



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad citotóxica de *Aristolochia
grandiflora*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DULCE YEHIMI LÓPEZ MIRANDA



DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“No se puede entender la naturaleza de las partes del cuerpo sin entender la naturaleza del organismo entero. Los síntomas son defensas naturales del cuerpo. Nosotros los llamamos enfermedades, pero en realidad son la curación de la enfermedad....Lo que cura a uno, mata a otro.”

Hipócrates

“Nosotros pertenecemos a la tierra y que la tierra no pertenece a nosotros, reconocemos que somos parte de la naturaleza y que sólo somos un hilo más de la naturaleza, somos un hilo más en esta trama de la vida porque nos integramos con todos los elementos del universo mediante el amor y la paz entre todos nuestros hermanos. “ Temazcalero otomí, 2001

Agradecimientos

Le agradezco a la UNAM y en especial a la Facultad de Ciencias que me permitió desarrollar mis estudios en la carrera de Biología, a la Facultad de Química que me apoyo a desarrollar esta tesis.

Doy gracias a la Doctora Ofelia Espejo González que me permitió trabajar en el laboratorio E 121 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química y por todo el apoyo y comprensión durante el desarrollo de esta tesis. De igual forma agradezco al M.C. José Dolores Solano Becerra que me permitió el desarrollo de la parte biológica, sus comentarios, orientación y críticas objetivas que fueron importantes para esta tesis y para mi vida profesional.

Agradezco a los compañeros del laboratorio E 121 del departamento de farmacia por su comprensión, paciencia y apoyo en especial al Dr. Adolfo Lira Rocha y al Químico José Luis Esquivel Hernández.

A la Doctora Josefina Herrera Santoyo, por sus comentarios acertados de esta tesis, su comprensión y objetividad.

A la M.C. Rosa María Fonseca Juárez que me ha orientado durante todos estos años en la carrera y aceptó ser mi sinodal.

Al Doctor Adolfo Andrade Cetto por todos los comentarios y correcciones de esta tesis.

Al Doctor Guillermo Laguna Hernández y a todo el laboratorio de Fisiología Vegetal.

Al M.C. Armando Gómez Campos, que me oriento en la selección de la planta.

Dedicatorias

Esta tesis se la dedico a mi familia. A mis padres Sebastián López Ruiz y María Dolores Miranda Pabello[†], que me dieron la vida y la oportunidad de terminar mis estudios, además de todos los valores infundados, su dedicación, regaños, consejos y ejemplo de vida que me han dado.

A mi hermano Alejandro Yahir López Miranda, por ser mi compañero y amigo durante toda la vida y a mis primos Alfaro Miranda que me han hecho más amena la vida. A mis abuelos María Luisa Pabello[†] y Ceferino Miranda[†].

A mis amigas que me han apoyado y escuchado durante tanto tiempo Merari Mora C., Sandra Esteves R. que se han convertido parte de mi familia. A mis amigos de carrera María Teresa Flores, Guadalupe Guzmán, Nidia Mendoza, Rosa María Mejía, Mayra Castillo, Emanuel Martínez, Teresa Meléndez, Sandra Albor y a mis amigos: Prof. Juan Carlos Álvarez, Jessie Pontigo, Orson Álvarez, Cecilia Mercado y Sofía Hernández.

Abreviaturas

≠	Diferente significativamente
°C	Grados Celsius
µg	Micro gramo
µL	Micro litro
µM	Micro Molar
AA	Ácido Aristolóquico
AcOEt	Acetato de etilo
AKT	Oncogén aislado de tumores producidos por el retrovirus murino AKT8 su producto es la proteína cinasa B (PKB)
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection (por sus siglas en inglés)
CAS	Chemical Abstract Service, (por sus siglas en inglés)
CCF	Cromatografía en capa fina
CDC2	Fosfoproteína tipo 2, relacionada con el ciclo celular (Cell Division Cycle)
CDK	Cinasa dependiente de ciclina (Cyclin Dependent Kinasa)
CHCl ₃	Cloroformo
CL ₅₀	Concentración Letal 50
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
DL ₅₀	Dosis Letal 50
D-MEM	Medio Eagle modificado Dubelcco
DMSO	Dimetil sufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Este
<i>E/Z</i>	<i>E</i> = entgegen, si los dos grupos de mayor prioridad están en lados opuestos al doble enlace. <i>Z</i> = zusammen, si los dos grupos de mayor prioridad están en el mismo lado del doble enlace.

ENCB	Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional
Exp1-ExtAcOEt	Experimento 1, Extracto de acetato de etilo
Exp1-ExtCHCl ₃	Experimento 1, Extracto de cloroformo
Exp1-ExtHex	Experimento 1, Extracto hexánico
Exp1-FA1	Experimento 1, Fase acuosa 1
Exp1-FA2	Experimento 1, Fase acuosa 2
Exp1-FOAcOEt	Experimento 1, Fase orgánica de acetato de etilo
Exp2-ExtAcOEt-lavado	Experimento 2, Extracto de acetato de etilo lavado
Exp2-ExtCHCl ₃ -lavado	Experimento 2, Extracto de cloroformo lavado
Exp2-ExtCrudo Total	Experimento 2, Extracto crudo total
Exp2-FA1	Experimento 2, Fase acuosa 1
Exp2-FA2	Experimento 2, Fase acuosa 2
FMCE	Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.
g	Gramo
Globocan	International Agency for Research on Cancer
HCl	Ácido clorhídrico
HeLa	Línea celular de adenocarcinoma de cérvix
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IR	Infrarrojo
K562	Línea celular de leucemia mielogénica crónica humana
km	Kilometro
L	Litro
m	Metro
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MeOH	Metanol
MEXU	Herbario Nacional
mg	Microgramos
mL	Mililitro
mm	Milímetros

MTT	Bromuro de 3-(4,5.-dimetiltiazolo-2-l)-2-5-difeniltetrazolio
N	Norte
N ₂	Nitrogeno
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
nm	Nanometro
nM	Nano Molar
O	Oeste
p	Pi value
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4
PBS-EDTA	Solución amortiguadora salina de fosfatos con ácido etildiamino tetracético
pH	Potencial de hidrogeno
R.T. (s)	Tiempo de retención en segundos
Rf	Ratio of front; en la frontera
S	Sur
Sw.	Peter Olof Swartz
SW480	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal en nódulo linfático
SW620	Línea celular proveniente de una metástasis de adenocarcinoma colorrectal de nódulo linfático.
UV	Ultravioleta (200-780 nm)
λ	Longitud de onda

Índice:

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	3
4. Antecedentes	4
4.1. Cáncer	4
4.2. Plantas medicinales	5
4.3. Familia Aristolochiaceae	6
4.3.1. <i>Aristolochia grandiflora</i> Sw.	8
4.3.2. Ácidos aristolóquicos	12
4.3.3. Ariscolactamas	13
4.3.4. Especies que han comprobado su efecto biológico por la presencia de ácidos aristolóquicos y ariscolactamas	14
4.3.5. Otros compuestos	15
5. Hipótesis	16
6. Desarrollo experimental	17
6.1. Materiales y métodos	17
6.1.1. Material vegetal	17
6.1.2. Método de recolecta	17
6.1.3. Extracción y fraccionamiento químico	17
6.1.3.1. Materiales de laboratorio	18
6.1.3.2. Extracción y fraccionamiento	18
6.1.3.2.1. Experimento 1 (Esquema 1)	18
6.1.3.2.2. Experimento 2 (Esquema 2)	20
6.1.4. Pruebas de actividad biológica	22
6.1.4.1. Materiales para el cultivo celular	23
6.1.4.2. Líneas celulares	23
6.1.4.3. Pruebas de actividad citotóxica	23
6.1.4.3.1. Descongelamiento celular	23
6.1.4.3.2. Cuidado celular	23
6.1.4.3.3. Propagación de líneas celulares	24

6.1.4.3.4. Conteo celular	24
6.1.4.3.5. Exposición del extracto	24
6.1.4.3.6. Técnica de MTT	25
6.1.4.4. Cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (IC ₅₀)	26
6.1.4.5. Análisis estadístico	26
7. Resultados y discusión	27
7.1. Recolecta	27
7.2. Extracción y fraccionamiento químico	29
7.2.1. Experimento 1	29
7.2.2. Experimento 2	30
7.3. Actividad citotóxica	35
7.3.1. Experimento 1	35
7.3.1.1. Línea celular HeLa	35
7.3.1.2. Línea celular K562	36
7.3.1.3. Línea celular SW480	37
7.3.1.4. Línea celular SW620	39
7.3.2. Experimento 2	41
7.3.2.1. Extracto completo (Exp2-ExtCrudoTotal)	41
7.3.2.2. Fraccionamiento del extracto Exp2-ExtCHCl ₃ -lavado	43
7.3.2.2.1. Línea celular HeLa	43
7.3.2.2.2. Línea celular K562	45
7.3.2.2.3. Línea celular SW480	47
7.3.2.2.4. Línea celular SW620	49
7.3.2.3. Observación de citotóxicidad	51
8. Conclusión	55
9. Apéndices	57
9.1. Uso tradicionales de especies del género <i>Aristolochia</i>	57
9.2. Distribución en México de <i>Aristolochia grandiflora</i> , a partir de la información obtenida en los herbarios de MEXU, FCME y ENCB	65
9.3. Mapa de distribución de <i>Aristolochia grandiflora</i> Sw., realizado con base en la información obtenida de los herbarios MEXU, ENCB y FCME	67

