficiencia coronaria. Se empleó como purgante en

tratamientos antihelmínticos (Bruneton, 1991). Se obtuvo un extracto acuoso de *C. arvensis* probándose su actividad sobre fibrosarcoma S-180 de mono y se observó que cuando las proteínas y los polisacáridos del extracto fueron administrados a 200 mg/kg/día el tumor fue inhibido en un 70%, así como también se administró por vía subcutánea o intraperitoneal a una dosis de 50 mg/kg/día observándose el mismo efecto. La DL_{50} fue de 500 mg/kg/día cuando se administró por inyección, resultando en una dosis no tóxica para el animal (Meng, 2002).

Datura stramonium L. con nombres comunes: Chayotillo, frizillo, tapete, tlapa, toloatzin, tlaquoal, toloache. Pertenece a la familia: Solanaceae. Se ha utilizado en el Norte de México con fines medicinales y sagrados, ha sido objeto de precaución o temor, por sus efectos tóxicos capaces de enloquecer, idiotizar y hasta matar a sus consumidores ya que se emplea para provocar alucinaciones visuales, pero también tiene fines medicinales, como anestésico, en especial para aliviar dolores musculares y óseos en el reumatismo, para curar heridas, eliminar dolores de parto, desinflamar, reducir fracturas, corregir dislocaciones, hacer incisiones, drenar el pus, curar padecimientos uterinos, drenar. Sus propiedades medicinales son ampliamente reconocidas desde tiempos prehispánicos y al igual que otras plantas neurotrópicas, formaban parte de un conjunto genérico en la herbolaria. Son plantas analgésicas y narcóticas por excelencia y deben su efecto a la presencia en sus hojas y semillas de un numeroso grupo de alcaloides derivados del tropano: atropina, escopolamina e hiosciamina. Las propiedades farmacológicas de algunos de éstos alcaloides se aprovechan en forma de compuestos sintéticos que permiten su mejor cuantificación en los medicamentos que siguen estando en uso para aliviar el dolor y los ataques asmáticos. El uso reciente de estos productos se

da en el tratamiento de la excesiva salivación que padecen los enfermos del mal de Parkinson.(Martínez, 1990; Lozoya, 1999). En un estudio se encontró que una aglutinina de *D. stramonium* inhibió la proliferación de cuatro líneas celulares gliales humanas, sugiriendo los resultados que este compuesto puede ser útil como una nueva terapia para el tratamiento de gliomas (Sasaki, 2002).

Karwinskia humboldtiana Zucc. con nombre común: Tullidora, capulincillo, negrito. Pertenece a la familia: Rhamnaceae. Las semillas son sumamente tóxicas. Al ingerirlas paralizan los nervios motores. Las personas que llegan a comer, particularmente los niños, al poco tiempo presentan un cuadro de parálisis de los miembros inferiores. Las mismas semillas se utilizan como anticonvulsivo, pero su uso resulta peligroso. También se administra a personas con problemas de tétanos. Cuando la dosis que se ingiere es mayor que la debida la parálisis se extiende al resto del cuerpo y produce la muerte (Niembro, 1996). En un estudio in vitro se evaluó la toxina T-514 que es una antraquinona dimerica aislada de *K. humboldtiana*. Se evaluó el efecto antineoplásico de este compuesto y los resultados obtenidos fueron comparados con otros agentes conocidos. Fueron probadas líneas celulares normales y tumorales. Después de 72 horas de exposición, las células neoplásicas derivados de tejido pulmonar y hepático fueron más sensibles a la toxina T-514 que las células normales del órgano correspondiente. En hepatoma y adenocarcinoma de colon la LC50 fue <10ug/mL. En adenocarcinoma de pulmón, células de cáncer broncogénico indiferenciado y carcinoma de células pequeñas se observó una LC50 <20ug/mL. Todas las células normales probadas presentaron una LC50 >113ug/mL. Esta toxicidad selectiva in vitro encontrada en la toxina T-514 fue

también observada con 5-fluorouracilo y mitomicina en adenocarcinoma de colon y con epidoxurubicina para células de cáncer broncogénicas indiferenciadas (Pineiro, 1994).

Melia azedarach L. con nombre común: paraíso. Pertenece a la familia: Meliaceae. Para observar la actividad de esta planta se aislaron diez compuestos limonoides de un extracto metanólico del fruto de *M. azedarach*, siete de esos compuestos limonoides (1-7) fueron nuevos y tres (8-10) ya conocidos. Las estructuras de los nuevos compuestos fueron elucidadas por análisis de espectrometría de masas (MS) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Los compuestos 4 y 5 exhibieron actividad inhibitoria significativa contra la línea celular de cáncer HeLa S3 (Zhou, 2004).

Nerium oleander L. con nombre común: Adelfa. Laurel rosa. Pertenece a la familia: Apocinaceae. Contiene principios activos de propiedades Cardiotónicas y Diuréticas. Es una planta muy venenosa y totalmente desaconsejada para uso particular con acciones muy fuertes sobre el corazón en dosis pequeñas, por esta razón su uso debe estar sujeto a control médico. La intoxicación por Adelfa es parecida a la intoxicación digitálica, entre 4-12 horas después de la ingesta se producen alteraciones gastrointestinales acompañadas de náuseas y vómitos, con deposiciones diarreicas sanguinolentas, vértigo, ataxia, midriasis, excitación nerviosa seguida de depresión, disnea, convulsiones tetaniformes y arritmia en aumento, aparece taquicardia, fibrilación auricular y bloqueo con parada cardíaca. Conviene en caso de que aparezcan los primeros vómitos administrar fármacos analépticos, compuestos que tienen la virtud de restaurar el cuerpo. Controlar el ritmo cardíaco hasta que se normalice por completo. En zonas rurales se preparaba como loción para uso externo, como parasiticida contra la sarna utilizando las hojas frescas de adelfa mezcladas con miel y aplicada de forma

tópica (Haeba, 2002). El propósito de un estudio sobre esta planta fue examinar el mecanismo y el efecto de Anvirzel de un extracto de *N. oleander* y su derivado Oleandrin sobre células tumorales de perro, raton y humana. Las células recibieron diferentes concentraciones de Anvirzel(1-500yg/mL) o Oleandrin (0.01-50ug/mL).La citotoxicidad de ambos compuestos fue determinada. Ambos compuestos fueron capaces de inducir muerte celular en células de cáncer humanas pero no en murinas. Oleandrin mostro mayor actividad que anvirzel (Pathak, 2000).

Phoradendron tomentosum RAF. Engelm. Con nombre común: muérdago peludo. Las bayas son venenosas, pero los pájaros se alimentan de ellas. Se demostró actividad de una toxina de esta planta de la siguiente manera: Se aislaron cuatro proteínas (foratoxinas C-F) de *P. tomentosum* y fueron probadas en diferentes muestras de cultivos celulares tomados de pacientes. La foratoxina-C fue la que presento mayor actividad sobre los cultivos de carcinoma mamario (Johansson, 2003).

Solanum nigrum L. con nombre común: Hierba mora, veneno de cuervo, chichiquelitl, pahalkan, yerbamora. Pertenece a la familia: Solanaceae. Las hojas tiernas, flor y fruto son comestibles hervidas o en crudo. Las diferentes partes de la planta se emplean para calmar dolores externos, aplicándose en fomentos, solamente al exterior como calmante y vulneraria en fomentos. En el tratamiento de granos y abscesos, se lavan las partes afectadas con su cocimiento y se aplican cataplasmas de esta planta; su cocimiento también se usa para lavados vaginales. El cocimiento de la hoja se usa para la calentura, bilis, inflamación estomacal, susto, urticaria, anemia, chincual, incordios, fiebre, gripa, bilis. El cocimiento de las ramas aplicado localmente para golpes que dan calentura. La planta machacada aplicada localmente para cólicos, dolor de cabeza,

temperatura, anginas, erisipela, heridas. La infusión del tallo para la diarrea. (Sánchez, 1980; Aguilar, 1994). Para demostrar la actividad biológica de esta planta se realizó un estudio donde se preparó un extracto etanólico del fruto de *S. nigrum* y se investigó el mecanismo involucrado en el efecto inhibitorio sobre la línea celular de carcinoma mamario MCF-7. La capacidad proliferativa de las células MCF-7 fue inhibida en presencia del extracto utilizando el ensayo con tritium y confirmado con el de MTT y azul tripan. El extracto regula la proliferación celular por apoptosis demostrado por la apariencia del DNA como: incremento en la fragmentación del DNA y baja intensidad en la fluorescencia del núcleo después de teñir las células con yoduro de propidio (Son, 2003).

Tribulus terrestris L. con nombre Común: abrojos, abrepies, mormaga. De la familia: Zygophyllacea. Se ha observado daño al sistema nervioso central de ardillas (Bourke, 1992). Se realizó una investigación basada en los efectos de inhibición y apoptosis que inducen las saponinas aisladas de *Tribulus terrestris* sobre la línea celular de cáncer de hígado BEL-7402. Para evaluar los efectos de las saponinas sobre la línea celular de cáncer se utilizaron las siguientes técnicas: MTT, SRB, colorante de Wright, colorante naranja de acridina, citometría de flujo y microscopia de inmunofluorescencia. Las saponinas mostraron una potente actividad sobre las células BEL-7402. Las células exhibieron una morfología típica de apoptosis en el ciclo sug-G1. La expresión de Bcl-2 disminuyó en las células tratadas con respecto a las no tratadas (Sun, 2004).

Datura stramonium L. con nombre común estramonio, borrachero, burladora, hierba hedionda o higuera del infierno. De la familia: solanáceas. El aprovechamiento es

doméstico. A pesar de esto su aprovechamiento ha sido prohibido en México por la Secretaria de Salud y en otros países, debido a sus efectos tóxicos (Diario Oficial de la Salud, 1999). Una lectina aislada de *D. stramonium* inhibió la diferenciación de la línea celular C6 (Sasaki, 2002).

Baileya multiradiata Harv. Con nombre común: Maravilla del desierto. Pertenece a la familia: Asteraceae. Se ha observado toxicidad en el ganado. Sesquiterpenos aislados de *B. multiradiata* inhibieron significativamente el crecimiento de células de leucemia linfocítica murina (P388) (Pettit, 1978).

Magnolia officinalis es una planta de América y es utilizada como expectorante. Se aislaron neolignanós (piperitylmagnolol, magnolol, y honokiol) de un extracto metanólico de esta planta y se evaluó la toxicidad, encontrándose actividad contra las líneas celulares tumorales OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovario), HepG2 (carcinoma hepatocelular), y HeLa (carcinoma de cervix). El IC₅₀ estuvo en el rango de 3.3-13.3 µg/mL (Syu, 2004).

Karwinskia parvifolia es una planta tóxica que ocasiona síntomas similares a la de la poliomiéлитis. Se aislaron antracénonas (Peroxisomicinas A1 y A2) de *K. parvifolia* y se realizó un estudio de citotoxicidad en una línea celular tumoral hepática, encontrándose una actividad citotóxica significativa (Galindo, 2001).

Uncaria rhynchophylla nativa de China. Tiene usos medicinales anticancerígenos.

Se ha reportado que un extracto metanólico de esta planta presentó actividad citotóxica contra la línea celular tumoral de colon (Jo, 2008).

5.3. Descripción de Plantas Tóxicas Evaluadas en este Trabajo

Nombre científico: *Acacia gregii* A. Gray

Familia: Leguminosae

Nombres comunes: Gatuño

Palo Chino (Baja California) y

Uña de Gato (Sonora y Nuevo León).



Figura 3. *A. gregii*

Distribución:

Nuevo León, Sonora, Baja California, Coahuila, Chihuahua y Tamaulipas.

Características botánicas:

Árbol o arbusto de 8-9 m de alto y 30 cm de diámetro; hojas bipinadas con tres pares de pinas; flores amarillentas en espiga; fruto en vaina aplanada (Fig.3).

Usos:

Algunos grupos indígenas del Norte de México usan las semillas de esta planta como alimento y la goma que exuda el tronco, como pegamento.

Toxicidad:

En el otoño *A. gregii* causa envenenamiento del ganado que ingiere las hojas de esta planta, en las que se encuentra concentrado el principio tóxico. En los animales intoxicados los síntomas se presentan muy rápidamente; se ha observado midriasis, polipnea, convulsiones y muerte como resultado de la acción del veneno en los centros

respiratorios. Inicialmente las mucosas muestran un tono rojo brillante debido a que la sangre no ha cedido su oxígeno; en la etapa anterior a la muerte se tornan cianóticas, tiene lugar un periodo de excitación breve con salivación abundante y lagrimeo, al que sigue paro respiratorio. El envenenamiento con esta planta tiene una sintomatología semejante a la intoxicación con ácido cianhídrico se ha observado que para que se presente el envenenamiento es necesario que el animal haya consumido rápidamente grandes cantidades de las hojas. En el humano no se recomienda su consumo en infusiones (González, 1999).

Nombre científico: *Acacia berlandieri* Benth.

Familia: Leguminosae

Nombre común: Espino y guajillo.



Distribución:

Figura 4. *A. berlandieri*

Nuevo León, Durango, Chihuahua, Coahuila, Sinaloa y Tamaulipas.

Características botánicas:

Arbusto de 1 a 4 m de altura, presenta espinas y pubescencia; hojas compuestas con foliolos lineares oblongos; flores en cabezuelas, blancas y con aroma dulce; el fruto es una vaina pubescente (Fig. 4).

Usos:

La madera de esta planta se usa como combustible.

Toxicidad:

El principio tóxico de esta planta es N-metil- β -feniletilamina, compuesto relacionado a la amigdalina y glicosidos cianogénicos de las rosáceas. Este compuesto es el responsable del envenenamiento que se observa en el ganado (cabras y ovejas) cuando ingiere hojas y frutos de esta planta en cantidades apreciables. Generalmente el proceso de intoxicación puede llevar varias semanas, e incluso meses, y se manifiesta con ataxia de las patas traseras y ocasionalmente de las delanteras; algunas veces el animal muere. Se ha observado que las lesiones no son muy significativas. Cuando los animales se

intoxicación el síntoma más apreciable que sigue a la ataxia es la postración. Los efectos tóxicos siguen un efecto similar al de la efedrina, oxidando aminas simpaticomiméticas. La midriasis que se ha observado en algunos animales intoxicados es resultado también de la acción de esta amina tóxica (Pemberton, 1993).

Nombre científico: *Agave lechuguilla* Torr.

Familia: Agavaceae

Nombres comunes: Lechuguilla (Norte del Edo. de México), Maguey del cerro y pita (Tamaulipas), Tzeth y Tzuta (Hidalgo).



Figura 5. *A. lechuguilla*

Distribución:

Crece en forma silvestre en zonas áridas, y semiáridas desde el sur de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos de Norteamérica, hasta los centrales estados de Querétaro Hidalgo y Guanajuato en México (Silva, 2003).

Características botánicas:

Planta de 60 a 70 cm de altura, hojas dispuestas en roseta, falcadamente ascendentes, verdes o azuladas, de 40 a 60 cm de largo por 3 cm de ancho, provistas de una espiga terminal obscura; escapo de 2 a 2.5 cm y espiga de flores amarillas (Fig. 5).