9.4. Distribución en México de <i>Aristolochia grandiflora</i> Sw., a partir de las colecciones de los herbarios de MEXU, FCME y ENCB	68
9.5. Infrarrojo del extracto Exp1-ExtCHCl ₃	71
9.6. Espectro de masas del extracto Exp1-ExtHex	72
9.7. Espectro de masas de la fracción 4 del extracto Exp2-ExtCHCl ₃ -lavado	75
10. Referencias bibliográficas	80

1. Resumen

Se llevó a cabo un estudio biodirigido de la planta identificada como *Aristolochia grandiflora* Sw., recolectada en Fortín de las Flores, Veracruz, para determinar la posible citotóxicidad de compuestos en los extractos de dicha planta. Se utilizó un modelo de citotoxicidad con varias líneas celulares, los resultados de la actividad biológica corresponden a dos extracciones diferentes del mismo material, las extracciones fueron denominadas Exp1 y Exp2, ambas extracciones se fraccionaron con distintos disolventes. La fracción Exp1-ExtHex presentó una mayor actividad citotóxica en la que se podrían encontrar las aristolactamas, a comparación con la fracción Exp1-ExtCHCl₃ la cual presenta ácidos aristolóquicos, ambos compuestos observados por cromatografía en capa fina. La fracción 4 originada del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado presentó una mayor actividad a comparación con el resto de las fracciones, la cual posee compuestos de baja polaridad.

2. Introducción

Desde la antigüedad, las enfermedades han sido un tema de preocupación y atención para el hombre y la sociedad, por lo que desde hace mucho tiempo, el hombre ha tratado de contrarrestarlas para asegurar su subsistencia usando casi siempre tratamientos de origen natural adquiridos por el conocimiento empírico. Los tratamientos para cada enfermedad han variado en cada cultura, el tipo de ecosistema y la disposición de los recursos.

El uso de plantas para tratar las enfermedades ha sido importante históricamente en muchas culturas y aún en la actualidad, su uso es trascendente, principalmente en comunidades de bajos recursos en las que se tiene un acceso restringido a los sistemas de salud y donde si se tiene un acceso a las plantas medicinales de un modo más directo.

En estos grupos es donde ha perdurado el conocimiento empírico del uso de las plantas ya que varias generaciones han probado su efectividad, este conocimiento es utilizado por las diversas instituciones académicas y de investigación científica que buscan nuevas sustancias farmacológicamente activas para curar diversas enfermedades, principalmente aquellas que son crónico-degenerativas y/o en las que no se ha logrado obtener medicamentos de utilidad definitiva¹.

México posee una gran diversidad cultural y biológica; sin embargo, hasta ahora no ha sido posible documentar todo el conocimiento tradicional por lo que nuestro país sigue siendo un campo fértil para el descubrimiento de nuevos fármacos.

3. Objetivos:

Objetivo general:

-Realizar un estudio biodirigido para comprobar la presencia de compuestos citotóxicos en extractos de *Aristolochia grandiflora*.

Objetivos particulares:

- Recolecta y determinación de la especie.
- Obtención de extractos totales.
- Fraccionamiento de extractos.
- Determinación de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos sobre líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620.
- Fraccionamiento para separar los compuestos responsables de la actividad citotóxica.

4. Antecedentes

4.1. Cáncer

El cáncer se considera un problema de salud a nivel mundial ya que es la causa de 7.6 millones (13 %) de defunciones y 12.7 millones (21.7 %) de nuevos casos en el mundo reportados hasta el 2008 por Globocan (International Agency for Research on Cancer)². En México, es la tercera causa de muerte, en el 2001 su índice de mortalidad había aumentado a un 20.05% y su incidencia a un 42.80%^{3,4,5}.

El cáncer se define como un grupo de enfermedades, que se manifiestan por el crecimiento y funcionamiento anormal de las células, las cuales pueden invadir otros sitios adyacentes del mismo órgano y/o migrar a otros órganos (metástasis). Este crecimiento anormal de las células se debe, en parte, a la acumulación de mutaciones genéticas inducidas por factores carcinogénicos físicos, químicos y biológicos² y a la exposición a éstos, de manera reiterada actuando estos factores como promotores oncológicos.

El origen de los tumores se determina por el tipo de tejido en el que se desarrolla: epitelial, conjuntivo y neurogénico. Se clasifican según el tipo de crecimiento que presentan, los tumores benignos son aquellos que presentan un lento crecimiento y no tienen la capacidad de diseminarse; los tumores semi-malignos poseen escasa agresividad y mínima capacidad para diseminarse; y los tumores malignos, presentan un crecimiento invasivo, alta capacidad de diseminación y cambios genéticos que impiden su muerte por apoptosis, ocasionando que la célula sobreviva a tratamientos anticancerosos⁶.

Los principales tratamientos antitumorales son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, los cuales tienen la finalidad de erradicar la enfermedad; sin embargo, en la presencia de tumores malignos y cuando la enfermedad avanzado, se tiene que considerar la calidad y el pronóstico de tiempo de vida del paciente^{7,8}.

La quimioterapia se basa en la utilización de fármacos citotóxicos, antihormonales y la utilización de agentes terapéuticos orientados a determinados órganos blanco y vías de señalización de proliferación ^{7,8}. Los fármacos citotóxicos ocasionan daño a la célula a diferentes niveles: a nivel de precursores, los cuales actúan como antimetabolitos, suplantando en el punto catalítico del sustrato al metabolito normal ocasionando la formación de metabolitos anormales o su inhibición; a nivel de ácidos nucleicos, estos son generalmente agentes alquilantes con grupos alquílicos reactivos, capaces de formar enlaces covalentes con ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos ocasionando que las moléculas sufran cambios estructurales; otros fármacos como los antibióticos se comportan también como antimetabolitos y/o agentes alquilantes, mientras que los alcaloides provenientes de plantas generalmente afectan la mitosis alterando al huso acromático y la formación de tubulina, afectando de la dinámica de los micro-túbulos llevando a la célula a la apoptosis ⁶.

Los alcaloides más utilizados como agentes terapéuticos contra esta patología son:

- Derivados de la colchicina, extraída de las semillas de *Colchicum autumnale*, que impiden la polimerización del DNA, bloqueando la síntesis del mismo ⁶.
- Alcaloides de vinca (vinblastina) que se obtienen de *Vinca rosae.*, forman el complejo tubulina-vinca e inhiben la formación de micro-túbulos ⁶.
- Derivados de la podofilina VP16 y VM26, extraídas de *Podophyllum peltatum*. Su mecanismo de acción es similar al de la colchicina, pero su aplicación terapéutica es escasa ya que sólo se utiliza por vía tópica y solo VP16 y VM26 son utilizadas en la actualidad⁶.
- Paclitaxel (Taxol), aislado de *Taxus brevifolia*. Es un terpeno que se caracteriza por formar numerosos micro-túbulos descentralizados y desorganizados, interrumpiendo de esta forma la proliferación y la migración celular ⁹.

4.2. Plantas medicinales

De acuerdo a la OMS, una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o

cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos¹.

Las plantas medicinales tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semi-sintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de fármacos sintéticos. Con base en ello, la OMS dentro del programa "Salud para todos en el año 2000", ha promovido su estudio, impulsando la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional ¹.

Hasta el 2005 se habían evaluado menos del 10% de las especies de angiospermas existentes en el mundo y sólo se ha determinado una parte de su composición química y propiedades farmacológicas, por lo que existen muchas especies potencialmente importantes para el desarrollo de fármacos, en especial entre las plantas de hábitat tropical. Desafortunadamente a causa de la pérdida de la transmisión del conocimiento tradicional y la baja disponibilidad de las especies que son utilizadas, se reduce la posibilidad de encontrar nuevos tratamientos y terapias para las diversas enfermedades en especial para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer ¹.

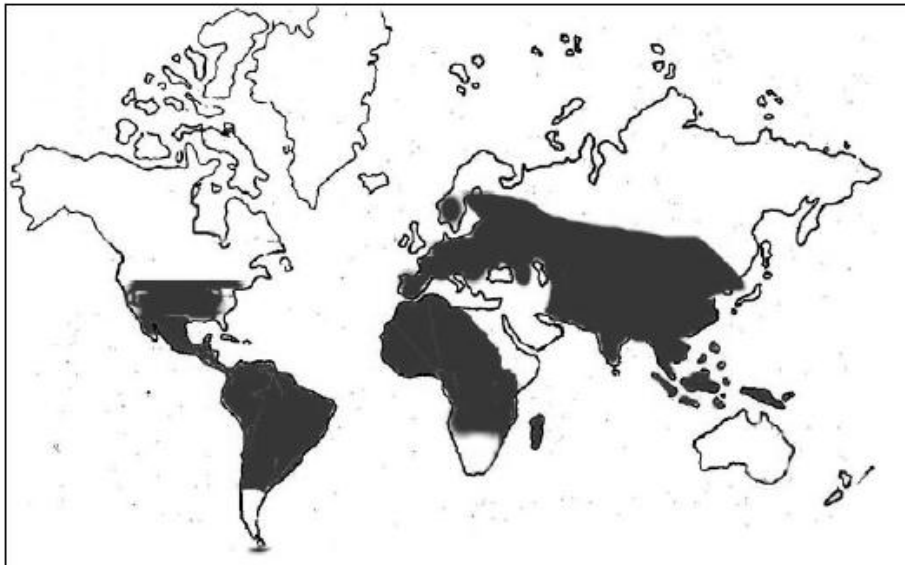
4.3. Familia Aristolochiaceae

Dentro de la clasificación de Cronquist (1981)¹⁰ la familia Aristolochiaceae pertenece a la clase Magnoliopsida y al orden Aristolochiales, una actualización de datos de Tropicos Missouri Botanical Garden (2013) la incluye en el orden de las Piperales, grupo Magnolidas, en el grupo de las angiospermas basales ^{11, 12}. Esta familia tiene de 8 a 10 géneros con cerca de 600 especies, la mayoría de ellas pertenecen a zonas tropicales, pero se llegan a encontrar en zonas templadas de Eurasia y América⁹. Esta familia aparece en Suramérica donde algunas especies del género *Aristolochia*, *Holostylis* y *Euglypha* son endémicas ¹³.