Usos:

Son utilizados como protección de cultivos, formando cercas vivas. Las fibras de las hojas son utilizadas a nivel industrial, mezclándose con resina poliéster, para formar el ixtle reforzado, adquiriendo propiedades muy semejantes a la fibra de vidrio, y resistente a las temperaturas; obteniéndose materiales de construcción aislantes para graneros, silos, a un costo relativamente más barato y productos usados para la obtención de jarcería, sacos, cestería y cordelería. Tiene propiedades saponificantes por ello se utiliza

como jabón. La pulpa contiene compuestos bioactivos de interés, entre los que se destacan las saponinas que presentan diversas propiedades farmacológicas (Leonard y Shing, 2003).

Toxicidad:

Los síntomas mas evidentes de intoxicación por *A. lechuguilla* son el resultado de la acción de dos agentes, uno de ellos fotosensibilizador de la piel y el otro con efecto sobre el hígado y los riñones. Las especies animales afectadas mas frecuentemente son las cabras y las ovejas y en menor medida el ganado vacuno. En el caso del hombre las intoxicaciones mas frecuentes son por contacto con el vegetal aunque no se ha dilucidado con precisión este mecanismo de acción, ya que la fotosensibilidad puede o no aparecer cuando se presenta la intoxicación. A través de los estudios experimentales que llevaron al aislamiento de la hepatonefrotoxina se sabe que el compuesto fotosensibilizador y la saponina tóxica actúan independientemente. En trabajos experimentales se ha confirmado que la saponina tóxica presente en esta planta es soluble en agua, y no se inactiva al ser sometida a temperaturas elevadas. Al principio, los animales que han ingerido la planta muestran pérdida de apetito, indiferencia, debilidad progresiva, edema en la cabeza y orejas y una secreción amarillenta en los ojos y las pezuñas. Las principales lesiones que acompañan a la intoxicación, son la hepatitis y la nefritis, que se desarrollan lentamente hasta la instalación de un estado de coma de corta duración que precede a la muerte (González, 1989).

Nombre científico: *Brassica nigra* (L.) Koch.

Familia: Cruciferae

Nombres comunes:

Mostaza (Sonora),

Mostaza negra,

Xaa-guiña-castilla (Oaxaca).



Figura 6. *B. nigra*

Distribución:

En casi todo el país.

Características botánicas:

Planta herbácea de origen europeo, anual, ramosa, de hojas alternas, hispidas; las hojas inferiores con lóbulos terminales dentados y grandes, largamente pecioladas; flores pequeñas, amarillas, en racimos; las semillas son pequeñas; frutos en silicua (Fig. 6).

Usos:

En Europa suele utilizarse en la preparación de medicamentos de uso externo y de acción descongestiva, particularmente de las vías respiratorias. Suele utilizarse también como antirreumático.

Toxicidad:

Las semillas al contacto con el agua dejan escapar un aceite esencial que irrita fuertemente las glándulas lagrimales. Se han detectado en el aceite proteínas y un glucósido: la sinigrina, causante de la irritación de la piel y las mucosas. Los síntomas

más frecuentes por ingestión de las semillas consiste en diarreas hemorrágicas intensas, gastroenteritis aguda, enteritis crónica y cólico, pueden presentarse alteraciones en el sistema cardiovascular y en el renal su consumo puede ocasionar aborto. En humanos se ha observado alergias a la mostaza negra (Figuroa, 2005).

5.4. Técnicas para evaluar toxicidad de extractos vegetales

Al descubrir un compuesto natural con alguna actividad biológica (antitumoral, antihelmíntico, antioxidante, etc.) es conveniente determinar si presenta o no actividad tóxica. El Dr. McLaughlin desarrolló un método barato, rápido, fácil de realizar, para búsqueda y fraccionamiento de extractos de plantas fisiológicamente activos utilizó un bioensayo en el que utiliza un pequeño crustáceo, para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos, conocido como “letalidad de las larvas de *Artemia salina*. Aquellos extractos que exhiben actividad a una concentración <1000 ppm presentan actividad citotóxica y es posible que también alguna otra actividad como antitumorales, pues aunque el ensayo no es específico se considera predictivo y en forma general se utiliza como un preliminar de estudios para obtención de compuestos antitumorales (McLaughlin *et al.*, 1988). La técnica de letalidad de *A. salina* es una técnica conveniente para monitorear compuestos naturales con actividad biológica (Meyer *et al.*, 1982) y la toxicidad de compuestos en este crustáceo ha tenido buena correlación con la actividad antitumoral en líneas celulares (Almeida, 2000). Después del estudio preliminar los extractos bioactivos son evaluados con diferentes métodos, entre ellos está la técnica de WST-1 que mide proliferación o viabilidad celular es un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio a formazan, observándose un cambio de color que puede ser medido en un lector de ELISA. Pueden ser usados para medir la proliferación o viabilidad celular en respuesta a factores de crecimiento, citocinas, mitógenos y nutrientes (Freshney, 2000; Roche, 2002; Buff, 2005).

5.5. Organismos nacionales y mundiales que reconocen y promueven los fitofármacos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la importancia de este recurso terapéutico y generó un programa de reconocimiento y promoción de la medicina herbolaria y en 1990 promovió una serie de recomendaciones para la regularización de los medicamentos herbolarios.

La Secretaría de Salud en México (SS) reconoce que muchas de las plantas medicinales ampliamente conocidas por la población, están siendo utilizadas como fitofármacos y que esta práctica cada día tiene mayor relevancia, por lo que ha construido el marco para la regulación de estos productos, para lo cual ha formado diversos instrumentos como la propuesta del nuevo reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios en el cual se precisa la manera en que estos productos son tratados. El nuevo reglamento reconoce tres tipos de medicamentos: químico farmacéutico, medicamento herbolario que es paradójicamente un nuevo concepto, es el producto elaborado con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de alguna planta o extractos o tinturas; así como: jugos, resinas, aceites grasos y esenciales presentados en forma farmacéutica. Su uso terapéutico está basado en el conocimiento tradicional o popular y su efectividad y seguridad están establecidas tanto en la literatura nacional como internacional (SSA, 2001).

El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) fue la primera institución del Sector Salud en incorporar un cuerpo de investigadores para atender el estudio de la medicina tradicional mexicana y especialmente la herbolaria mexicana desde un punto de vista

científico. A través de un amplio trabajo etnobotánico y un intenso programa de rastreo farmacológico ha sido posible la selección de plantas medicinales con un gran potencial terapéutico. Especies vegetales que crecen en forma espontánea en nuestro país y que, por su uso médico tradicional, sus componentes químicos, sus efectos farmacológicos, la estabilidad de sus productos y su comportamiento clínico, se perfilan como nuevos medicamentos herbolarios (Aguilar, 1982).

El uso de plantas medicinales lejos de verse desplazado ha cobrado fuerza, es previsible un gran aumento de la demanda del medicamento herbolario. Se observa un creciente interés de los países desarrollados en los medicamentos de origen vegetal, se cuenta con un vasto y eficiente trabajo etnobotánico, la experiencia acumulada crea una atmósfera propicia para promover el cultivo, industrialización, comercialización y exportación de plantas medicinales en forma de medicamentos herbolarios.

6. MÉTODOS

6.1. Material Biológico

A. berlandieri (parte aérea)

A. gregii (parte aérea)

A. lechuguilla (hojas)

B. nigra (parte aérea)

Huevecillos de *A. salina*

Línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria)

Línea celular HeLa (carcinoma de cérvix)

Línea celular Vero (riñón de mono verde africano)

6.2. Estrategia de trabajo desarrollada

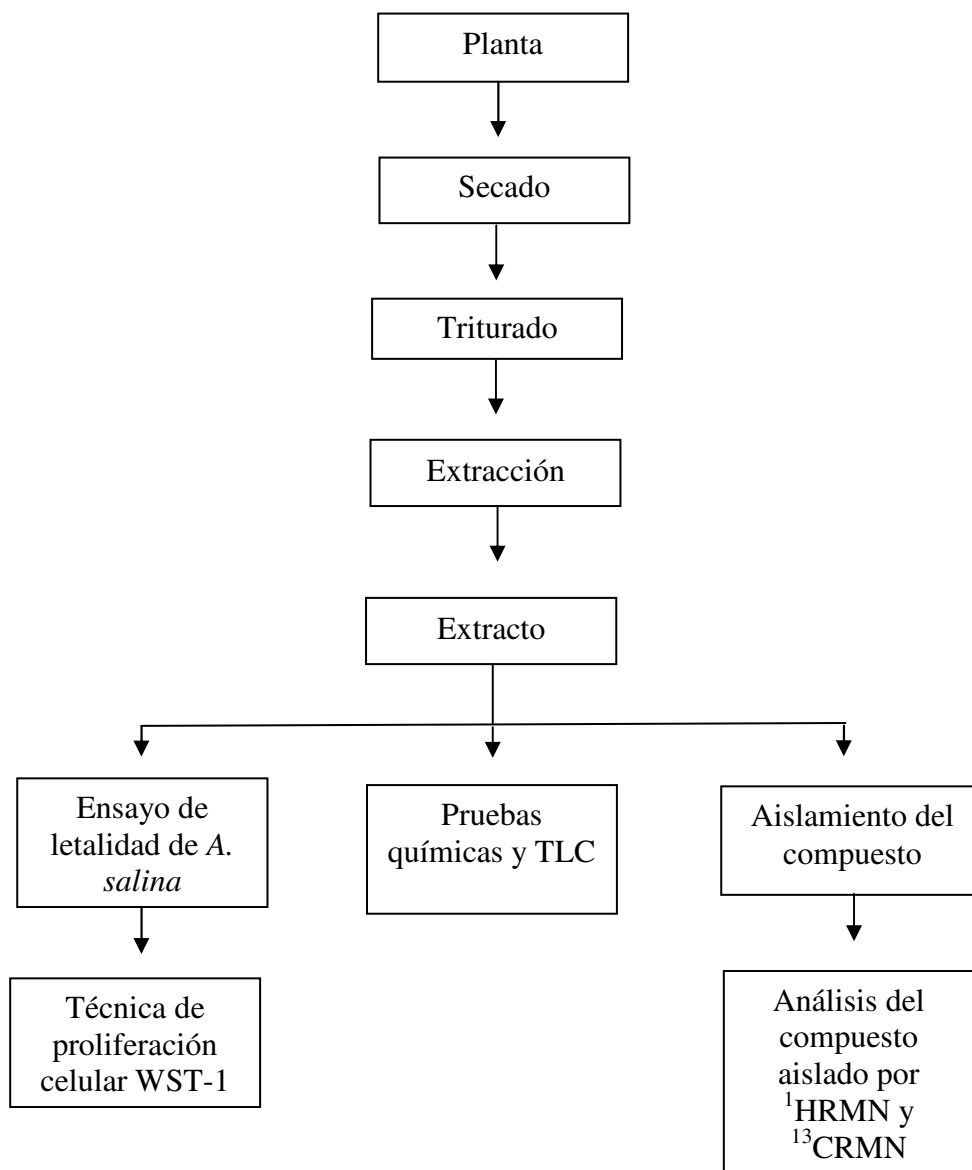


Figura 7. Metodología realizada a partir de la colecta hasta la evaluación de la actividad antineoplásica de las plantas tóxicas seleccionadas.

6.2.1. Colecta de plantas

Se colectó la parte aérea de cuatro especies de plantas en el Estado de Nuevo León: *A. berlandieri* en el Municipio de Guadalupe; *A. gregii*, *B. nigra* y *A. lechuguilla* en Monterrey. Se identificaron en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2.2. Obtención de los extractos

Las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 8 días y posteriormente en estufa a $< 40^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Una vez secas se cortaron en piezas de aproximadamente 1cm^2 . La extracción se realizó en un agitador Dual Actino Shaker Lab-Line a temperatura ambiente. Se utilizaron 30 g de la muestra seca, en un matraz de 500 mL con 250 ml del solvente, y se colocaron en el Shaker durante 7 días. La extracción se realizó con tres solventes de menor a mayor polaridad: hexano, acetona y metanol para todas las especies de plantas y además etanol solamente para *A. lechuguilla*. Después de la agitación se filtró en papel Whatman #1, evaporándose el solvente a temperatura ambiente y en estufa a $< 40^{\circ}\text{C}$. Se pesó el extracto obtenido para calcular el rendimiento, guardándose en refrigeración.

6.3. Determinación de la actividad toxica de los extractos con el ensayo BSLA

6.3.1. Eclosión de huevecillos de *A. salina*

Se preparó 100 mL del medio (agua de mar) para *A. salina* con 40 g de una mezcla de sal comercial (Instant Ocean, Aquarium Systems) y 6 mg/L de suplemento alimenticio de levadura de cerveza (Mead Johnson). Y se colocó en un recipiente de incubación dividido en dos compartimentos (manteniendo siempre el volumen). Se utilizó una bomba de aire y lámpara de 60 Watts. Se colocaron 100 mg de huevecillos de *A. salina* (PETMART, Brine Shrimp eggs, San Francisco Bay Brand, Inc.) en uno de los compartimentos cubierto de la luz y el otro se dejó expuesto a la luz, se incubó por 24 h entre 22 y 29 °C; posteriormente se aspiraron los nauplios del lado iluminado del recipiente de incubación y se pasaron a otro recipiente de cultivo con medio nuevo. Se incubó 24 h más a la misma temperatura en presencia de luz. Antes de realizar el bioensayo se cambió el medio y se ajustó el número de nauplios de 5-12/100 µL.

6.3.2. Ensayo de Letalidad de *A. salina*

Se utilizó una microplaca de 96 pozos y se adicionaron 100 µL del medio con nauplios (5-12) en cada pozo. Se agregó 100 µL de cada una de las diluciones del extracto a evaluar (10, 100 y 1000 µg/mL) por triplicado. Se utilizó un control positivo con K₂Cr₂O₇ (400 ppm) y la dilución del solvente utilizado con las muestras (DMSO, DMFM). Se cubrió la microplaca y se incubó a temperatura ambiente en presencia de luz por 24 h. Después de la incubación se contaron los nauplios muertos en un microscopio estereoscópico (8-10X). Se adicionaron 100 µL de etanol 70% por 30 min para ocasionar la muerte de la totalidad de los nauplios y determinar el número total por

pozo. Se determinó el porcentaje de mortalidad y se calculó la DL_{50} por medio de regresión lineal. Los extractos que presentaron una $DL_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ se consideraron candidatos para ser evaluados por la técnica de citotoxicidad WST-1.

6.4. Evaluación de la actividad citotóxica por medio de la técnica WST-1

Los extractos se probaron en las líneas celulares tumorales ya mencionadas para ver el efecto antineoplásico.

6.4.1. Descongelación de líneas celulares

Se descongelaron las células transfiriendo todo el contenido de células a un tubo cónico con 5 mL de medio de cultivo. Se centrifugó a 1000 rpm, a una temperatura de 25°C por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 2 mL de medio, homogenizando suavemente de donde se tomaron 1 mL para cada una de las botellas de cultivo previamente preparadas con el medio adecuado. Se incubaron las células a una temperatura de 37°C en un atmósfera húmeda y CO₂ al 5 %.

6.4.2. Mantenimiento de las líneas celulares

Los cultivos se mantuvieron en frascos de 25 cm², para la línea celular Hela se utilizó medio de cultivo MEM, para la línea celular MCF-7, medio RPMI suplementado con 10 % y para la línea celular Vero medio M199 con 4% de suero fetal bovino, además a todos los medios se les adicionó una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomicina 100 mg/ml; se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5 %. Los cultivos se resembraron aproximadamente cada semana.

6.4.3. Resiembra de células

Las células se resembraron cuando la monocapa se observó al 85-95% de confluencia. En condiciones asépticas y con utilización de vacío, se eliminó el medio de la botella de cultivo. Se lavó el cultivo suavemente, dos veces con buffer de fosfatos

salino (PBS) y se agregó tripsina al 0.25 incubando aproximadamente 10 min a las condiciones antes mencionadas, esperando a que se despegaran las células. Se neutralizo con medio, homogenizando suavemente. Se pasaron 0.5 mL a botellas con 4.5 mL de medio..

6.4.4. Determinación de proliferación celular con WST-1

Los cultivos se lavaron 2 veces con PBS. Para despegar las monocapas celulares se utilizo una solución de tripsina al 0.25 %. Después la suspensión de células se transfirió a tubos cónicos graduados con tapón de rosca se centrifugaron a 1000 rpm a una temperatura de 25°C por 5 min. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar 2mL Se contaron las células en un hemocitómetro utilizando un microscopio invertido (Iroscope/Mod. S1-PH). Se observó la viabilidad con azul tripan. Se sembraron 3×10^3 cel/100 μ L por cada pozo en una microplaca grado cultivo celular, de 96 pozos, fondo plano y se incubaron a 36 °C, en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% por 24 h. Se adicionaron 100 μ L de cada una de las diferentes diluciones de extractos (50, 100, 150 μ g/mL) y saponinas (1, 10, 100 μ g/mL) y se incubaron por 48h a las mismas condiciones. Se colocó el reactivo WST-1. Se utilizó taxol 1 μ M como control positivo para células tumorales y tritón 0.5 N para células normales. Se incubó por 1 h y se leyó la absorbancia en un lector para microplaca (Sigma Diagnostics). Los valores de IC₅₀ se obtuvieron por análisis de regresión lineal.

6.5. Identificación de grupos funcionales en extractos con mayor actividad sobre

A. salina

6.5.1. Reacciones químicas

Para la identificación de compuestos se utilizaron las siguientes pruebas coloridas: para sesquiterpenlactonas prueba de Baljet, para esteroides y triterpenos prueba de Lieberman – Buchard, para saponinas la prueba antes mencionada y la de hemolisis, para alcaloides prueba de Dragendorff y para cumarinas prueba del hidróxido de sodio (Apéndice A).

6.5.2. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se realizó cromatografía en capa delgada de los diferentes extractos. Para la determinación de saponinas se utilizó el siguiente sistema de solventes: cloroformo-metanol-agua (65:50:10), y como agente cromogénico: Sangre/PBS. Para la determinación de cumarinas se utilizó : tolueno-éter etílico 1:1/saturado con ácido acético 10% y como agente cromogénico: luz U.V. 365nm (azul,verde). Para alcaloides el sistema de solventes fue cloroformo-metanol 9:1 y como agente cromogénico: reactivo de Dragendorff (anaranjado, marrón). Para sesquiterpenlactonas el sistema de solventes: cloroformo-metanol 9:1. Para esteroides el sistema de solventes utilizado fue benceno-cloroformo 9:1. Se utilizó como agente cromogénico vapores de yodo para sesquiterpenlactonas y esteroides.

6.6. Obtención de saponinas crudas

Para obtener las saponinas el extracto etanólico de *A. lechuguilla* se efectuó en un equipo Soxhlet con extracción continua, a partir de 50 g de la planta y 150 mL de alcohol etílico 80%. Se realizó por 4 veces y se evaporaron en estufa a una temperatura menor de 40 °C. Se obtuvieron 2 g de extracto etanólico y se colocaron en 10 tubos cónico de 15 mL. Se adicionaron 5 mL de etanol 50% y se agitó en vortex (VX-2500/multitube Vortexer). Se adicionó 5mL de benceno y se agitó en vortex por 15 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se obtuvieron las saponinas de la interfase formada, separándose con una pipeta Pasteur. Se colocaron en un vial de peso conocido en una estufa a < 40 °C. Se calculó el rendimiento de la saponina cruda.

6.6.1. Obtención e identificación de saponinas cristalizadas

Se colocaron en un matraz bola de 50 mL, 0.60 g de la saponina cruda obtenida, con 25 mL de alcohol etílico 50% y 3 mL de una solución de hidróxido de potasio (KOH) con metanol 1M. Se reflujo por 2 h, se dializó para eliminar sales y se pasó a un vial de peso conocido y se evaporó. Se calculó el rendimiento de la saponina cristalizada.

6.6.2. Identificación de saponinas cristalizadas

Se identificó la saponina por espectroscopía de Resonancia Magnético Nuclear de protones y carbono 13 (Apéndice B), utilizando el espectrofotómetro Bruker-Avance DPX 400 MHz.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención del extracto

Se obtuvieron 13 extractos a partir de cuatro plantas tóxicas (*A. berlandieri*, *A. gregii*, *B. nigra* y *A. lechuguilla*) como se observa en la Tabla II. Los extractos de mayor rendimiento fueron etanólico y acetónico de *A. lechuguilla* (12 y 7.6 %).

Tabla I
Rendimiento de los trece extractos obtenidos de plantas tóxicas.

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	Rendimiento (%)
<i>A. berlandieri</i>	Tallos y hojas	metanólico	2.1
<i>A. berlandieri</i>	Tallos y hojas	acetónico	3.1
<i>A. berlandieri</i>	Tallos y hojas	hexánico	2.3
<i>A. gregii</i>	Tallos y hojas	metanólico	5.5
<i>A. gregii</i>	Tallos y hojas	acetónico	8.3
<i>A. gregii</i>	Tallos y hojas	hexánico	1.6
<i>B. nigra</i>	Tallos, hojas, frutos y semillas	metanólico	1.5
<i>B. nigra</i>	Tallos, hojas, frutos y semillas	acetónico	2.0
<i>B. nigra</i>	Tallos, hojas, frutos y semillas	hexánico	2.0
<i>A. lechuguilla</i>	Hojas	metanólico	2.2
<i>A. lechuguilla</i>	Hojas	acetónico	12
<i>A. lechuguilla</i>	Hojas	hexánico	1.2
<i>A. lechuguilla</i>	Hojas	etanólico	7.6

7.2. Determinación de la actividad tóxica sobre *A. salina*

De los trece extractos probados, cuatro fueron los que presentaron una actividad $\leq 100 \mu\text{g/mL}$: etanólico, hexánico y acetónico de *A. lechuguilla* y hexánico e *A. berlandieri* con una DL_{50} de 46.3, 53.5, 56.3 y 86.3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla III).

7.3. Identificación de grupos funcionales en extractos con mayor actividad sobre

A. salina

7.3.1. Reacciones químicas

Los resultados de las reacciones químicas sugieren la presencia de los siguientes tipos de compuestos en los extractos que presentaron mayor actividad sobre *A. salina*: sesquiterpenlactonas (SESQ), saponinas (SAP), alcaloides (ALC), esteroides (EST) y cumarinas (CUM) (Tabla IV). Se seleccionaron las saponinas como compuestos con posible actividad contra células tumorales por estar registradas en la literatura como potentes antineoplásicos en otras especies de plantas, por lo que también se eligieron los extractos acetónico y etanólico que son los que registraron mayor concentración de saponinas.

Tabla II**Toxicidad de 13 extractos de 4 plantas tóxicas sobre *A. salina***

Planta	Tipo de extracto	LD ₅₀ (µg/mL)
<i>A. berlandieri</i>	metanólico	>500
	acetónico	>500
	hexánico	86.3
<i>A. gregii</i>	metanólico	>500
	acetónico	>500
	hexánico	120
<i>B. nigra</i>	metanólico	>500
	acetónico	>200
	hexánico	131.6
<i>A. lechuguilla</i>	metanólico	>500
	acetónico	56.3
	hexánico	53.5
	etanólico	46.3

Tabla III**Grupos funcionales identificados en extractos más activos sobre *A. salina***

Extracto	SESQ	SAP	ALC	EST	CUM
<i>A. berlandieri</i> HEX	-	-	-	+	-
<i>A. lechuguilla</i> HEX	-	+	-	+	+
<i>A. lechuguilla</i> AC	+	++	++	+	+
<i>A. lechuguilla</i> ET	+	+++	++	+	++

7.3.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD)

7.3.2.1. Saponinas

Se observaron zonas marcadas de hemólisis en los extractos etanólico y acetónico de *A. lechuguilla*, con Rf de 0.8529 para ambos. El extracto hexánico no mostró zona de hemólisis como se muestra en la Figura No.8.

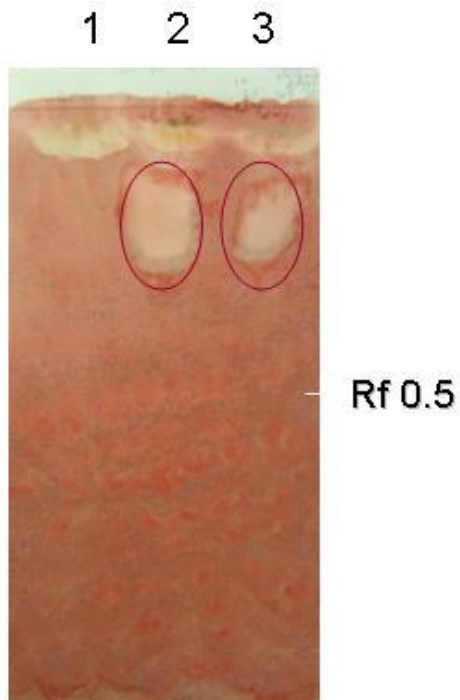


Figura No. 8.-Bandas observadas en una CCD para saponinas de extractos de *A. lechuguilla*: hexánico(1),acetónico (2) y etanólico (3).

7.3.2.2. Cumarinas

En la determinación de cumarinas, al ser observada la placa cromatográfica a la luz U.V. a 365nm, los extractos hexánico, acetónico y etanólico muestran 4 (Rf: 0.2764, 0.4882, 0.5647 y 0.7294), 2 (0.2647 y 0.3352) y 3 (0.3705, 0.4941 y 0.5705) bandas bien definidas de color azul, respectivamente, como se muestra en la Figura No 9.

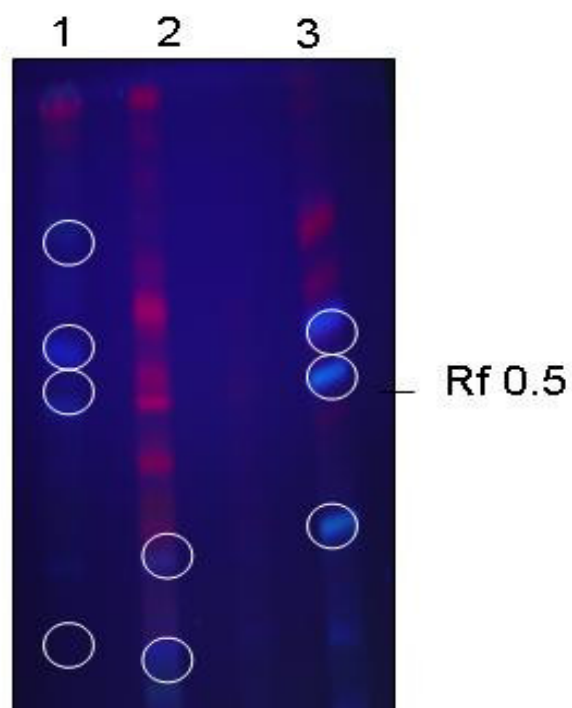


Figura No.9. Bandas observadas en una CCD para cumarinas de extracto de *A. lechuguilla*: hexánico (1),acetónico (2) y etanólico (3).

7.3.2.3. Alcaloides

En la CCD para alcaloides tanto el extracto acetónico y etanólico mostraron 5 bandas de color anaranjado marrón con los siguientes Rf: 1 (0.3235, 0.4411, 0.9818, 0.7529 y 0.8647) y 2 (0.9818, 0.7529, 0.8294, 0.8647 y 0.8882) (Figura No. 10).

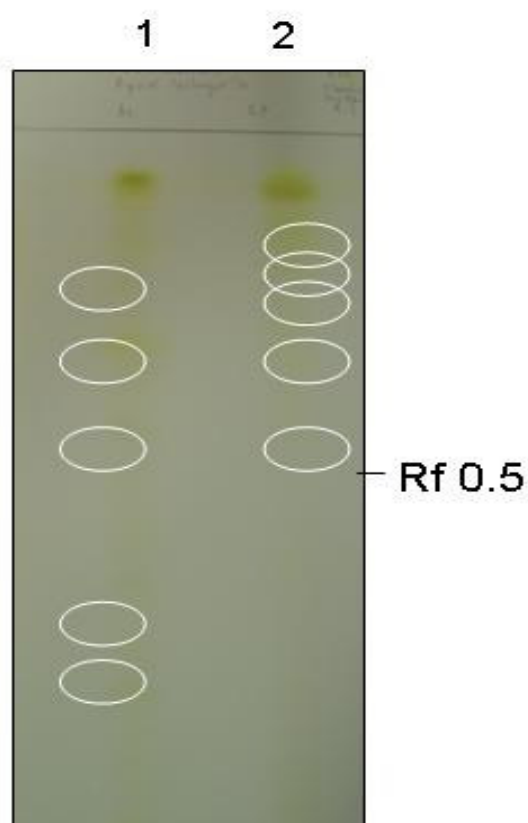


Figura No.10. Bandas observadas en una CCD para alcaloides de extractos de *A. lechuguilla*: acetónico (1) y etanólico (2).

7.3.2.4. Sesquiterpenlactonas

En los extractos acetónico y etanólico se observaron 13 (Rf: 0.0294, 0.0529, 0.0764, 0.1470, 0.3117, 0.3352, 0.3647, 0.6235, 0.6764, 0.8058, 0.8529, 0.9058 y 0.9411) y 10 (Rf: 0.0294, 0.0529, 0.1470, 0.3117, 0.4823, 0.6764, 0.8058, 0.8529, 0.9058 y 0.9705) bandas en la CCD realizada (Figura 11).