Los integrantes de esta familia se caracterizan por ser hierbas, lianas y ocasionalmente arbustos, sus hojas simples son alternas, dispuestas en espiral, enteras, a veces con venación palmada y con puntos translúcidos, sin estípulas. Las flores se encuentran en posición axial, solitarias o en racimos, son bisexuales, con simetría radial o bilateral, con 3 sépalos connados en ocasiones bilaterales, tubulares y en forma de “S”, con un limbo de 1 a 3 lóbulos,. Pétalos usualmente ausentes o vestigiales, excepto en *Suruma*. Estambres usualmente 6-12, filamentos separados entre sí, ligera o fuertemente adnados al estilo, granos de polen usualmente sin apertura. Carpelos 4-6, connados (excepto en *Suruma*). Ovario con placentación axial o parietal, óvulos numerosos. Fruto tipo cápsula, septicida. Semillas aplanadas, aladas o asociadas con tejido carnoso, la cavidad interna de la testa con abundantes cristales de oxalato, tegumento de 3 capas de fibras cruzadas en ángulos de 90°^{14,15}.

Muchas de las especies se cultivan por la curiosa forma de sus flores y sus hojas frecuentemente variegadas, además de que se le atribuyen propiedades medicinales (Apéndice 8.1.)¹⁵, en especial las pertenecientes a los géneros *Asarum* y *Aristolochia*¹⁴. Las especies de las plantas de esta familia contienen productos oleosos, aromáticos y altamente volátiles derivados de fenilpropanos, terpenos y sesquiterpenos, en las células parenquimáticas tienen acumulación de ácidos aristolóquicos, y otros compuestos nitrogenados de coloración amarilla, de sabor amargo y alcaloides⁹.

El género *Aristolochia* posee 550 especies que se distribuyen desde Asia suroriental hasta el norte de Australia, India, Sri Lanka, el cercano Oriente, África y Europa meridional; en el hemisferio occidental, desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta el centro de Argentina y Chile¹⁶ (mapa 1). En México se encuentran 65 especies de este género¹⁷.



Mapa 1. Distribución de la Familia Aristolochia en Eurasia, América y África ¹⁸.

El género *Aristolochia* se divide en dos series, de las cuales Hexandrae posee dos subseries y la serie Thyrsidae. La serie Hexandrae posee inflorescencia parcialmente reducida por lo general sólo a la flor terminal, las flores son ebracteoladas (con excepción de *Aristolochia grandiflora*), tienen un peciolo y pedúnculo sin zona basal de abscisión. Cápsula con septicida enteras, semillas romboides, elipsoides y desde anchas hasta angostamente ovoides, cuando son aladas solo presentan una ala ¹⁶.

Aristolochia grandiflora pertenece a la sub serie Hexandrae la cual se encuentra ampliamente distribuida en América ¹⁵.

4.3.1. *Aristolochia grandiflora* Sw.

Descrita por Peter Olof Swartz (Sw).

Sinonimia: *Aristolochia scandens*, *A. foetens*, *A. giga*, *A. gigantea*, *A. pichinchensis*, *A. cordiflora*, *Howardia foetens*, *H. gigantea*, *H. grandiflora* ¹⁶.

Es un bejuco grabrescente o pubérulo, con tricomas adpresos de 1 mm largo, peciolo 5-11.5 cm de largo y 1-2 mm de diámetro. Hojas con lámina entera, ovada o anchamente

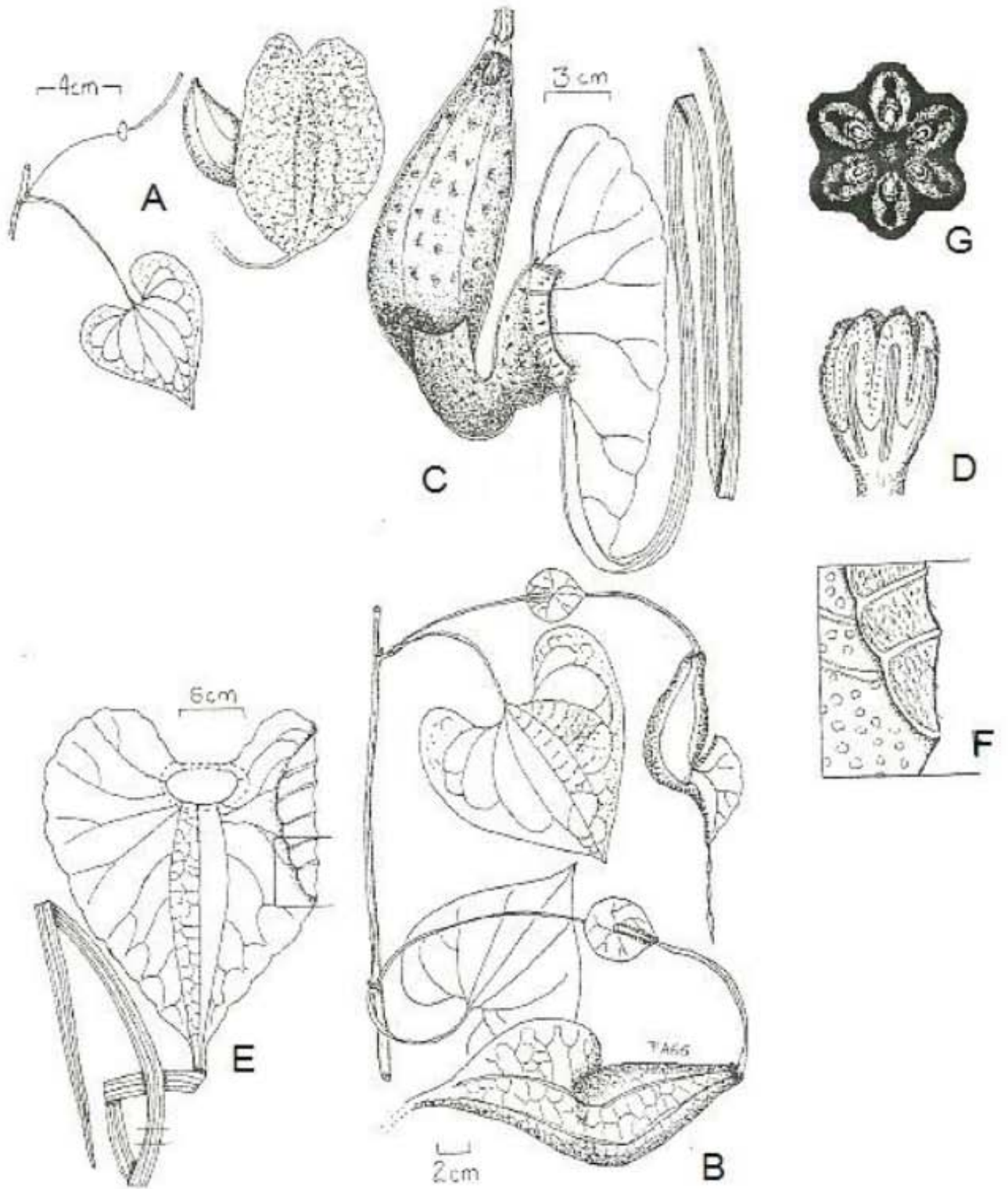
ovada de 6-20 cm de largo y 6-16 cm de ancho, con base profundamente cordada-lobada, con el margen interrumpido por el peciolo ¹⁶.

Pedúnculo floral de 12-23.5 cm de largo, con una bractéola perfoliada circular de 18-30 mm y 22-25 cm de ancho. Limbo floral unilobado, anchamente obovado a elíptico de (8) 19-35 cm de largo y de 12-31 cm de ancho, base aguda, apendiculada, ápndice con un apéndice cintiforme de 7-150 cm de largo y 1-2.5 cm de ancho. Ovario clavado e hipanto no evidente. Ginostemo de 1-1.6 cm de largo y de 4.7-7 mm de diámetro, con anteras lineales. Cápsula cilíndrica de 13-15.5 cm de largo y de 3.2-3.5 cm de diámetro mútica, redonda. Semillas anchamente ovoides de 1-1.3 cm de largo y de 1-1.2 cm de ancho, planas, no aladas ¹⁶ (Dibujo 1).