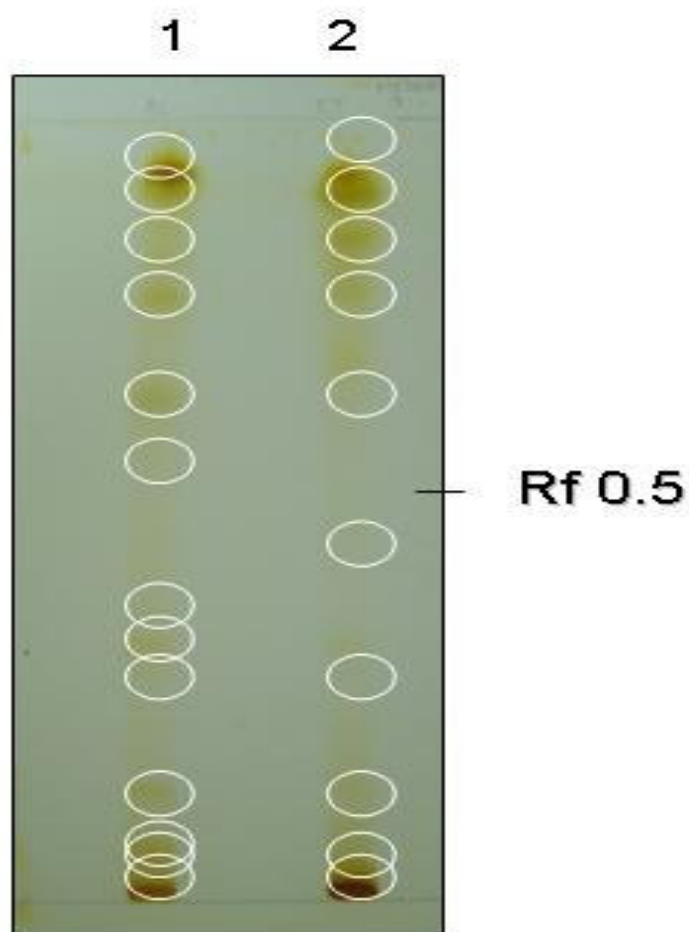


Figura 11. Bandas observadas en una CCD para sesquiterpenlactonas de extractos de *A. lechuguilla*: acetónico (1) y etanólico (2).

7.3.2.5. Esteroles

Para esteroles observamos 10 (Rf: 0.0647, 0.1142, 0.1294, 0.1529, 0.2470, 0.5882, 0.8411, 0.9068 y 0.9294) y 6 (Rf: 0.1058, 0.1411, 0.2647, 0.6470, 0.7000 y 0.9176) bandas para el extracto hexánico de *A. lechuguilla* y *A. berlandieri* respectivamente ;asi como 5 (Rf: 0.0647, 0.1142, 0.6470, 0.9068 y 0.9294) y 7 (Rf: 0.0647, 0.1000, 0.1117, 0.1294, 0.6470, 0.7647 y 0.9176) bandas para el extracto acetónico y etanólico de *A. lechuguilla* (Figura 12).

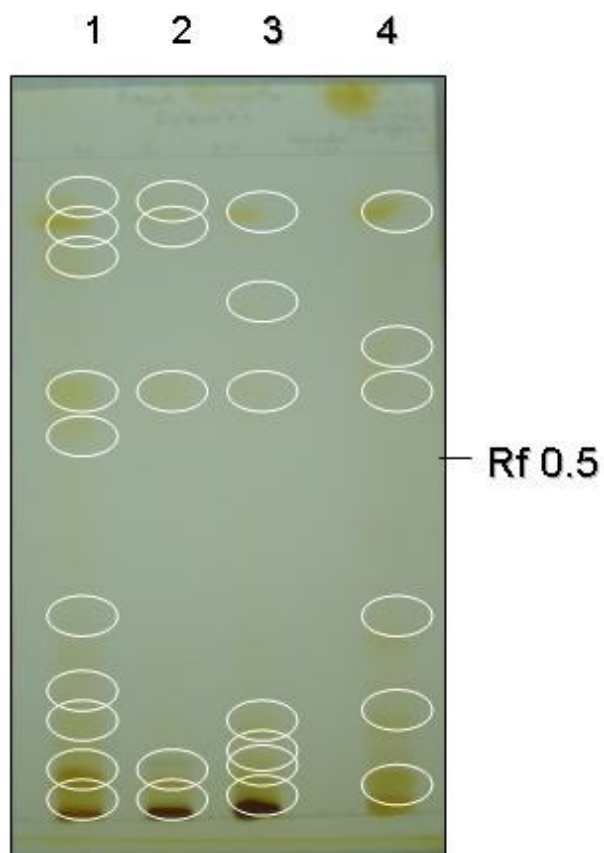


Figura 12. Bandas observadas en una CCD para esteroles de extractos de *A. lechuguilla*: hexánico (1), acetónico (2), etanólico (3) y hexánico(4) de *A. berlandieri*.

7.4. Obtención de saponinas

El rendimiento total de saponinas fue de 2.2 % a partir de 50 g de hojas de *A. lechuguilla* con extracción etanólica obtenido por Soxhlet. A partir de la saponina cruda, se obtuvo 1% de saponina cristalizada por saponificación (Tabla V). A las saponinas obtenidas se les realizó una CCD para confirmar su presencia (Fig. 13).

Tabla IV
Rendimiento de saponinas obtenidas de hojas de *A. lechuguilla*

Compuesto	Peso	Rendimiento
Saponina cruda	1163mg	2.2%
Saponina cristalizada	500mg	1%

7.4.1. Confirmación de presencia de saponinas

7.4.1.1. Prueba de hemólisis por CCD

Se observó una banda y área de hemólisis muy clara para saponina cruda y cristalizada, confirmándose su presencia. $R_f = 0.8529$ (Fig. 13).

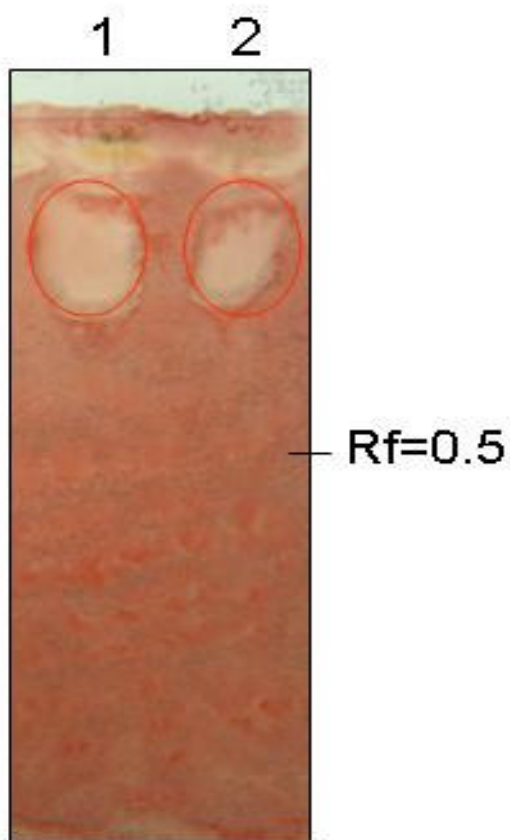


Figura 13. Bandas observadas en una CCD para saponinas de *A. lechuguilla*. Saponina cruda (1) y saponina cristalizada (2).

7.4.1.2. Espectroscopia de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$

En los espectros, encontramos los desplazamientos químicos característicos de una saponina esteroideal, (Tabla VI).

Tabla V

Carbonos	$^1\text{HRMN}$	$^{13}\text{CRMN}$
Grupos metilo		
C-27	0.79	16.4
C-19	0.85	19.9
Sistema Spiroacetal		
C-26	3.51 ^b	74.1 ^f
C-23	1.77	36.8 ^e
C-22		114.7 ^d
C-16	4.62 ^a	81.2 ^c
Fusión cis de anillos A/B		
C-19	0.85	23.6 ⁱ
C-9	1.19	39.8 ^h
C-5	2.25	36.2 ^g

$^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ (δ en ppm) de la saponina aislada

De acuerdo a los espectros de ^1H RMN (Apéndice B) encontramos señales del sistema spiroacetal en ^a δ 4.62 (C-16) y ^b δ 3.51 (C-26), mismas que ya se han reportado para este tipo de estructura (Domínguez,1973), además las señales de $^{13}\text{CRMN}$: ^c δ 81.2 (C-16), ^d δ 114.7 (C-22), ^e δ 36.8 (C- 23) y ^f δ 74.1 (C-26), las cuales concuerdan con otras.

7.5. Actividad antineoplásica de extractos seleccionados y saponinas

7.5.1. Citotoxicidad del extracto acetónico y etanólico de *A. lechuguilla* sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7

El extracto etanólico como se muestra en la Tabla VII, fue el extracto que presentó mayor toxicidad en la línea celular tumoral HeLa con respecto al extracto acetónico (IC_{50} 89 y 142 $\mu\text{g/mL}$); además la toxicidad del extracto etanólico en la línea celular tumoral HeLa fue mayor que en la línea celular normal Vero (IC_{50} 126 $\mu\text{g/mL}$). El extracto acetónico de *A. lechuguilla* mostró mayor toxicidad sobre la línea celular Vero con respecto a las líneas celulares tumorales HeLa (IC_{50} 135 $\mu\text{g/mL}$ y 142 $\mu\text{g/mL}$). En la línea celular tumoral MCF-7 ambos extractos presentaron una citotoxicidad no relevante ($IC_{50} >150 \mu\text{g/mL}$). Los valores de IC_{50} se obtuvieron por regresión lineal Fig. (Fig. 14 y 15). El índice de selectividad (IS) de los extractos etanólico y acetónico de *A. lechuguilla* sobre las células HeLa comparados con la línea normal Vero fue de 1.4 y 0.95, por lo que el extracto etanólico es más citotóxico para las células tumorales que para las células normales de los extractos analizados

Tabla VI

Citotoxicidad de extractos y saponinas de *A. lechuguilla* sobre células tumorales

<i>A. lechuguilla</i>	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
	Vero	MCF-7	HeLa
Extracto acetónico	135	>150	142
Extracto etanólico	126	>150	89
Saponina cruda	71.6	>150	95
Saponina cristalizada	172.2	>150	78

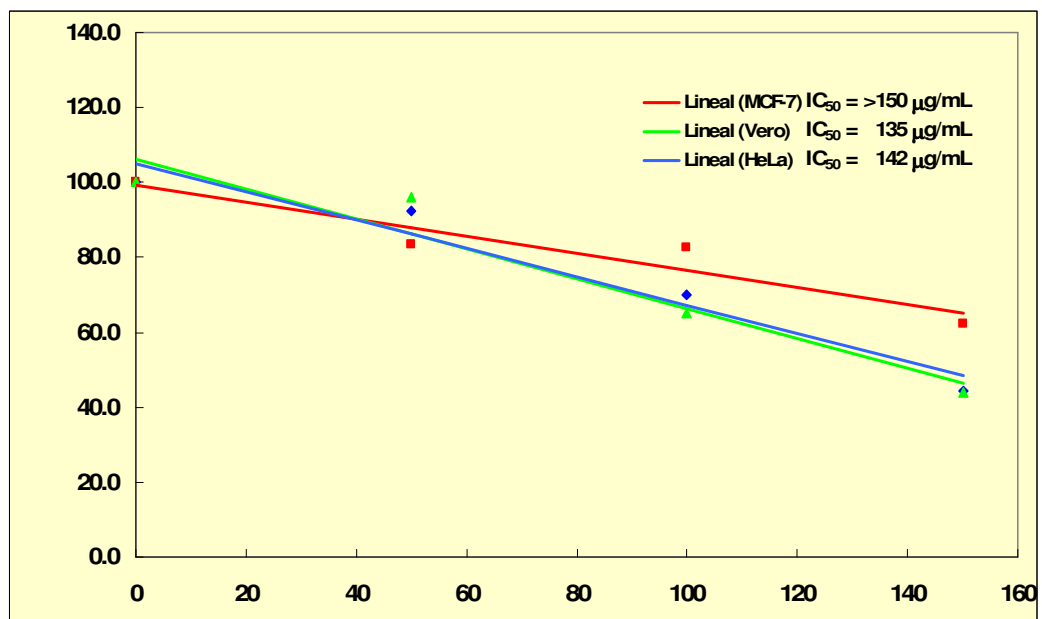


Figura 14. Citotoxicidad del extracto acetónico de *A. lechuguilla* sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.

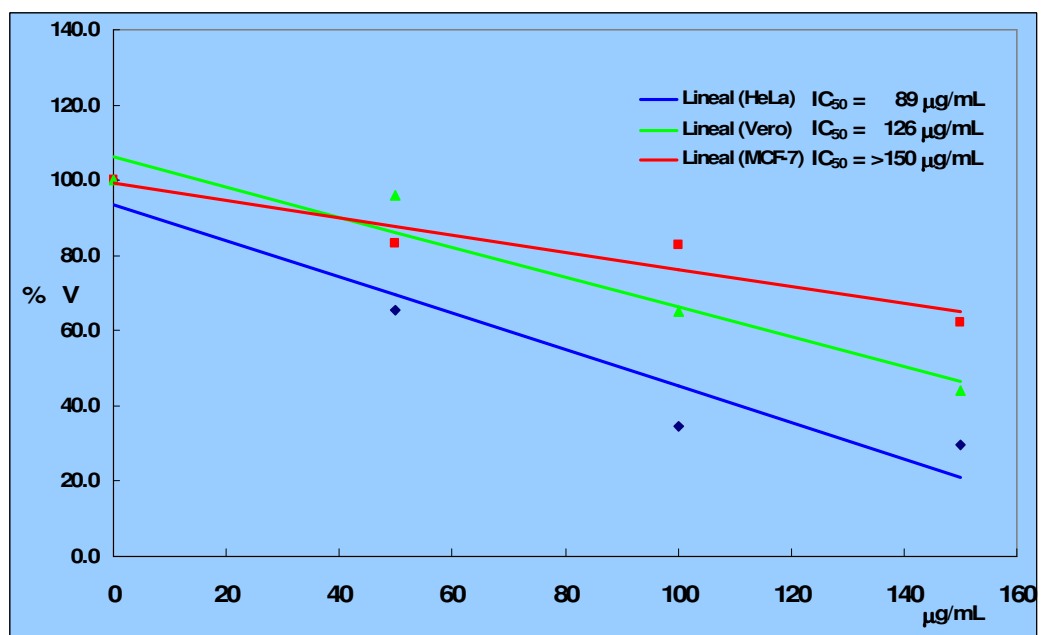


Figura 15. Citotoxicidad del extracto etanólico de *A. lechuguilla* sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.

7.5.3. Citotoxicidad de saponinas de *A. lechuguilla* sobre líneas celulares

tumorales HeLa y MCF-7

Las saponinas crudas de *A. lechuguilla* mostraron mayor toxicidad sobre línea celular HeLa con una IC_{50} de 89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto a la línea celular MCF-7 que observaron una $IC_{50} > 150 \mu\text{g}/\text{mL}$. En la línea celular Vero, las saponinas crudas mostraron mayor toxicidad (IC_{50} 71.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que en las líneas celulares tumorales. (Fig. 16 y 17). Las saponinas cristalizadas fueron mas tóxicas en la línea celular tumoral HeLa (IC_{50} 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que los extractos (IC_{50} 142 y 89 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las saponinas crudas (IC_{50} 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con respecto a la línea celular tumoral MCF-7, así como en la línea celular normal Vero, las saponinas cristalizadas mostraron menor toxicidad ($IC_{50} > 150 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabla VII). Con respecto a las células HeLa y Vero, las saponinas crudas presentaron un IS resultante de 0.75 y las cristalizadas un IS de 2.20.

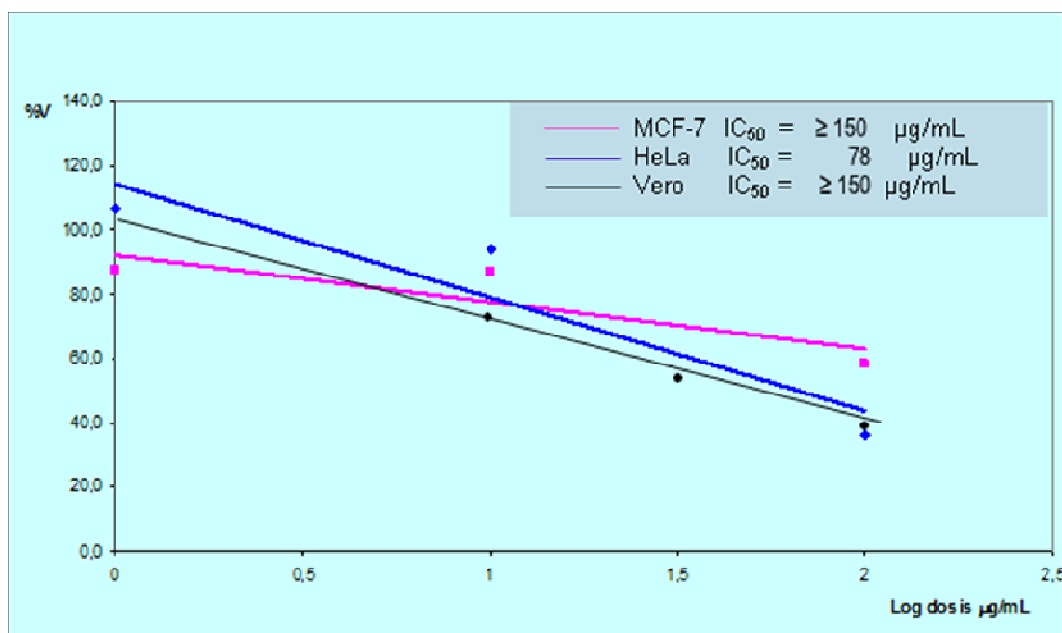


Figura 16. Citotoxicidad de saponinas crudas de *A. lechuguilla* sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.

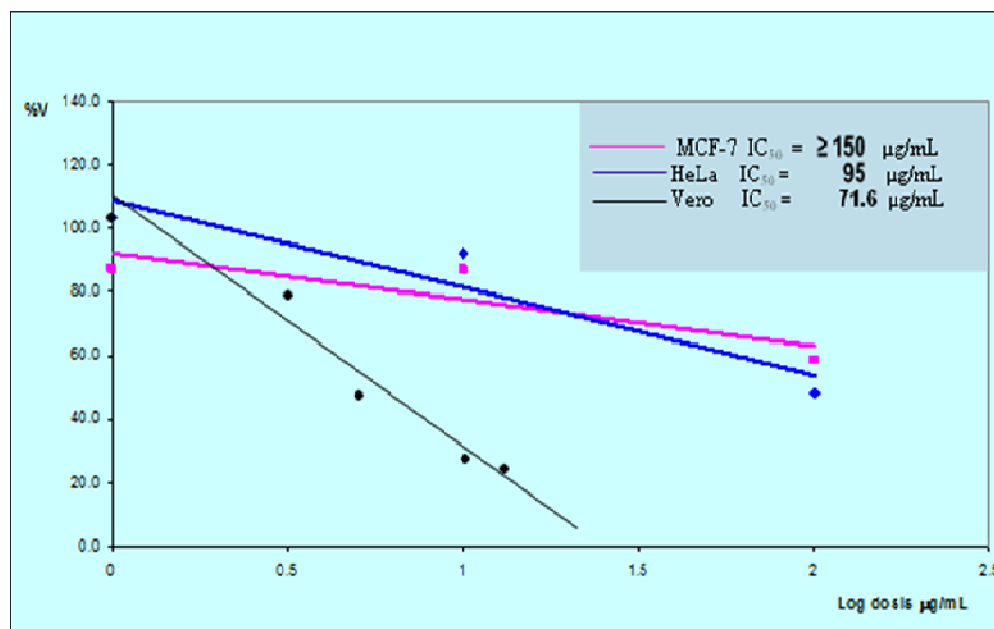


Figura 17. Citotoxicidad de saponinas cristalizadas de *A. lechuguilla* sobre las líneas celulares tumorales HeLa y MCF-7.

8. DISCUSIÓN

Esta bien documentado que las plantas tóxicas contienen compuestos que presentan actividad antineoplásica como son *Taxus brevifolia* y *Colchicum tunicatum* reportadas contra la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), entre otras (Bifulco *et al.*, 2003; Zhou, 2004; Tian Z, 2006; Alali *et al.*, 2006; Zhong, 2007). El objetivo de nuestro estudio fue obtener compuestos antineoplásicos a partir de extractos crudos de cuatro plantas tóxicas del norte de México: *A. berlandieri*, *A. gregii*, *B. nigra* y *A. lechuguilla*. La primera técnica preliminar utilizada para seleccionar los extractos con potencial antineoplásico a partir de estas cuatro plantas tóxicas fue el Ensayo de Letalidad sobre *A. salina*.

El Ensayo de Letalidad sobre *A. salina* es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con potencial biológico, debido a que se ha demostrado que este crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas (Vanhaecke *et al.*; 1981; Meyer *et al.*, 1982; González *et al.*, 2007). Se ha determinado que esta técnica tiene una posible correlación con las pruebas específicas de citotoxicidad (Mc Laughlin, 1993). Se han reportado extractos metanólicos de ocho especies de *Argyranthemum* que fueron evaluados contra *A. salina*, considerándose activos los extractos que presentaron actividad en un rango de 300 a 360 µg/mL. En base a estos resultados dichos autores continuaron el estudio evaluando la actividad en células tumorales Caco-2 (adenocarcinoma de colon), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), resultando los extractos metanólicos de *A.*

adauctum ssp. jacobaeifolium y *A. adauctum ssp. palmensis* con actividad tumoral con valores de IC₅₀ entre 80-90 µg/mL (Badisa, *et al*, 2004).

En la presente investigación, de 13 extractos crudos de las plantas estudiadas, los resultados del Ensayo de Letalidad sobre *A. salina* mostraron que fueron cuatro los que presentaron una mayor toxicidad: etanólico, hexánico y acetónico de *A. lechuguilla* y hexánico de *A. berlandieri* con DL₅₀ de 46.3, 53.5, 56.3 y 86.3 µg/mL respectivamente. De estos cuatro fueron seleccionados el extracto acetónico y etanólico de *A. lechuguilla* para continuar con los bioensayos de citotoxicidad en células tumorales por ser de los que presentaron mejor actividad sobre *A. salina*. Así mismo dichos extractos son los que presentaron el mayor rendimiento en el proceso de extracción (12 y 7.6 %), siendo esto satisfactorio para la continuidad de nuestro trabajo con el mismo lote de muestra. El extracto hexánico de *A. lechuguilla* aunque presentó mayor actividad que el extracto acetónico, su rendimiento fue más bajo (1.2%).

Para evaluar la actividad antineoplásica de extractos y saponinas de *A. lechuguilla*, utilizamos la técnica para determinar la proliferación celular con el reactivo WST-1. Esta técnica nos permite medir la viabilidad celular frente a diferentes estímulos químicos (citotoxicidad). Se trata de un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a sales de formazan, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la actualidad con éxito en la evaluación de compuestos con actividad citotóxica, debido a que es más sensible, rápida y sencilla cuando la comparamos con otras técnicas de medida de la proliferación celular como son: incorporación de 3H-Timidina o 5'-bromo deoxiuridina (BrdU) en el ADN nuclear

u otras técnicas de citotoxicidad como el MTT, y sus variantes el XTT o el MTS (Roche, 2002; Baek, 2007). Los resultados obtenidos con esta técnica sobre las dos líneas tumorales utilizadas mostraron que, el extracto etanólico de *A. lechuguilla* fue el que presentó mayor toxicidad en la línea celular HeLa con una IC_{50} de 89 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al extracto acetónico que presentó una IC_{50} de 142 $\mu\text{g/mL}$. En células MCF-7 ambos extractos no presentaron una citotoxicidad relevante ($>150 \mu\text{g/mL}$).

Por otro lado, con la finalidad de definir la selectividad de los extractos se realizó la determinación de actividad citotóxica, sobre una línea celular no tumoral. Para este estudio se utilizó la línea celular normal Vero (riñón de mono verde africano), la cual ha sido utilizada como referencia para determinar el índice de selectividad ($IS = IC_{50} \text{ cel normales} / IC_{50} \text{ cel tumorales}$), este parámetro se reporta en varios estudios de nuevos compuestos con actividad antitumoral, donde se ha establecido que si el valor de IS es >1 , indica que la sustancia es más citotóxica para las células tumorales que para las células normales, si es <1 , es más citotóxica para las células normales (Quispe, 2006). Los resultados de actividad citotóxica obtenidos para ambos extractos sobre la línea celular Vero fueron IC_{50} de 126 y 135 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, por lo que los IS de los extractos etanólico y acetónico de *A. lechuguilla* sobre las células HeLa comparados con la línea normal Vero fue de 1.4 y 0.95, por lo que el extracto etanólico es más citotóxico para las células tumorales que para las células normales de los extractos analizados.

Con respecto a los estudios fitoquímicos efectuados por medio de reacciones químicas y CCD a los extractos acetónico, etanólico y hexánico de *A. lechuguilla*, estos sugirieron la presencia de cinco compuestos: saponinas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, alcaloides y esteroides. De estos cinco grupos fitoquímicos presentes en *A.*

lechuguilla, en este trabajo seleccionamos las saponinas para ser aisladas, por ser uno de los compuestos que destacan en esta planta, donde se ha reportado la presencia de 1-2% de saponinas (Hernández *et al*, 2005). Este resultado concuerda con lo obtenido en nuestro estudio (2.2%). Las saponinas obtenidas de un extracto etanólico de la planta *A. lechuguilla* se probaron sobre las dos líneas celulares tumorales y la línea celular normal Vero, utilizadas en la evaluación de los extractos crudos. Del proceso de extracción para saponinas a partir del extracto crudo, se obtuvieron, saponinas crudas y cristalizadas. Al ser evaluadas las saponinas crudas y cristalizadas sobre las células MCF-7 presentaron una $IC_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ y sobre células HeLa, se obtuvieron IC_{50} de 95 y 78.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por lo que se continúa observando una mayor citotoxicidad sobre las células HeLa. Con respecto a los resultados obtenidos sobre las células HeLa y Vero, las saponinas crudas presentaron una IC_{50} de 95 y 71.6 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto con una IS resultante de 0.75, por lo que fueron más tóxicas para las células normales; por otra parte, las saponinas cristalizadas fueron más tóxicas que las crudas con una IC_{50} de 78.8 y 172.2 $\mu\text{g/mL}$ y un IS de 2.20, siendo este último resultado relevante para nuestro estudio, ya que las saponinas cristalizadas aisladas, resultaron ser las más activas de los compuestos probados sobre la línea celular HeLa, donde se presentó la actividad citotóxica.

Se han reportado saponinas en otras especies de esta planta que poseen actividad contra líneas celulares tumorales como es el caso de la saponina (25R)-3 beta,6 alpha-dihydroxy-5 alpha-spirostan-12-one 3,6-di-O-beta-D-glucopyranoside de *A. americana*, esta saponina mostró actividad citotóxica contra la línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60 con una IC_{50} de 4.3 $\mu\text{g/mL}$ (Yokosuka *et al.*, 2000). Otra saponina identificada como chlorogenin 3-O-[alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-->4)-beta-D-

glucopyranosyl-(1-->3)-[beta-D-glucopyranosyl-(1-->3)-beta-D-glucopyranosyl-(1-->2)]-beta-D-glucopyranosyl-(1-->4)-beta-D-galactopyranoside] extraída de *A. fourcroydes* mostró una IC₅₀ entre 7.5-10 µg/mL contra células HeLa (Ohtsuki, 2004). Por otro lado, en otros géneros de plantas de la Familia Liliaceae se han encontrado saponinas con actividad sobre células de leucemia linfocítica de ratón L1210 con IC₅₀ de aproximadamente 5 µM (Candra 2002). También se han logrado sintetizar saponinas con significativa actividad inhibitoria en células tumorales como el análogo de la *p*-MeOC₆H₄CO₂ sobre células HeLa (Peng, 2007).

Al analizarse la saponina cristalizada por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (¹H RMN), de acuerdo a los espectros obtenidos (Apéndice B), encontramos señales del sistema spiroacetal en δ4.62 (C-16) y δ 3.51 (C-26), mismas que ya se han reportado para este tipo de estructuras (Domínguez, 1973). Además las señales de ¹³CRMN: δ 81.2 (C-16), δ114.7 (C-22), δ36.8 (C- 23) y δ74.1 (C-26), las cuales concuerdan con una saponina extraída de *Agave angustifolia* (Madrigal *et al.*, 1992) y con cuatro saponinas de *Smilax medica* con señales δ36.2 (C-5), δ39.8 (C-9) y δ23.6 (C-19) (Sautour, 2005), que corresponden a la fusión cis de los anillos A/B e indican que es una saponina 5 β-esteroidal, una de estas saponinas fue identificada como esmilagenina, compuesto presente en *Agave lechugilla* (Domínguez, 1973), al igual que otras saponinas que se han aislado de la misma planta como: gitogenina, yucagenina, hecogenina, tigogenina, clorogenina, diosgenina, gentrogenina, ruizgenina (Hernández *et al.*, 2005). Con los datos obtenidos y comparando los espectros con los de los autores antes mencionados podemos aseverar que el compuesto aislado es una saponina 5 β-esteroidal.

A pesar de que los resultados de citotoxicidad obtenidos para las saponinas aisladas, no fueron significativos con respecto a los límites recomendados para compuestos con potencial antitumoral ($IC_{50} < 20 \text{ ug/ml}$) (Fang, 2003) no se puede descartar que *A. lechuguilla* posea actividad antineoplásica, ya que se deberán aislar los diferentes compuestos presentes como son: sesquiterpenlactonas, cumarinas, alcaloides y esteroides. Lo anterior basándose en reportes de actividad antineoplásica que existen con este tipo de compuestos como son dos alcaloides tipo benzofenantridina: N-dimetiloxisanguinarina y pancorina; tres alcaloides tipo benzilisoquinoleina: (+)-1,2,3,4-tetrahydro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimetoxifenilmetil-6,7-metilenedioxisoquinoleina ((+)-argenaxina), (+)-higenemina y (+)-reticulina. Además fueron aislados seis compuestos más. Todos los compuestos fueron caracterizados según su espectro y evidencias químicas. Algunos alcaloides aislados fueron evaluados para su toxicidad en líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) y cáncer gástrico humano (NUGC). Celeritina mostro actividad significativa contra la línea celular (NUGC), mientras que Angolina inhibió ambas líneas. (+)-Argenaxina mostro moderada actividad contra (NUGC) (Chang, 2003). Este trabajo contribuye al estudio científico de plantas mexicanas del norte con potencial biológico. La continuidad de este trabajo, se deberá orientar al aislamiento de los compuestos faltantes para determinar su actividad antineoplásica; así como la evaluación de otras líneas celulares tumorales.