Se encuentra distribuida en México, Centroamérica, Cuba, Jamaica (localidad tipo), Puerto Rico, Colombia y Ecuador principalmente, en una altitud menor de 1000 m.s.n.m., también se puede encontrar en Las Antillas y en la ciudad de Miami donde se ha introducido como especie exótica ya que se considera que *Aristolochia grandiflora* posee la flor más larga del mundo por a presencia del apéndice cintiforme en el limbo floral que llega a medir 1.5 m ¹⁹.

En México esta especie se encuentra distribuida de manera natural en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Apéndice 8.2, 8.3 y 8.4). *Aristolochia grandiflora* se ha reportado por diversos autores como una planta para distintos usos: antisifilítica, antipalúdica, contra la mordedura de serpiente y contra el reumatismo (utilizada localmente, sobre el músculo), contra el cólera (forma oral), contra la picadura de alacranes (en infusión); para el tratamiento de abscesos (en tintura); se le atribuye actividad antitumoral (aplicado localmente); el tallo tiene propiedad acaricida, emenagogo y eupéptico, estimulante, astringente, contra la oftalmia purulenta, la vaginitis, como antipirético, como antitusígeno, contra cálculos de la vesícula y cálculos renales; administrando la raíz oralmente (no se menciona la forma de preparación) para el tratamiento de cefaleas, como diurético, como expectorante, en enfermedades de los ojos, contra la sordera como tónico, antiblenorrágico, como antiespasmódico y como

vesicante^{20, 21}. De las propiedades atribuidas por la medicina tradicional, sólo se han comprobado su actividad antimicrobiana y antihemorrágica causadas por la mordedura de serpiente^{19, 22}, pese a ello no se ha realizado un estudio etnobotánico específicamente para esta especie.



Dibujo 1. *Aristolochia grandiflora*. A) Nódulo florífero; B) Porción de un vástago florífero; C) Flor disectada; D) Limbo foral en vista frontal; E) Ginostemo en vista lateral; F) Ginostemo en corte transversal; G) Detalle del limbo perigonal ^{10,16}.

4.3.2 Ácidos aristolóquicos (AA)

Son compuestos insolubles en agua, constituidos por un núcleo de fenantreno y los grupos funcionales ácido carboxílico y nitro. Se han descrito once tipos de AA, la diferencia entre cada uno de ellos es la variación de los sustituyentes en los carbonos 2, 6, 7 y 8²³ (Figura 1).

Los ácidos aristolóquicos (AA) son metabolitos secundarios de las especies pertenecientes a la familia Aristolochiaceae, por lo que su función principal podría ser la defensa contra herbívoros, aunque también tienen actividad herbicida ya que evitan la mitosis en células meristemáticas de la especie *Allium*. Algunas mariposas que consumen estos ácidos, en especial la especie *Pachlioptera aristolochiae*, no los metabolizan por lo que pasan al imago confiriéndole toxicidad al insecto. La síntesis de este ácido se realiza en la raíz durante el desarrollo de la planta y durante la época de floración²⁴.

Se ha reportado que los ácidos aristolóquicos aumentan la fagocitosis de leucocitos y poseen actividad antibiótica en bacterias del género *Sphyllococcus* in vitro²⁵; sin embargo también poseen actividad genotóxica, carcinogénica y nefrotóxica²⁵. La actividad genotóxica es ocasionada por la formación de aductos en el DNA, induciendo daño genético y alterando las estructuras cromosómicas²⁵. La formación de aductos modifica los procesos fisiológicos de la transcripción aumentando la proliferación ocasionando fibrosis principalmente en el intestino²⁶ y lisis o necrosis en las células epiteliales de la uretra²⁷.

La acción nefrotóxica se debe a la degradación del epitelio de los túbulos renales, daño en los glomérulos, atrofia celular y necrosis de las células tisuulares renales²⁸. Además los AA tienen interacción con la prostanglandina H, la cual activa a los citocromos CYP1A1 y CYP1A2, ocasionando que el tiempo de vida media del AA aumente. Los ácidos aristolóquicos también pueden interactuar con los fármacos fenfluramina y la dexfenfluramina teniendo actividad anoxigénica causada por la excreción de serotonina

(5HT) y alterando la expresión de los genes de p53 (gen apoptótico) y de H-ras (gen de proliferación celular) ²⁹.

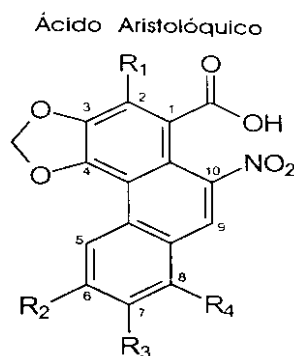


Figura 1. Estructura química de los ácidos aristolóquicos, con sustituyentes en los carbonos 2, 6, 7 y 8 ³⁰.

4.3.3. Aristolactamas

Las aristolactamas (figura 2) son compuestos derivados de los ácidos aristolóquicos, constituidos por un núcleo de fenantreno y el grupo funcional amida, muestra fluorescencia amarilla y su absorción en luz UV en 236, 253, 282, 332 y 390 nm, y responde al reactivo de Dragendorff ³¹.

En humanos también se ha demostrado que las aristolactamas tienen propiedades antiinflamatorias, anti-agregación plaquetaria mediante la inhibición de tromboxano A2, antimicótica, neuro-protectora y de inhibición de la proliferación de las células cancerosas L1210 de leucemia ³², P388 de neoplasma linfóide de ratón, carcinoma de boca y de mama ³³. La acción en células tumorales se debe a la inhibición de CDK2, CDC2, CDK4, AuR4, MAPK y AKT ³⁴. Se han sintetizado varios derivados de aristolactamas, modificando su estructura, comprobando que presentan actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino y de colon ³².

Las aristolactamas se han encontrado en la familia Aristolochiaceae, en las siguientes especies: *Aristolochia argentina* ³¹, *Aristolochia elegans* ³¹, *Aristolochia auricularia* ³⁵, *Aristolochia foveolata* ³⁶, *Aristolochia kankauensis* ³⁷ y *Aristolochia esperanzae* ³⁸. También se pueden encontrar en algunas especies de Annonaceae: *Goniothalamus*

*sesquipedalis*³⁸, *Goniothalamus velutinus*³⁹, *Dasymaschalon blumei*⁴⁰, *Fissistigma balansae*³³ y *Fissistigma oldhamii*³³; y en la familia Piperaceae: *Piper ribesioides*⁴¹, *Piper acutisleginum*⁴² y *Piper umbellatum*⁴³; así como en las familias Saururaceae y Minispermaceae, las cuales son utilizadas en la medicina tradicional del oeste de Asia, en particular en China⁴⁰.

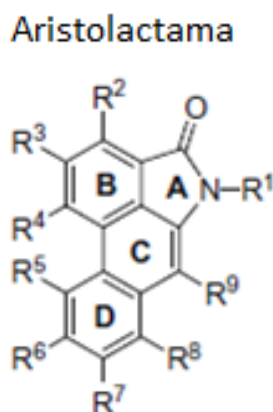


Figura 2. Estructura química general de las aristolactamas³².

4.3.4. Especies en las que se ha comprobado efecto biológico por la presencia de ácidos aristolóquicos y aristolactamas

Debido a la presencia de ácidos aristolóquicos y aristolactamas en la familia Aristolochiaceae, se ha comprobado el efecto citotóxico de algunas de sus especies, principalmente del género *Aristolochia*:

- *Aristolochia macroura*, mostró citotoxicidad en el carcinoma hepato-celular humano (HepG2)⁴⁴.
- *Aristolochia indica*, tiene actividad inhibitoria y reducción del carcinoma “adenocarcinoma 755 “³⁷.
- *Aristolochia mollissima*, posee actividad antitumoral debida de los terpenos “argentilactone 66” y “manshuroide95” e inhibición de la agregación plaquetaria del 92 % y 100 % respectivamente, la actividad es inducida por el ácido aristolóquico⁴⁴.
- *Aristolochia manshuriensis*, posee propiedades antitumorales, en esta planta se presentan dos compuestos de fenantreno SCH 546909 y un glicósido de fenantreno que

son inhibidores de la enzima CDK2, el primer compuesto con una concentración letal 50 (CL₅₀) de 140 nM, mientras que en el segundo presenta una CL₅₀ de 10 μM⁴⁵.

-*Aristolochia baetica*, originaria en Marruecos, es utilizada en la medicina tradicional. Chaouki, W. et al.⁴⁶, evaluaron la actividad en el cáncer de mama en humanos (MCF-7) utilizando el extracto de cloroformo (CL₅₀ 216.06 ± 15 μg/mL) donde se encontraba presente el ácido aristolóquico.

4.3.5. Otros compuestos

Además de los ácidos aristolóquicos y aristolactamas presentes en las especies del género *Aristolochia*, se han encontrado los siguientes compuestos con actividad biológica para el tratamiento de diversas enfermedades:

El terpeno 1(10)-Aristolon-13-al aislado de *A. debilis* presenta un efecto antimicrobiano moderado contra *Staphylococcus*⁴⁷. Los diterpenos kaurenos aislados de las especies *A. rodriguensis* y *A. triangularis* muestran actividad abortiva, antioxidante, inhibidores de cinasas de tirosina, antiinflamatoria, citotoxicidad contra células tumorales de próstata, colon y mama, y contra la mordedura de serpiente. Los fluroterpenos y sus derivados aislados de *A. albida* presentan actividad antiinflamatoria, analgésica, sedante y anticonvulsiva⁴⁸.

En la especie *A. arcuata* los alcaloides g-lactonas endógenas: 3-hidroxi-4-butanolide y 2-hidroxi-4-hidroximetil 4-butanolide muestran un efecto en el aumento de la saciedad del hambre en las ratas⁴⁹.

El compuesto alantoina aislado de *A. gigantea*, es un compuesto producto del metabolismo de las purinas. Este compuesto posee actividad antiinflamatoria, cicatrizante, astringente y estimula la formación de tejido⁵⁰.

7,9-dimetoxitariacuripirona y 9-metoxitariacuripirona (tariacuripironas), aislados de *A. brevipes* disminuyen el impulso eléctrico del íleo de cobayo inducida por la contracción de acetilcolina en ausencia de histamina. El compuesto 9-metoxitariacuripirona también

presenta actividad contra las cepas TA98, TA100, y YG de *Salmonella typhimurium*, y actividad contra la cepa MDR de *Mycobacterium tuberculosis* a concentración de 25 y 50 µg/mL, mientras que el compuesto 7,9 dimetoxitariacuripirona mostró actividad a concentración de A 12.5 µg/mL *contra la cepa* H37Rv/r de *Mycobacterium tuberculosis*⁵¹.

El compuesto denominado licarina A aislado de *A. taliscana* posee actividad contra las cepas H37Rv y MDR de *M. tuberculosis*, con una DL₅₀ (Dosis Letal 50) de 1706 mg/kg, este compuesto también inhibe la fosforilasa Cy1 (PLCy1) con una IC₅₀ de 15.8 ± 1.3 µM en líneas de células cancerígenas. La licarina B aislada también de *A. taliscana* presenta actividad citotóxica contra la leucemia HL-60⁵².

5. Hipótesis

Aristolochia grandiflora Sw., al igual que otras especies de la familia Aristolochiaceae y por los reportes de su uso en la medicina tradicional, poseerá compuestos con actividad citotóxica. Extractos de una planta identificada como *Aristolochia grandiflora* Sw., al ser expuestos en las líneas celulares HeLa, K562, SW480 y SW620 inhibirán la proliferación celular. Los compuestos citotóxicos con una mayor actividad serán los ácidos aristolóquicos y aristolactamas a comparación de los otros compuestos presentes en la planta.

6. Desarrollo experimental

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Material vegetal

-*Aristolochia grandiflora*

6.1.2. Método de recolecta

Con base en los antecedentes y con la finalidad de comprobar la actividad citotóxica del género *Aristolochia* en líneas celulares se recolectó la raíz, el rizoma y las flores de una planta que fue identificada como *Aristolochia grandiflora* mediante la clave “Flora de Colombia”¹⁶. La recolecta se realizó en el municipio de Fortín de las Flores, Veracruz en las coordenadas 18°54'1.26" N 96°58'56" O, que se encuentra a una altitud de 1000 m.s.n.m y limita al norte con Chocamán y Tomatlán, al este con Córdoba, al oeste con Naranjal, Atzacan y la Perla, al sur con Xalapa; el clima corresponde a templado-húmedo con una temperatura promedio de 18°C. Los tipos de vegetación original en la localidad son: bosque mesófilo de montaña, selva alta perenifolia, selva mediana perenifolia. Actualmente la zona está completamente perturbada por asentamientos humanos y la vegetación secundaria es la predominante.

El proceso de herborizado se empezó en campo, prensado las flores y poniéndolas en la sombra durante 4 días, posteriormente se colocaron en la secadora del Laboratorio de Plantas Vasculares, Facultad de Ciencias, UNAM, a una temperatura de 30°C durante 8 días. Los órganos debajo del sustrato fueron lavados con solución jabonosa y agua, y puestos en la secadora del Laboratorio del Taller de Plantas, Facultad de Ciencias durante 8 días a una temperatura de 35°C, posteriormente se trituró con molino manual, obteniendo 457 g de peso seco.

6.1.3. Extracción y fraccionamiento químico

El trabajo fitoquímico se realizó en el laboratorio 121 del Edificio “E” del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

6.1.3.1. Materiales de laboratorio

Los materiales utilizados para el estudio fitoquímico fueron: material de vidrio; equipo de laboratorio: rotoevaporador (Buchi R11), espectrómetro de masas JOEL Sx102, espectrómetro de infrarrojo Nicolet FT-5SX; disolventes comunes: MeOH (metanol), CHCl_3 (cloroformo), AcOEt (acetato de etilo), Hexano; reactivos: Dragendorff, sulfato cerico-ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, hidróxido de amonio y de análisis cromatográfico: placas de gel de sílice y gel de sílice para columna 70/230 mesh

6.1.3.2. Extracción y fraccionamiento

Se realizaron dos experimentos principales:

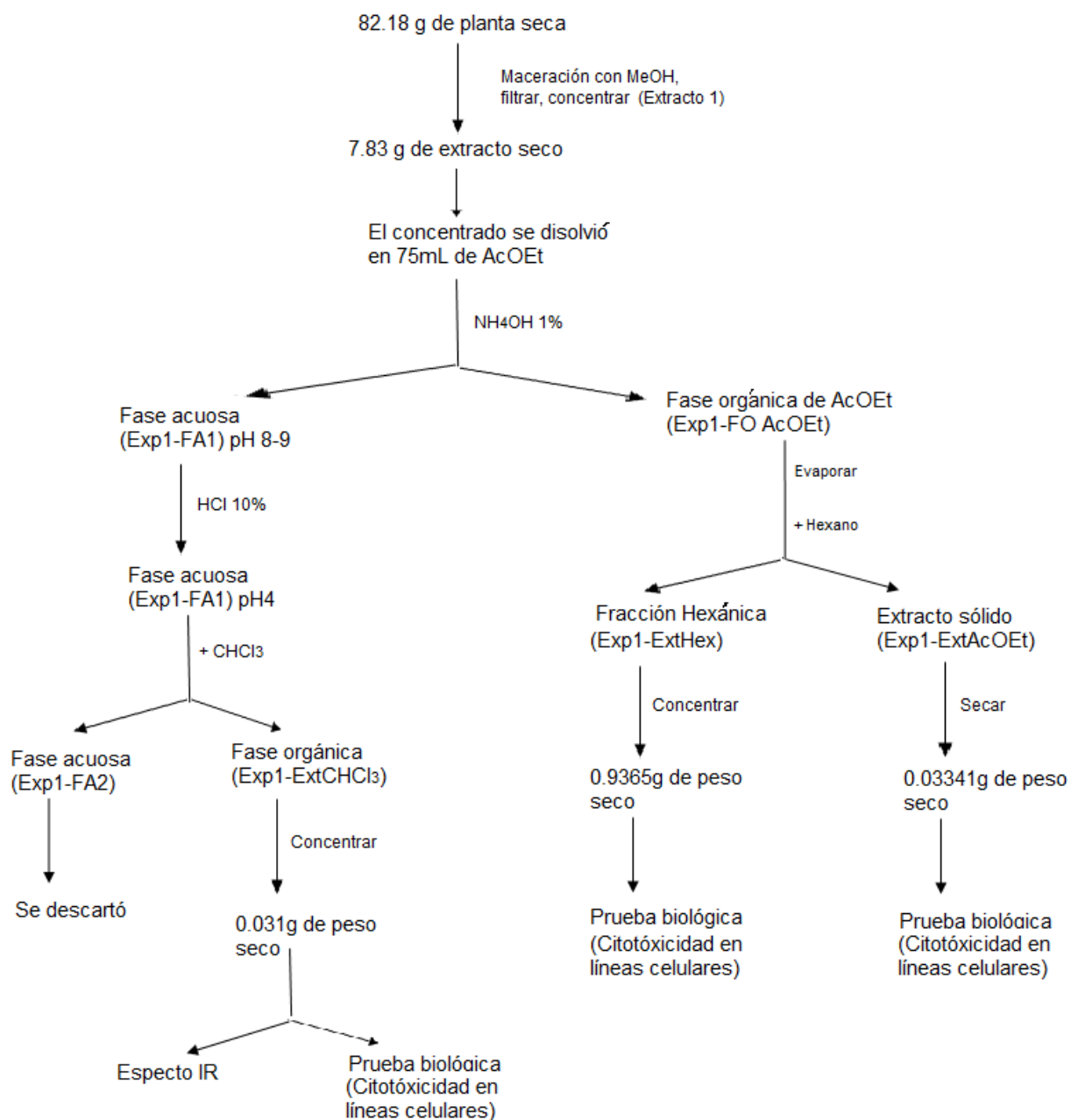
6.1.3.2.1. Experimento 1 (Esquema 1)

82.18 g de planta seca (raíz, rizoma y tallo aéreo) se maceraron en 500 mL de metanol (MeOH) por una semana, se concentró el extracto eliminando el disolvente por destilación a presión reducida, agregando disolvente limpio al material sólido residual para cada nueva extracción, tres extracciones en total (Extracto 1).