9. CONCLUSIONES

- De las cuatro plantas tóxicas evaluadas en nuestro trabajo *A. lechuguilla* fue la que presentó mayor actividad tóxica sobre *A. salina* y sobre la línea celular tumoral HeLa.
- El extracto etanólico de *A. lechuguilla* presentó mayor actividad citotóxica que el acetónico sobre la línea celular tumoral HeLa (IC₅₀ 89 y 142 µg/mL).
- Las saponinas cristalizadas de *A. lechuguilla* presentaron mayor actividad citotóxica que las saponinas crudas y que los extractos crudos sobre las células HeLa (IC₅₀ 78.8, 95, 89 y 142 µg/mL).
- Un resultado relevante en esta investigación es que las saponinas cristalizadas que presentaron una mejor actividad citotóxica sobre la línea celular tumoral HeLa (78.8 µg/mL), son menos tóxicas en la línea celular normal Vero (172.2 µg/mL).
- El compuesto aislado es una saponina 5β-steroidal.

10. RECOMENDACIONES

Las recomendaciones para continuar con esta línea de trabajo son las siguientes:

- Aislar otros compuestos presentes en *A. lechuguilla*.
- Determinar la citotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales.

11. LITERATURA CITADA

- Aguilar CA. y Zolla C. 1982. Plantas Tóxicas de México. IMSS. 271 pp.
- Almeida ATM. Fonseca SA. Brandao M: Mesquita GTS. Fatima ASE: Smania JA: Leomar SC. 2000. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. 95(3): 367-373.
- Arbuck SG. 1995 . Paclitaxel: current developmental approaches of the National Cancer Institute. *Semin Oncol.* 22(15):55-63.
- Bakouboula B. Morel O. Douchet MP. Chauvin M. 2005. Reversible cardiogenic shock under 5-fluorouracil treatment. *Ann Cardiol Angeiol.* 54(4):216-9.
- Baral R, Chattopadhyay U. 2004. Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma. *Int Immunopharmacol.* 4(3):355-66.
- Barón JM, Ordoñez A, García de Paredes ML. 1992. *Oncología Clínica: Fundamentos y Patología General.* Madrid: Interamericana McGraw-Hill, 31-33 pp.
- Barret B. y D. Kieffer. 2001. Medicinal Plants, Science and Health Care. *Journ of Herbs and Med Plants.* 8 (2/3): 1-35.
- Bifulco M. y V. DiMarzo. 2003. The Endocannabinoid System as a Target for the Development of new Drugs for Cancer Therapy. *Recenti Prog Med.* 94(5) :194-198.
- Bourke CA, Stevens GR, Carrigan MJ. 1992. Locomotor effects in sheep of alkaloids identified in Australian *Tribulus terrestris*. *Aust Vet J.* 69(7):163-5.
- Bruneton, J. 1991. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia.* Zaragoza: Acribia, pp.207.
- Buff, V. Lambert, T. Marchal, P. Guérin. 2005. Isolation, culture and characteristics of epididymal epithelial cells from adult cats. *Theriogenology.* 64(7):1603-1618.
- Candra E., K. Matsunaga y H Fujiwara. 2002. Potent Apoptotic effects of Saponins from Liliaceae Plants in L1210 Cells. 2 (54):257-262.
- Castellon E, Clementi M, Hitschfeld C, Sanchez C, Benitez D, Saenz L, Contreras H, Huidobro C. 2006 . Effect of leuprolide and cetorelix on cell growth, apoptosis,

- and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma. *Cancer Invest.* 24(3):261-8.
- Chang FR, Wu YC. 2001. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *J Nat Prod.* 64(7):925-31.
- Chang Y.C. y F.R. Chang. 2003. Citotoxic benzophenanthridine and benzyloisoquinoline alkalo from *Argemone mexicana*. *Z Naturforsch.* 58(7-8):521-526.
- Contassot E, Tenan M, Schnuriger V, Pelte MF, Dietrich PY. 2004 . Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecol Oncol.* 93(1):182-8.
- Chhipa RR, Singh S, Surve SV, Vijayakumar MV, Bhat MK. 2005. Doxycycline potentiates antitumor effect of cyclophosphamide in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.*202(3):268-77.
- Denis, J.N., Greene, A.E., Guenard, D., Gueritte-Voeguelein F., Mangatal L., Potier, P. 1988. A highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Amer. Chem. Soc.* 110: 5917-5919.
- Domínguez X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. LIMUSA. 281 pp.
- Duan P. y Z. M. Wang. 2002. Clinical Study on Effect of *Astragalus* in Efficacy enhancing a Toxicity Reducing of Chemoterapy in Patients of Malignant tumor. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 22 (7): 515-517.
- Evans, S. R., Hofman, A. 1982. Plantas de los Dioses. Fondo de Cultura Económica, México. 192 pp.
- Figuroa J, Blanco C, Dumpierrez AG, Almeida L, Ortega N, Castillo R, Navarro L, Perez E, Gallego MD, Carrillo T. 2005. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. *Allergy.*60(1):48-55.
- Fang L, Chai H B, Castillo J J, Soejarto D D, Fransworth N R, Cordel G A, Pezuto J M y Kinghorn D. 2003. Citotoxic Constituents of *Brachistus stramonifolius*. *Phytotherapy Research.* (17) 520-523.
- Freshney R. Ian. 2000. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Fourth Edition. USA. Wiley-Lyss. 577 pp.
- Galindo V. R. Waksman N. 2001. Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*. *Nat Prod Lett.*15(4):243-51.

- Garcia A J., S J. Verde y Heredia L N. 2001. Traditional Uses and Scientific Knowledge of Medicinal Plants from Mexico and Central America. *Journ of Herbs and Med Plants*. 8 (2/3): 37-89.
- González Fernández José Antonio. 1999. Acuerdo por el que se determinan las plantas prohibidas o permitidas para tés, infusiones y aceites vegetales comestibles. Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial de la Federación*. Secretaría de Salud.
- González Stuart Armando. 1989. *Plantas Tóxicas para el Ganado*. Editorial Limusa-Noriega. México. 167pp.
- Goodsell DS. 2005. The molecular perspective: L-asparaginase. *Oncologist*. 10(3):238-9.
- Gutiérrez Casillas, M. 1981. *Las artesanías populares de madera en México*. SARH. México, D. F. 272. pp.
- Haeba MH, Mohamed AI, Mehdi AW, Nair GA. 2002 . Toxicity of *Nerium oleander* leaf extract in mice. *J Environ Biol*. 23(3):231-7.
- Haupt S. Berger M. Goldberg Z. Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 116(20):4077-85.
- Hellman S, Vokes E. 1996. Advancing Current Treatments for Cancer. *American Scientific*. 275 (3): 118-123.
- Hernández R. S. Lugo E. C. Díaz L. Villanueva S. 2005. Extracción y Cuantificación Indirecta de las Saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *Revista Digital Científica e-Gnosis*. Año/vol. 3. Universidad de Guadalajara. Mexico. ISSN (versión en línea): 1665-5745. [Internet]. Disponible en el sitio de red: www.e-gnosis.udg.mx.
- Hoffman E J. 1999. *Cancer and the Search for Selective Biochemicals Inhibitors*. CRS Press. 560pp.
- Holbrook KA. Hennings H. 1983. Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. *J invest Dermatol*. 81(1):11-24
- Homesley HD, Blessing JA, Sorosky J, Reid G, Look KY. 2005. Phase II trial of liposomal doxorubicin at 40 mg/m² every 4 weeks in endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*. 98(2):294-8.
- Hosny M, Rosazza JP. 2002. New isoflavone and triterpene glycosides from soybeans. *J Nat Prod*. 65(6):805-13.

- Hsu JT, Lin CY, Wu TJ, Chen HM, Hwang TL, Jan YY. 2005. Splenic angiosarcoma metastasis to small bowel presented with gastrointestinal bleeding. *World Journal of Gastroenterology*. 11(41):6560-2.
- Ikeda K, Pant B, Mishiro A, Ozawa K, Masujima T, Sugiyama M. 2000. A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *J Biosci Bioeng*. 90(5):574-6.
- INEGI. 2007. Estadísticas a Propósito del Día Mundial contra el Cáncer. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/ espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>
- Isefuku S, Seki M, Tajino T, Hakozaiki M, Asano S, Hojo H, Hatori M. 2006. Ewing's Sarcoma in the Spinal Nerve Root. *Tohoku J Exp Med*. 209(4):369-77.
- Itokawa H., Z. S. Qiao y C. Hirobe. 1995. Cytotoxic Limonoids and Tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. *Chem Pharm Bull*.43(7):1171-1175.
- Jakszin P. Gonzalez CA. 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 12(27):4296-4303.
- Jo KJ, Cha MR, Lee MR, Yoon MY, Park HR. 2008. Methanolic Extracts of *Uncaria rhynchophylla* Induce Cytotoxicity and Apoptosis in HT-29 Human Colon Carcinoma Cells. *Plant Foods Hum Nutr*. 63(2):77-82.
- Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Ek B, Thunberg E, Samuelsson G, Larsson R, Bohlin L, Claesson P. Small. 2003. Novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cell Mol Life Sci*.;60(1):165-75.1175.
- Khan B. A., A. Abraham y S. Leelama. 1996. *Murraya Koenigii* and *Brassica juncea* alterations on lipid in 1-2 dimethyl Hydrazine Iduced Colon Carcinogenesis. 14(4):365-369.
- Kimura Y. y H. Okuda. 2000. Effects of Naturally Occurring Stilbene Glucosides From Medicinal Plants and wine on Tumor Growth and Lung Metastasis in Lewis Lung Carcinoma Bearing Mice. 2 (52): 1287-1295.
- Kingston, D.G.I. 1991. The chemistry of taxol. *Pharmacol.Ther*.52:1-34.
- Kuroda M, Yokosuka A, Kobayashi R, Jitsuno M, Kando H, Nosaka K, Ishii H, Yamori T, Mimaki Y. 2007. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of

- Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2007 Aug;55(8):1240-4.
- Lanvers-Kaminsky C, Winter B, Kolling S, Frodermann B, Braun Y, Schaefer KL, Diallo R, Koenemann S, Wai D, Willich N, Poremba C, Schuck A. 2005. Doxorubicin modulates telomerase activity in Ewing's sarcoma in vitro and in vivo. Oncol Rep. ;14(3):751-8.
- Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D. 2005. Causality in cancer epidemiology. Eur J Epidemiol.20(7):565-74.
- Leonard S. Capote R. Germonprez N. Puyvelde L. 2003. Cromatografic Method for Analysis of Saponins in *Maesa balansae* Extract Active against Leishmaniasis. J. Chromatogr. A. 1012- 3946.
- Lozoya, X. 1999. Xihuahpatli. Herba officinalis. Secretaría de Salud. UNAM. México, D. F. 159 pp.
- McLaughlin JL, Chang Ch. y Smith DL. 1988. Simple Bioassays for the Detecction and Isolation of Bioactive Natural Products. Departament of Chemistryand Pharmacognody, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Pardue University, West Lafayette, IN 47907.USA.
- McLaughlin JL, Chang Ch. y Smith DL. 1993. Simple bench-top bioassays (Brine Shrimp and Potato Disc) for the discovery of plant antitumor compounds. Human Medicinal Agents from Plants. Editado por: A. D. Kinghorn y M. F. Balandrin en [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=/1994/v2019/US9433472.xml;US9433472>. Agris, 2006.
- Maldonado ALJ, Garcia DGJ. 1993. Manejo de Plantas Tóxicas em el Estado de Nuevo Leon, México. SARH. 86 pp.
- Martínez M. 1990. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México, D. F. 656 pp.
- Meng XL, Riordan NH, Casciari JJ, Zhu Y, Zhong J, Gonzalez MJ, Miranda-Massari Riordan HD. 2002. Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. Health Sci J. 21(4):323-8. Meyer BN. Ferrigni NR. Puttnam JE. Jacobsen LB. Nichols DE. Mc Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica. 45:31-34
- Mittal R, Mottl H, Nemeč J. 2005. Acute transient cerebral toxicity associated with administration of high-dose methotrexate. Med Princ Pract.;14(3):202-4.
- Mohar A. M. Frias B. L. Suchil M. T. Mora y J. G. De la Garza.1997. Epidemiología

- Descriptiva del Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. Salud Pública de México.39 (4): 1-6.
- Moujir L, Seca AM, Silva AM, López MR, Padilla N, Cavaleiro JA, Neto CP. 2007. Cytotoxic activity of lignans from *Hibiscus cannabinus*. Fitoterapia. Jul;78(5):385-7.
- Mujoo K. y B. Haridas. 2001. Triterpenoid Saponins from *Acacia victoreae* Decrease Tumor Cell Proliferation and Induce Apoptosis. Cancer Res. 61(14):486-490.
- Nicolau, K.C., Dai, W. M. and Guy. R.K. 1994. Chemistry and biology of taxol Angew. Chem. Int. Ed. Engl.33:15-44.
- Niembro Rocas, A. 1986. Árboles y arbustos útiles de México. Limusa. México, D. F. 206 pp.
- Orestes G. L. 2007. Las Saponinas y Sapogeninas Esteroidales. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.monografias.com/trabajos55/saponinas-sapogeninas/saponinas-sapogeninas2.shtml>.
- Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T, Sakai S, Kawahara N, Goda Y, Yamaguchi N, Ishibashi M. 2004. New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. Bioorg Med Chem. 15:12(14):3841-5
- Pamplona R. J. D. 2000. Plantas Medicinales. Biblioteca Educación Salud. Tomo 1. 397 pp.
- Pathak S, Multani AS, Narayan S, Kumar V, Newman RA. 2000. Anvirzel, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. Anticancer Drugs. Jul;11(6):455-63.
- Pemberton IJ, Smith GR, Forbes TD, Hensarling CM. 1993. An improved method for extraction and quantification of toxic phenethylamines from *Acacia berlandieri*. J Anim Sci. 71(2):467-70.
- Pérez JM, Bilandia B, Carretero MV. 1990. Papel biológico de la fosforilación proteica en el control del crecimiento de células normales y transformadas por el virus sarcoma de Rous: II Simposio sobre oncogenes: bases moleculares del cáncer, aplicaciones clínicas y desarrollo tecnológico. Madrid: Instituto de Investigaciones Biomédicas. 100-7.
- Popoca J, Aguilar A, D. Alonso y Villarreal M.L. 1998. Citotoxic Activity of Selected