El extracto 1 se disolvió en 75 mL de acetato de etilo (AcOEt) y se alcalinizó con 70 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH) al 1% hasta obtener un pH 8-9, obteniéndose una fase acuosa 1 (Exp1-FA1) y una fase orgánica 1 de AcOEt (Exp1-FO AcOEt). En la fracción denominada Exp1-FA1 se encontrarán los ácidos en forma de sales y en la fracción Exp1-FO AcOEt los alcaloides y otras sustancias poco polares³⁰.

La fracción Exp1-FA1, se llevó a un pH de 4 con ácido clorhídrico (HCl) al 10%, adicionando posteriormente cloroformo (CHCl_3). Obteniendo con ello una fase acuosa 2 (Exp1-FA2) y un extracto CHCl_3 (Exp1-Ext CHCl_3) donde se encuentran los ácidos en forma libre³⁰, esta última se concentró obteniendo 0.031 g de peso seco, posteriormente se le realizó un espectro de infrarrojo y se le realizaron pruebas biológicas (estudio de citotóxicidad en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620).

El material denominado Exp1-FO AcOEt se concentró y se le adicionó hexano, obteniéndose una fracción hexánica (Exp1-ExtHex) cuyo peso seco es de 0.09365 g y un extracto de acetato de etilo (Exp1-ExtAcOEt) con un peso seco de 0.03341 g. Se realizaron pruebas citotóxicas a ambas fracciones (estudio de citotóxicidad en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620).



Esquema 1. Experimento 1. Obtención de los extractos Exp1-ExtCHCl₃, Exp1-ExtHex, Exp1-ExtAcOEt.

A los extractos Exp1-ExtCHCl₃, Exp1-ExtAcOEt y Exp1-ExtHex se les realizaron análisis cromatográficos siguiendo las técnicas convencionales de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de gel de sílice y utilizando los sistemas de elución de la tabla 1. Posteriormente se observaron directamente con UV y luz visible, y después fueron reveladas con los reactivos de sulfato cérico-ácido sulfúrico y reactivo de Dragendorff (rociando el reactivo sobre la placa cromatográfica) ³⁰.

Tabla 1. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos.

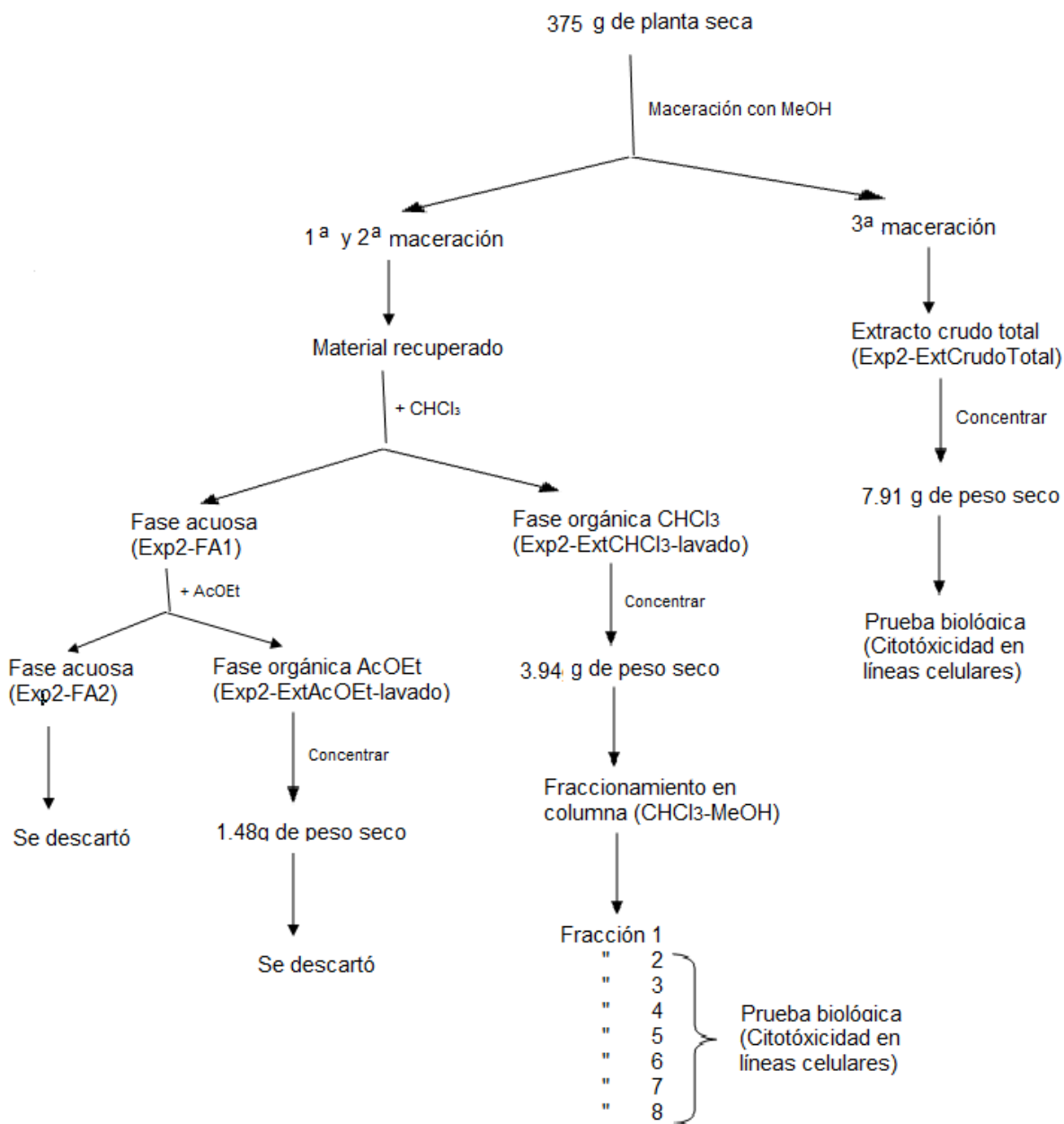
Sistema	Sistema de elución	Proporción
1	CHCl ₃ -MeOH	99:1
2	CHCl ₃ -MeOH	95:5
3	CHCl ₃ -MeOH	90:10
4	CHCl ₃ -MeOH	83:17
5	AcOEt-Hexano	60:20
6	AcOEt-Hexano	50:50

6.1.3.2.2. Experimento 2 (Esquema 2)

Se maceraron 375 g de planta seca con 2.5 L de MeOH por dos semanas, como se explica en el experimento 1. Después de la 2ª semana se obtuvo 28.52 g de extracto seco, el macerado se mezcló accidentalmente con el agua del baño maría debido a que el matraz que contenía los extractos se desprendió del rotoevaporador por una falla de vacío. Por lo que se siguieron dos vías de remediación:

- A) Al material vegetal seco con dos extracciones previas, se le agregó nuevo disolvente y se maceró por una semana adicional, filtrando y concentrando al final de ésta, obteniendo un extracto crudo total (Exp2-ExtCrudoTotal), con un peso seco de 7.91 g, al cual se le realizaron pruebas biológicas (estudio de citotoxicidad en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620).
- B) Para recuperar el contenido del matraz accidentado, se realizaron tres extracciones con cloroformo y en AcOEt en forma consecutiva, obteniendo un extracto clorofórmico (Exp2-CHCl₃-lavado) con un peso seco de 3.94 g y un extracto de AcOEt (Exp2-AcOEt-lavado) con un peso seco de 1.48 g.

Se realizaron análisis placas cromatográficas (CCF) con el material denominado Exp2-ExtCrudoTotal, Exp2-ExtCHCl₃-lavado y Exp2-ExtAcOEt-lavado con el sistema de elusión 4 de la tabla 1, las cuales muestran una composición semejante al ser observada en UV y luz visible. A pesar de lo anterior los extractos no se mezclaron continuándose el trabajo con el extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, con el cual se realizó un fraccionamiento en columna de gel de sílice 70/230 mesh con gradiente CHCl₃-MeOH recolectando cada 20mL, iniciando con CHCl₃ solo y aumentando la concentración de MeOH hasta 96:4⁵³. A cada fracción se le realizaron análisis cromatográficos (CCF) con los sistemas de elusión de la tabla 1, se observaron en UV y en luz visible, y se revelaron con reactivo de Draggendorff y sulfato cérico-ácido sulfúrico (rociando el reactivo sobre la placa cromatográfica), juntándose las que fueran iguales⁵³. Se obtuvieron ocho fracciones, aunque no fue posible la obtención de compuestos puros: La primera fracción se descartó debido a su ausencia de compuestos, se realizaron pruebas citotóxicas con la fracciones 2-8 (estudio de citotoxicidad en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620).



Esquema 2. Experimento 2. Obtención de los extractos Exp2-ExtAcOEt-lavado, Exp2-ExtCHCl₃-lavado y su posterior fraccionamiento, Exp2-ExtCrudo Total.

6.1.4. Pruebas de actividad biológica

El trabajo con cultivos celulares con las líneas celulares HeLa, K562, SW480 y SW620, se realizó en el laboratorio 206 del edificio "F", departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

6.1.4.1 Materiales para el cultivo celular

El material utilizado para la prueba de citotoxicidad fue: reactivos: MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio), taxol (control positivo); medio de cultivo DMEM (Dulbecco Medium Eagle Modified); solución DMSO (Dimetilsulfóxido), solución PBS-EDTA; equipo de laboratorio: lector de Elisa y software: Excel 2007, Graph Prism versión 5.0.