- Plants Used as Antitumorals in Mexican Traditional Medicine.J
Ethnopharmacol. 59(3):173-177.
- Pettit GR., Herald CL. y Judd GF.1978. Antineoplastic Agents. 52. *Baileya multiradiata*. Lloydia. 41(1):29-36.
- Pineyro-Lopez A, Martinez de Villarreal L, Gonzalez-Alanis R. 1994. In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. Toxicology. 92(1- 3):217-27.
- Roche. 2002. Versión 6. Catálogo No. 1644807.
- Roja G. y Rao P. S. 2000. Anticancer Compounds from Tissue Cultures of Medicinal Plants. 7 (2):71-101.
- Rotinberg P. y S. Kelemen. 2000. Preclinical Qualitative Evaluation Antitumoral Pharmacodinamic Action of Some Natural Polyphenolic Biopreparations. Rom J. Physiol. 37(1-4):91-103.
- Sánchez, S. O. La flora del Valle de México. 1980. Ed. Herrero. México. D.F. 519 pags.-Schilcher H. 1994. Phytotherapy and Classical Medicine. Journ of Herbs and Med Plants. 2(3): 71-81.
- Santos E, Rodríguez J. 1985. Técnicas e investigación en oncología. El Cáncer. Barcelona: Prensa Científica, 58-61pp.
- Sasaki T y Yamasaki K. 2002. Inhibition of Proliferation and Induction of Differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. Br J Cancer. 87(8):918-923.
- Schilcher H. 1994. Phytotherapy and Classical Medicine. Journ of Herbs and Med Plants. 2(3): 71-81.
- Shi Y, Wang CH, Gong XG. 2008. Apoptosis-Inducing Effects of Two Anthraquinones from *Hedyotis diffusa* WILLD. Biol Pharm Bull. 31(6):1075-1078.
- Silva M. Eguiarte L. 2003. Geographic Patterns the Reproductive Ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahua Desert. Am. J. Bot. 90(3): 377-387.
- Singh B. Bath T. K. 2003. Potencial Terapeutico Applications of some antinutritional Plant Secondary Metabolites. J. Agric Food Chem. 51 (19): 5579-5597.
- Son YO, Kim J, Lim JC, Chung Y, Chung GH, Lee JC. 2003. Ripe fruit of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. Food 41(10):1421-8.
- Sun B, Qu WJ, Zhang XL, Yang HJ, Zhuang XY, Zhang P. 2004. Investigation on

- inhibitory and apoptosis-inducing effects of saponins from *Tribulus terrestris* on hepatoma cell line BEL-7402. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. Jul;29(7):681-4.
- Syu WJ, Shen CC, Lu JJ, Lee GH, Sun CM. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activities of neolignans from *Magnolia officinalis*. *Chem Biodivers*. 1(3):530-7.
- SSA. 2000. CC-RHNM-01 Morbilidad / Mortalidad. Dirección General de epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm01.htm#informacion>.
- SSA. 2001. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. México. 171pp.
- Wagner H. Blatt S. Zgainski E. M. 1983. Springer – Verlag. Berlin. Pp 320.
- Tian Z. Liu Y M. 2006. Citotoxicity of two triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *Molecules*. 11(9): 693:9.
- Tot T. 2006. The limited prognostic value of measuring and grading small invasive breast carcinomas: The whole sick lobe versus the details within it. *Med Sci Monit*. 12(8): 170-175.
- Van Slambrouck S, Daniels AL, Hooten CJ, Brock SL, Jenkins AR, Ogasawara MA, Baker JM, Adkins G, Elias EM, Agustin VJ, Constantine SR, Pullin MJ, Shors ST, Kornienko A, Steelant WF. 2007. Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. *Oncol Rep*. 17(6):1487-92.
- Whelan LC y Ryan MF. 2003. Ethanolic Extracts of *Euphorbia* and other Ethnobotanical Species as Inhibitors of Human Tumour Cell Growth. *Phytomedicine*. 10(1):53-58.
- Yang QX, Yang CR. 2006. Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum punctatum*. *Chem Biodivers*. Dec;3(12):1349-55.
- Yokosuka A, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y. . 2000. A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*. *Planta Med*. 66(4):393-6.
- Yuan D. Zuo R.. 2007. Effects of Total saponins of *Panax japonicas* on Human Leukemic HL-60. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 5(5):570-2.
- Zigman A, Shen I. 2006. Clear cell sarcoma of the kidney with cavo-atrial tumor thrombus: complete resection in a child. *J Pediatr Surg*. (8):1464-6.

- Zhao WM, Qin GW, Lou LG. 1999. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. *J Asian Nat Prod Res.* 1999;1(4):307-11.
- Zhang R, Duan HQ, Yao Z, Pan Q, Zhang FG. 2006. Studies on diterpenes in needles of *Pinus sylvestris*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* Dec;31(23):1956-9.
- Zhou H, Hamazaki A, Fontana JD, Takahashi H, Esumi T, Wandscheer CB, Tsujimoto H, Fukuyama Y. New ring C-seco limonoids from Brazilian *Melia azedarach* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod.* 2004 Sep;67(9):1544-7.

12. APENDICES

Apéndice A

PRUEBAS QUÍMICAS

Sesquiterpenlactonas. Para la identificación de sesquiterpenlactonas se utiliza la prueba de Baljet. Para preparar el reactivo se utilizan dos soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A: ácido pícrico 1% en alcohol etílico. Solución B: Hidroxido de sodio 10%. La prueba es positiva si se observa una coloración anaranjada o roja oscura.

Saponinas. Para la identificación de saponinas se utiliza la prueba de Lieberman-Burchard. El reactivo se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico, un mL de ácido acético anhidro y un mL de cloroformo. La aparición de un color azul-verde determinan la presencia de esteroides y colores rosado, rojo y violeta triterpenos.

La prueba de hemolisis también es utilizada para determinar la presencia de saponinas. A una suspensión de eritrocitos se le añade la muestra que se presume contiene saponinas. La prueba se considera positiva si se observa la hemolisis de los eritrocitos.

Alcaloides. Se realiza la prueba de Dragendorff. El reactivo se prepara con dos soluciones: La solución A consiste en disolver 0.85g de nitrato de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. La solución B se disuelven 8 g de ioduro de

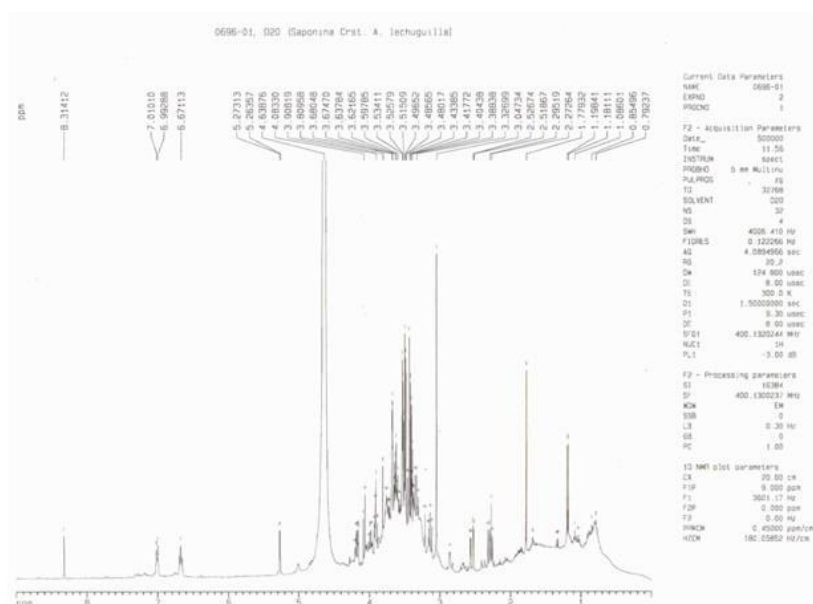
potasio en 20 mL de agua. Se mezclan 5mL de solución A, 4 mL de solución B y 100 mL de agua. La presencia de un color rojo-anaranjado indica que la prueba es positiva.

Esteroides y triterpenos. Se utiliza la prueba de Salkowski. El reactivo se prepara disolviendo en 0.5 mL de la muestra, \leq 0.5 mL de cloroformo y un mL de ácido sulfúrico; observándose un color amarillo o rojo si la prueba es positiva.

Cumarinas. Para la detección de cumarinas se utiliza la prueba del hidróxido de sodio. La muestra se hace reaccionar con hidróxido de sodio 10%. Si se observa una coloración amarilla- anaranjada que desaparece al acidular, con ácido clorhídrico, la prueba es positiva.

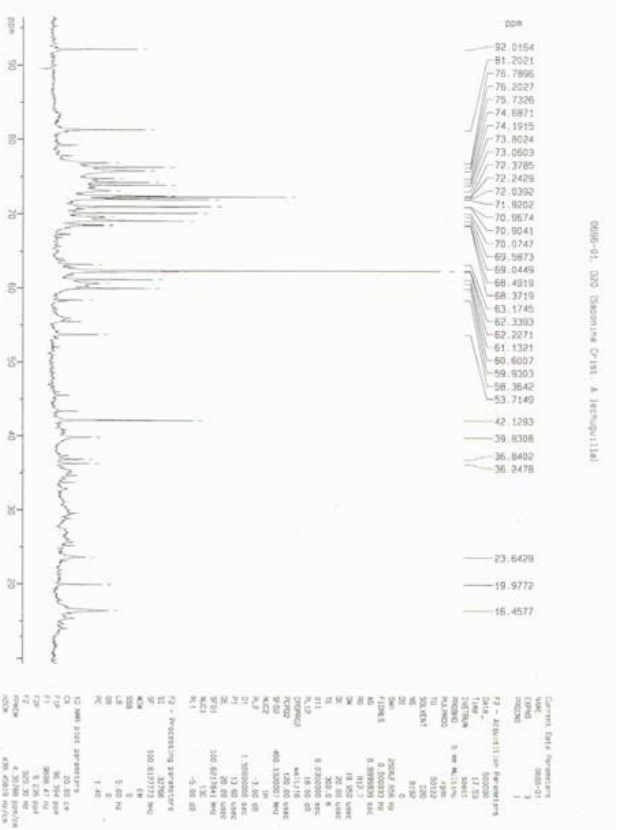
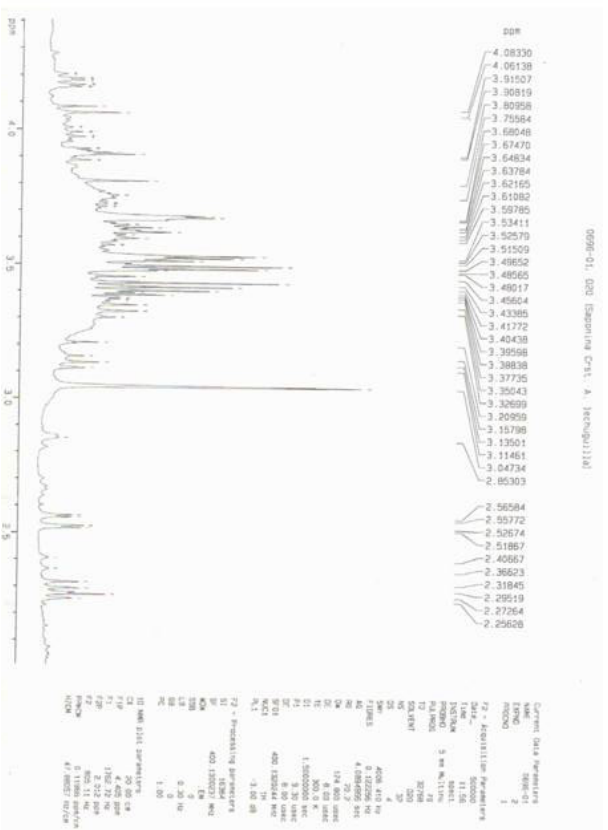
Apéndice B

ESPECTROS DE LA SAPONINA CRISTALIZADA OBTENIDOS POR ^1H RMN Y ^{13}C RMN



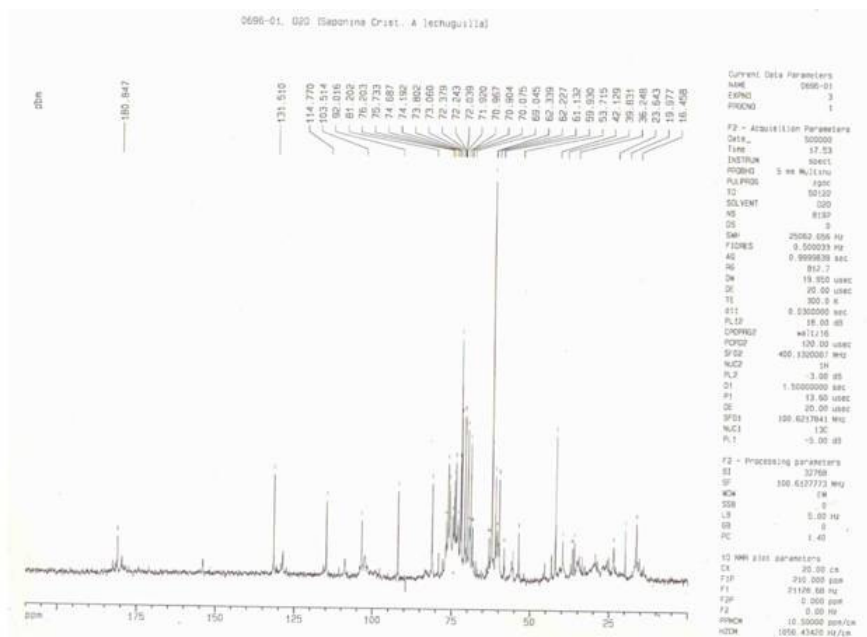
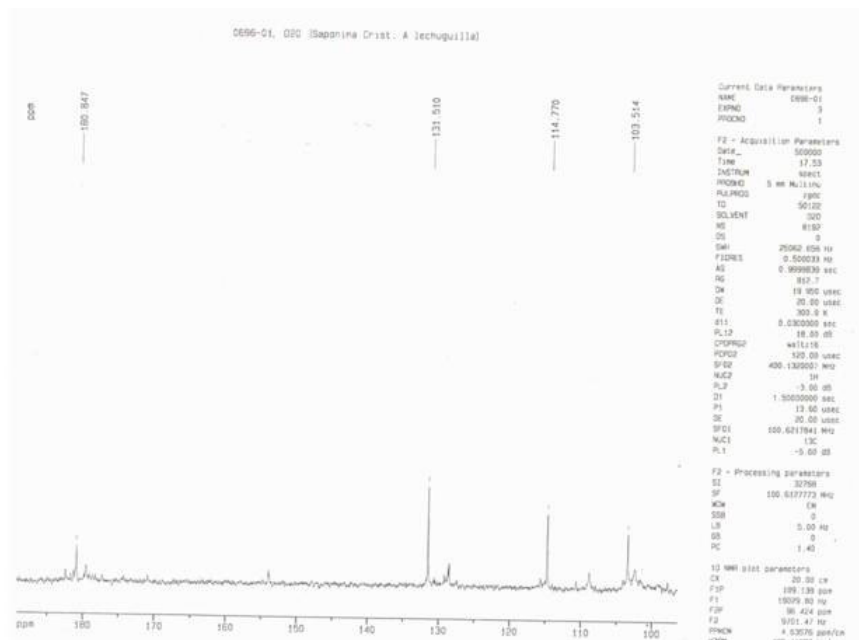
0696-01, D 20 (Saponina Cristalizada de *A. lechuguilla*)

Apéndice B (continuación)



0696-01, D 20 (Saponina Cristalizada de A. lechuguilla)

Apéndice B (continuación)



0696-01, D 20 (Saponina Cristalizada de *A. lechuguilla*)

Apéndice C

ESTRUCTURA DE SAPONINAS ESTEROIDALES

Las saponinas son glicósidos (fig. 1) en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente.