6.1.4.2. Líneas celulares

Las líneas celulares fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, Rockville MD), y representan la base para un modelo de actividad citotóxica in vitro, del laboratorio donde se realizaron las pruebas citotóxicas. Las líneas celulares empleadas fueron:

*HeLa, línea celular de adenocarcinoma de cérvix.

*K562, línea celular de leucemia mielogénica crónica humana.

*SW480, línea celular de un adenocarcinoma colorrectal en el nódulo linfático.

*SW620, línea celular proveniente de una metástasis de adenocarcinoma colorrectal del nódulo linfático.

6.1.4.3. Pruebas de actividad citotóxica

6.1.4.3.1. Descongelamiento celular

Se colocaron 3.5 mL de medio de cultivo D-MEM atemperado a 37°C en una placa de cultivo de 5 mL. El criotubo con las líneas celulares se sacó del N₂ y se descongeló con baño de agua tibia. Las líneas celulares fueron vertidas en la caja de cultivo y se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y 99 % de humedad por dos horas. Posteriormente se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se incubó bajo las mismas condiciones.

6.1.4.3.2. Cuidado celular

El medio de cultivo D-MEM en las líneas celulares fue cambiado cada tercer día, esto se realizó por decantación. Las células adheridas a la caja de cultivo fueron lavadas con

solución PBS y se adicionó nuevo medio D-MEM. La incubación se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente.

6.1.4.3.3. Propagación de líneas celulares

El subcultivo se realizó cuando las células presentaron un crecimiento en un área de 80-90 % de la superficie de la placa, para ello se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS-EDTA hasta desprender la monocapa. Posteriormente las células se disgregaron en células individuales con la ayuda de una pipeta Pasteur y PBS-EDTA. En una caja de cultivo con medio D-MEM previamente atemperado, se adicionó una alícuota de la suspensión celular, la cual fue distribuida con movimientos circulares suaves, se incubó a 37°C, 5 % de CO₂ y 99 % de humedad.

6.1.4.3.4. Conteo celular

El conteo celular se realizó con la cámara de Neubauer, se tomó una alícuota de la suspensión celular homogenizada (200 µL) y se colocó en la cámara, se dejó 1 minuto hasta que las células se sedimentaran sin que se secase la muestra. Se colocó la cámara de Neubauer en un microscopio invertido y se realizó el conteo promedio de células que se encuentran en los cuatro cuadrantes para leucocitos: las células se encontraban en cada uno de los 16 cuadros que comprenden cada cuadrante, para obtener la concentración celular se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Células / mL} = \text{promedio} (1 \cdot 10^4)$$

Obteniendo el número de células por mL.

6.1.4.3.5. Exposición del extracto

En conjunto se evaluó además el taxol como control positivo y negativo para validar el experimento, así como el control de disolvente en el que se utilizó DMSO en la misma cantidad que se utilizó para disolver el extracto y los compuestos. Para el control negativo se empleó el volumen equivalente en medio y en el control positivo se utilizó taxol a una concentración de 0.25 µM.

A partir de cultivos que tenían una confluencia del 80-90 %, las células se lavaron y se desprendieron con 8 mL de PBS-EDTA atemperado a 30°C. La suspensión celular se homogenizó y se contó en la cámara de Newbauer. En cada pozo de una placa de 96 pozos se agregaron $5-6 \times 10^3$ células en un volumen que oscilo entre 20-50 μL y se agregó el volumen adecuado de medio de cultivo atemperado para completar 200 μL y se incubó por 24 horas.

Al terminó de las 24 horas de iniciado el cultivo, la población inicial de células empieza a crecer de forma exponencial, la cual es recomendable para iniciar la exposición de las células al extracto correspondiente a concentraciones de 0.025, 0.25, 2.5, 25 y 250 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos del experimento 1 (Exp1-Ext CHCl_3 , Exp1-ExtHex, Exp1-ExtAcOEt) y en concentraciones de 1, 10, 100, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto Exp2-ExtCrudo Total y las fracciones del extracto Exp2-Ext CHCl_3 -lavado del experimento 2. Se incubó durante 48 horas a 37°C, 5 % CO_2 y atmosfera húmeda.

6.1.4.3.6. Técnica de MTT

El estudio de citotóxicidad se realizó por triplicado para cada una de las líneas celulares mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiliaol-2-1)-2-5-difenitetrazolio), en el cual se cuantificó colorimétricamente la viabilidad celular por la reducción de estas sales de tetrazolio (producido en la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa), obteniendo un compuesto insoluble de coloración azul⁵⁴.

A cada pozo se adicionó 20 μL de solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL , se incubaron por 4 horas obteniendo un cambio en la coloración (rojo oscuro) indicando que la reacción se llevó a cabo, el medio de cultivo de la placa se decantó. Los cristales de formazán del MTT contenidos dentro de las células se extrajeron con 250 μL de DMSO. Las placas se leyeron en un lector de Elisa a 540 nm. Posteriormente se calculó el porcentaje de células muertas mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - (\text{absorbancia del problema} \times 100 / \text{absorbancia del control})$$

6.1.4.4. Cálculo de concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀)

Con los datos obtenidos del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones se calculó la IC₅₀ (concentración inhibitoria 50) mediante interpolación de la regresión lineal obtenidas en el software Graph Prism versión 5.

6.1.4.5. Análisis estadístico:

La evaluación estadística de los resultados de las pruebas citotóxicas de cada extracto en las líneas celulares utilizadas, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y la comparación múltiple Newman-Keuls en el software Graph Prism versión 5.

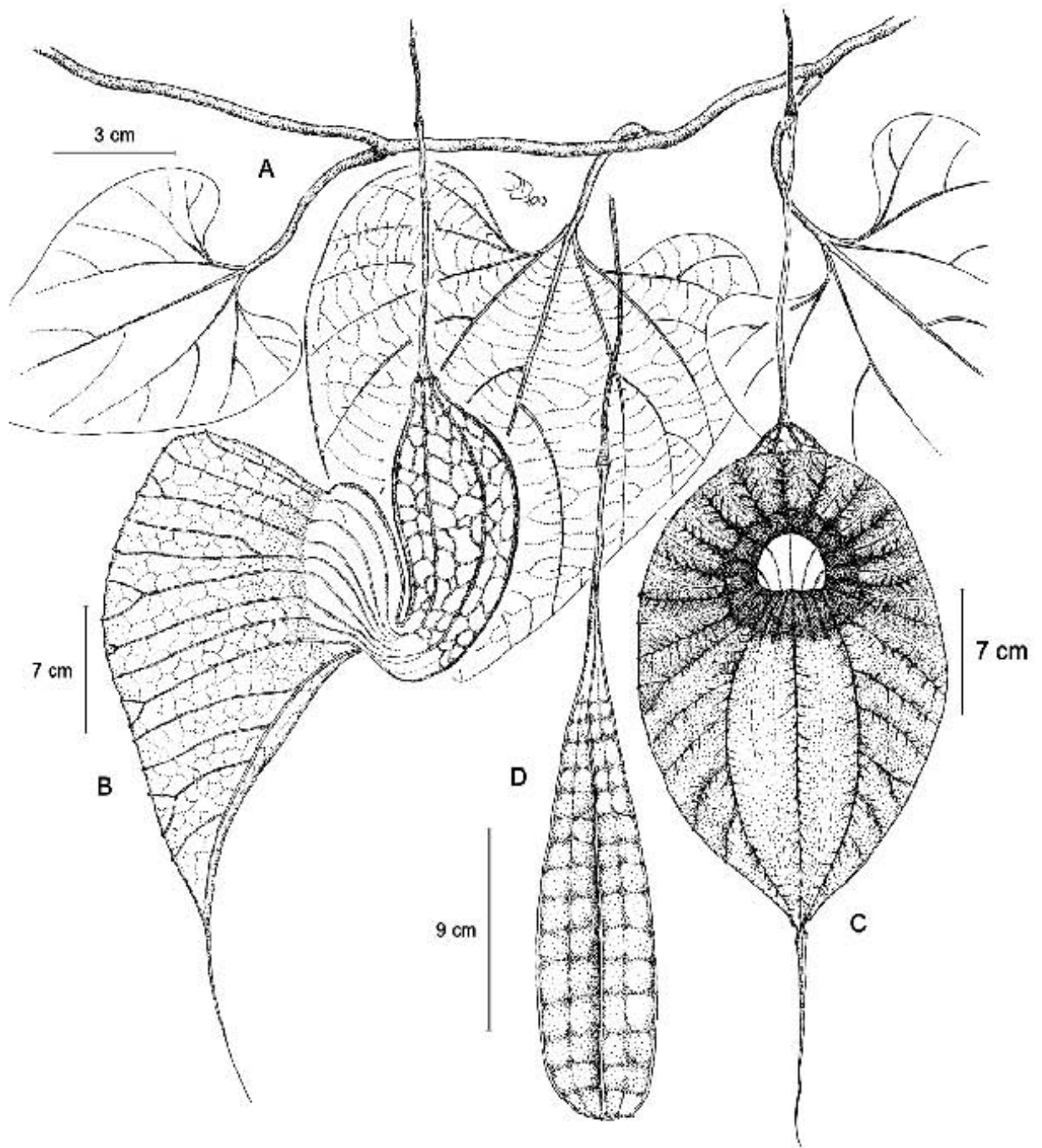
7. Resultados y discusión.