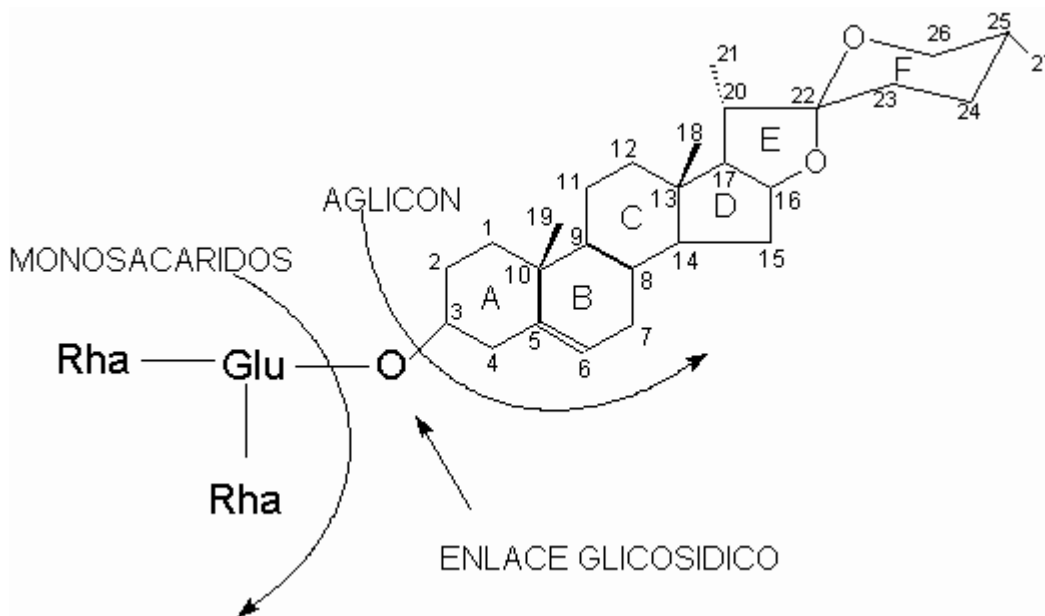


Fig.1 Ejemplo de saponina esterooidal

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado.

La característica estructural fundamental de estas sapogeninas radica es la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del C-17 del esqueleto base y están contenidos respectivamente en dos planos perpendiculares entre sí.

Además, el átomo de carbono común a estos dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura de un cetal) por los que a esta "cadena" lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica . Las sapogeninas pueden clasificarse de acuerdo a la estructura de los anillos E y F en espirostanos, furostanos y furoespirostanos fundamentalmente, siendo el primer grupo el más importante (fig. 2). Estos compuestos pueden presentar unión trans (serie 5α) o cis (serie 5β) entre los anillos A y B, además todos presentan grupos metilos en C-10 y C-13 dirigidos hacia la cara β de la molécula. En el caso de que las sapogeninas posean una insaturación entre C-5 y C-6 se clasifican como Δ^5 espirostanos.

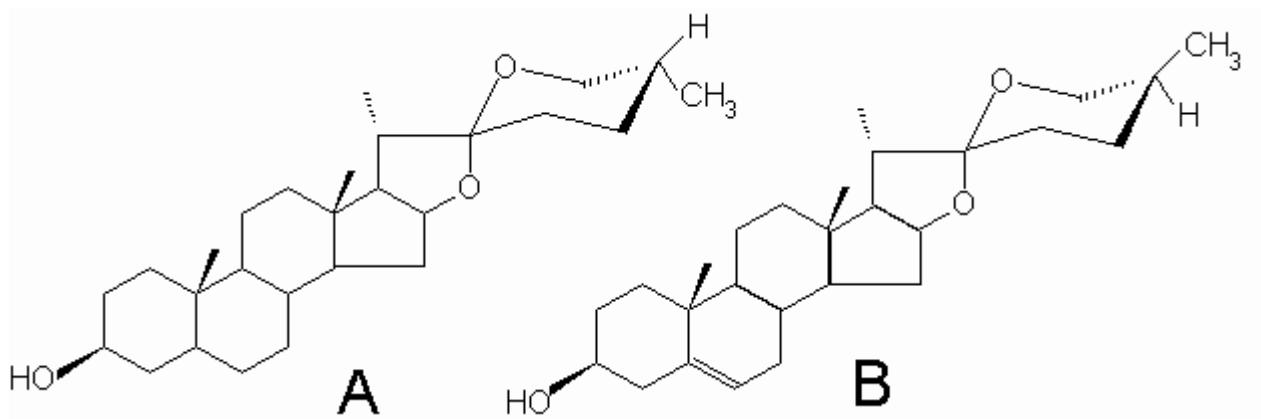


Fig. 2. Ejemplos de espirostanos.

A) 3β -hidroxi- 5α , 25R-espirostanos.

B) 3β -hidroxi-25S-espirost-5-eno.

Adicionalmente a otros esteroides las sapogeninas presentan centros quirales en C-22 y C-25, determinando este último dos series para la clasificación de estos compuestos, la serie "*iso*" (configuración 25 R) y la serie "*neo*" (configuración 25 S).

Las saponinas esteroidales poseen de una a seis unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos. Estas unidades son comúnmente hexosas, pentosas y deoxihexosas, entre los que se encuentran principalmente glucosa, rhamnosa, galactosa y xilosa. Los enlaces glicosídicos pueden tener configuración α o β . Este resto glicosídico, que puede ser lineal o ramificado en la mayoría de los casos se une con el aglicón a través del C-3 del mismo (Orestes,2007).

Apéndice D

PLANTAS TOXICAS LOCALIZADAS EN NUEVO LEÓN

Plantas tóxicas localizadas en Nuevo León

Nombre Científico	Nombre Común	Familia	Toxicidad
<i>Acacia berlandieri</i>	Huajillo	Leguminosae	Hojas y Frutos. La N-metil-beta-feniletilamina es responsable de la ataxia y postración, a veces muerte del ganado. Mecanismo semejante al de la Efedrina.
<i>Acacia gregii</i>	Uña de Gato	Leguminosae	Hojas. En animales intoxicados se presenta midriasis, polipnea, convulsiones y muerte. Sintomatología semejante al de las intoxicaciones con ácido cianhídrico.
<i>Agave lechuguilla</i>	Lechuguilla	Agavacea	Hojas. Una saponina (Hepatonefrotoxina) y un fotosensibilizador de la piel.
<i>Allium Canadense</i>	Cebollín	Liliaceae	Toda la planta. Un alcaloide no determinado produce anemia, hematuria, gastro-enteritis y muerte.
<i>Anagallis arvensis</i>	Coralillo	Primulaceae	Toda la planta. Compuestos tóxicos como: Heterósido triterpenico, anagallósido (antifúngico), flavonoides y cucurbitacinas. Efectos tóxicos mortales en las ovejas y síntomas como diarrea, anorexia y depresión; lesiones que incluyen hemorragia en riñón y corazón, congestión de pulmones y daños en el hígado.
<i>Argemone mexicana</i>	Cardo Santo	Papaveraceae	Toda la planta. Alcaloides: berberina. Congestión pulmonar y lesiones en riñones de conejos de laboratorio y protopina (acción narcótica). Estos alcaloides son eliminados por animales a través de la leche. La semilla contiene alcaloides de isoquinolina: sanguinarina y dihidrosanguinarina que poseen efecto irritativo en zonas cutáneas y mucosas.
<i>Asclepias latifolia</i>	Hierba Lechosa	Asclepiadaceae	Hojas y tallos jóvenes. La galitoxina es la sustancia toxica dominante en el látex, en menor cantidad glucósidos cardiacos y alcaloides venenosos. Los animales muestran problemas motores y respiratorios y sobreviene la muerte.
<i>Astragalus wootoni</i>	Hierba loca	Leguminosae	Toda la planta. Presencia de ácido cianhídrico y otras sustancia tóxicas. Alcaloides y saponinas presentes que actúan emulsionando las grasas y hemolizando los glóbulos rojos por su afinidad con la colestina y la lecitina.
<i>Brassica nigra</i>	Mostaza	Cruciferae	Semilla. Glucósido: la sinigrina. Irritante para la piel y las mucosas. Aborto.

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Nombre Científico	Nombre Común	Familia	Toxicidad
<i>Centaurium calycosum</i>	Centauro	Gentianaceae	Toda la planta. Época de floración concentra glucósidos amargos (gentiopicrina). En grandes cantidades provoca diarreas abundantes y acuosas, poliuria, debilidad generalizada y en ocasiones, coma y muerte.
<i>Cephalanthus occidentalis</i>	Mimbre	Rubiaceae	Toda la planta. Poco estudiada. Cefalantina, sustancia que destruye los glóbulos rojos, causa vómitos, convulsiones y parálisis de las extremidades.
<i>Citrus aurantium</i>	Naranja Agrio	Rutaceae	Frutos y flores. Contienen tres glucósidos: Hesperidina, Isohesperidina y aurantiumarina sedativas del sistema nervioso central.
<i>Clematis dioica</i>	Barbas de chivato	Ranunculaceae	Hojas. Protoanemonina, saponinas Hederagenina, derivados del ácido Oleanólico, anemonol. Se utilizan en pequeñas dosis para úlceras varicosas, dolores reumáticos.
<i>Convolvulus arvensis</i>	Correhuela	Convolvulaceae	Hojas tiernas y brotes. Venenosa para el ganado. Se carece de información confiable.
<i>Croton ciliato</i>	Canelillo	Euphorbiaceae	Frutos maduros y secos. Glucósidos y resinas. 0.5-1 gota causa quemaduras en sistema digestivo.
<i>Cuscuta sp.</i>	Tripa de Judas	Convolvulaceae	Toda la planta. Glucósido cuscutina, resina, taninos, flavona no caracterizada (Tallos y flores).
<i>Chenopodium album</i>	Hedionda	Quenopodiaceae	Toda la planta. Glucósidos cianógenicos. Ascaridol (altas concentraciones producen severas lesiones hepáticas y renales).
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Epazote	Quenopodiaceae	Toda la planta. Ascaridol.
<i>Drymaria arenarioides</i>	Alfombrilla	Cariofilaceae	Hojas y Tallos. Saponinas, ácido oxálico, alcaloides (Tebaína, Narcotina, narceína, solanina y ergotoxina).
<i>Euphorbia maculata</i>	Hierba de la Golondrina	Euphorbiaceae	Toda la planta. Gomo-resina (Euforbona).
<i>Fluorenszia cernua</i>	Hoja Sen	Compositae	Frutos secos. Glucósidos y una resina no caracterizada.
<i>Gutierrezia sarothrae</i>	Hierba de San Nicolás	Compositae	Hojas. Saponinas
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	Graminaceae	Toda la planta. Los embriones de cebada elaboran un alcaloide (hordenina).

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Nombre Científico	Nombre Común	Familia	Toxicidad
<i>Karwinskia humboldtiana</i>	Coyotilo Tullidora	Rhamnaceae	Antrocenona. Parálisis de los cuartos traseros y muerte con semillas y Frutos. Debilidad nauseas y decaimiento con Hojas.
<i>Ligustrum japonicum</i>	Trueno	Oleaceae	Hojas y frutos. Glucósido (ligustrina), taninos.
<i>Lobelia berlandieri</i>	Diente de víbora	Lobeliaceae	Toda la planta. Alcaloide: lobelina de acción simpático- mimética, antiespasmódica y dilatadora del tejido bronquial. La intoxicación causa frecuencia respiratoria disminuida, atrofia de los músculos, coma prolongado y muerte.
<i>Lophophora williamsii</i>	Peyote	Cactaceae	Toda la planta. Alcaloides tipo estricnina que incrementan la irritabilidad refleja hasta llegar al espasmo y los de tipo morfina que tienen acción sedante y somnífera.
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Leguminosae	Toda la planta. Grandes cantidades provoca trifoliosis con inflamación de la boca e irritación de la piel.
<i>Melia azedarach</i>	Canelo	Meliaceae	Toda la planta. Alcaloide azedarina (Sistema nervioso central) y paraisina (repelente de insectos) , saponinas hemolizantes y taninos, aceites esenciales y resinas.
<i>Melilotis officinalis</i>	Trébol oloroso	Leguminosae	Toda la planta. Dicumarina o dicumarol, anticoagulante. Acidos melilótico y cumárico.
<i>Melochia pyramidata</i>	Chichibe	Esterculiaceae	Alcaloides. Extracto clorofórmico se observó que ratones presentaban incoordinación del tren posterior, postración y muerte.
<i>Nerium oleander</i>	Laurel	Apocinaceae	Glicosido. Arritmia cardiaca, diarrea, muerte.
<i>Nicotiana glauca</i>	Tabaco	Solanaceae	Alcaloides: narcotina, colchicina, lobelina, nicotina, anabasina,etc. La anabasina se encuentra en mayor proporción y al parecer es el responsable de envenenamiento.
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Solanaceae	Hojas. Nicotina.
<i>Nolina texana</i>	Sacahuiste	Liliaceae	Botones, flores y frutos .filoeritrina y una hepatonefrotoxina, toxicidad similar a la de <i>A. lechuguilla</i> .

TABLA I (CONTINUACIÓN)

Nombre Científico	Nombre Común	Familia	Toxicidad
<i>Phoradendron tomentosum</i>	Injerto del Mesquite	Lorantaceae	Bayas. Fenoles sumamente tóxicos.
<i>Prunus serotina</i>	Capuli	Rosaceae	Toda la planta. Glucósido cianógeno (amigdalina). Dificultades para respirar, espasmos, coma y muerte repentina.
<i>Quercus spp.</i>	Encino	Fagaceae	Hojas y bellotas. Ácido tánico y otros principios tóxicos no determinados.
<i>Rhus radicans</i>	Hiedra	Anacardiaceae	Látex de tallos, ramas y hojas. 3-n-pentadecil-catecol reacciona rápidamente con las proteínas de la piel y mucosas.
<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora	Solanaceae	Glicósido:solanina. Perdida de sensación, meteorismo, diarrea,dilatación de pupilas.
<i>Tribulus terrestris</i>	Torito	Zygophyllaceae	Semilla.nitratos. Fotosensibilización.