7.1. Recolecta

La recolecta de la planta identificada como *Aristolochia grandiflora* Sw.¹⁶ se realizó en el municipio Fortín de las Flores, Veracruz. La vegetación y el clima presentes en el municipio corresponden a los reportados por los herbarios MEXU, FCME y ENCB, sin embargo, la información obtenida por los herbarios no incluyen al municipio de Fortín de las Flores como parte de la distribución de la especie, considerándose esta colecta como el primer reporte para el municipio Fortín de las Flores.

Durante la recolecta se observó, que la planta se desarrolla sobre la vegetación, que sirve de separación entre los terrenos de cultivo, la escasez de la especie es causada por los campesinos que la retiran de sus casas y de algunos cultivos, porque su olor fétido atrae a dípteros y en ocasiones a zopilotes.

Martínez, M.²¹, reporta a la especie, especialmente la raíz en el tratamiento de tumores; aunque en el conocimiento tradicional se conoce a la raíz como la parte de la planta que se encuentra bajo el sustrato la cual fue recolectada. Posteriormente se identificaron los órganos: raíz y rizoma, los cuales fueron empleados en el estudio fitoquímico. Los ejemplares recolectados y herborizadas se donaron al los herbarios del IMSS con el número de registro 15941 y de la UNAM (FCME) con el número de registro 0138633 (Dibujo 2).



Dibujo 2. Planta recolectada, identificada como la especie *Aristolochia grandiflora* Sw., (A) Hoja con lámina entera en forma de corazón. (B) Flor madura de perfil y (C) de frente, limbo unilobado. D. Fruto, Cápsula obovada. Dibujo realizado por Daniel David Díaz Contreras Díaz.

7.2. Extracción y fraccionamiento químico

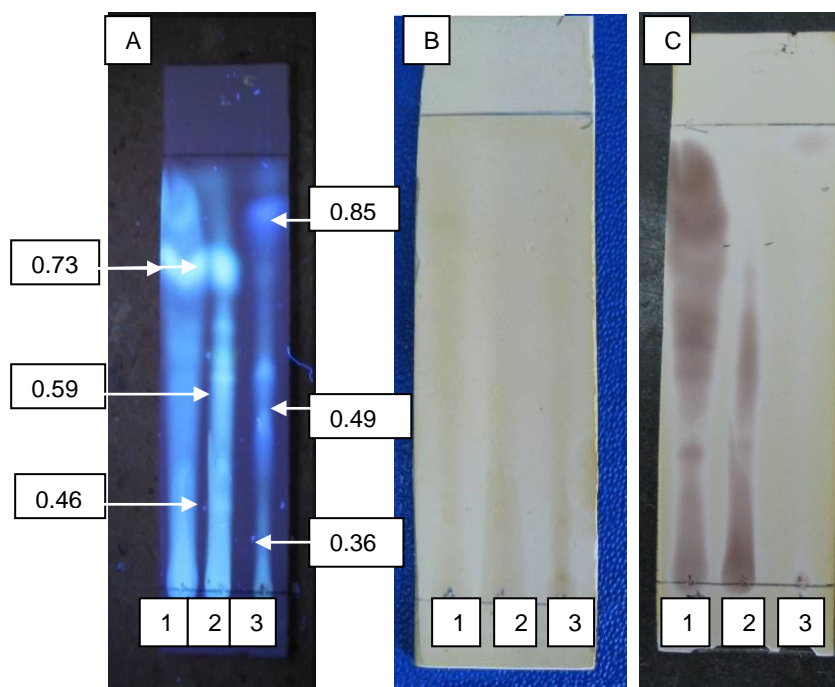
7.2.1. Experimento 1

De la separación del extracto total por modificación del pH y posterior a la extracción (esquema 1), se obtuvo el extracto denominado Exp1-ExtCHCl₃, el cual muestra por cromatografía de placa, estar constituido por tres manchas de Rf (Ratio of Front; en la frontera) de 0.85, 0.49 y 0.36, que presentan fluorescencia a luz UV (λ 200-780 nm) y por lo tanto posiblemente tienen una naturaleza fenantrénica⁵⁵ (AA) (placa 1).

Del extracto Exp1-ExtCHCl₃ se realizó un espectro infrarrojo, el cual muestra la presencia de ácidos aristolóquicos definidos por la absorción a ν 1650,1709 correspondiente a C=O⁵⁶, ν 3383 que corresponde a HO-H⁵⁷, ν 2918 que corresponde a CH-aromático⁵⁸ y ν 2850 correspondiente a Me-O⁵⁷ (Espectro 1, apéndice 8.5). Esta fracción se sometió a pruebas citotóxicas, los resultados se muestran en el apartado correspondiente.

El extracto Exp1-ExtAcOEt mostró por cromatografía en capa fina (placa 1), está constituido por tres compuestos de Rf 0.73, 0.59 y 0.46, con absorción en el UV (λ 200-780 nm) y por lo tanto de naturaleza aromática, posiblemente alcaloides⁵⁹. Esta fracción se sometió a pruebas citotóxicas, y los resultados se muestran en el apartado correspondiente.

El extracto Exp1-ExtHex muestra por cromatografía en placa fina la presencia de un compuesto similar con el extracto Exp1-ExtAcOEt de Rf 0.73 y otros compuestos poco polares: aristolactamas, terpenos y posiblemente ésteres de ácidos alifáticos como lo muestra el espectro de masas del apéndice 8.6. En donde existen las fracciones E/Z 88 y E/Z 74 que pueden corresponder a este tipo de compuestos.



Placa 1. Sistema de elución $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 90:10, Exp1-ExtHex (1), Exp1-ExtAcOEt (2) y Exp1-Ext CHCl_3 , A) los extractos fueron observados en UV (λ 200-780 nm) , el extracto Exp1-Ext CHCl_3 presentó la presencia de compuestos con fluorescencia de Rf 0.85, 0.49 y 0.36 los cuales probablemente sean AA, el extracto Exp1-ExtAcOEt presentó compuestos que podrían ser alcaloides de Rf 0.73, 0.59 y 0.46, el extracto Exp1-ExtHex presentó un compuesto de Rf 0.73 B) Placa revelada con el reactivo de Dragendorff. C) Placa revelada con sulfato cérico-ácido sulfúrico.

7.2.2. Experimento 2

Siguiendo las dos vías de tratamiento se obtuvieron los siguientes resultados (esquema 2):

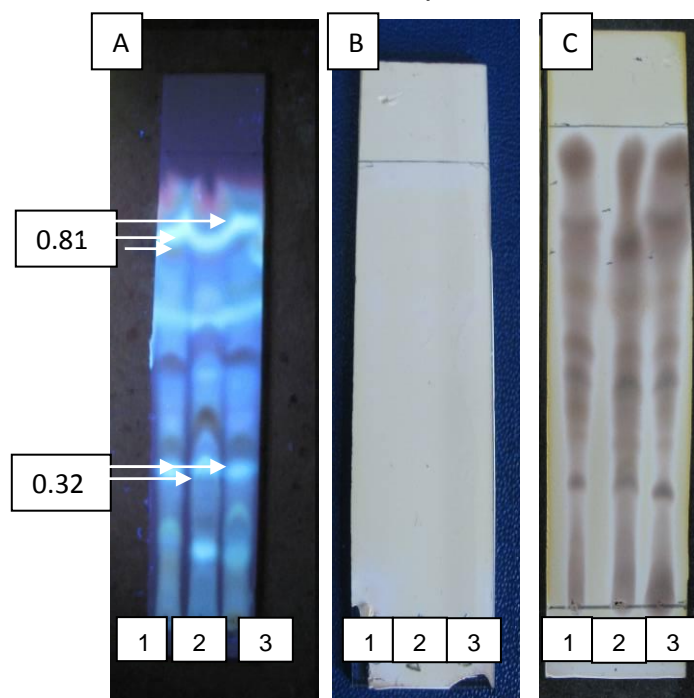
7.91 g de peso seco, del extracto crudo total (Exp2-ExtCrudoTotal), el cual presenta todos los compuestos de la planta en menor concentración debido a que se obtuvo de una tercera maceración con MeOH. Este extracto tratado como extracto total fue sometido a pruebas citotóxicas, cuyos resultados se informan en la sección correspondiente.

A partir del extracto metanólico inicial (28.52 g) se obtuvieron 3.94 g de peso seco del extracto clorofórmico (Exp2-Ext CHCl_3 -lavado) y 1.48 g de peso seco del extracto de

AcOEt (Exp2-ExtAcOEt-lavado), obtenidos de los lavados con CHCl_3 y AcOEt respectivamente.

Las cromatografías de los extractos Exp2-ExtCrudoTotal, Exp2-Ext CHCl_3 -lavado y Exp2-ExtAcOEt-lavado, muestran una composición semejante, pese a ello no se mezclaron.

Los análisis cromatográficos de los extractos ExtCrudoTotal, Exp2-Ext CHCl_3 -lavado y Exp2-ExtAcOEt-lavado (placa 2) muestran la presencia de varios compuestos que absorben a UV (λ 200-780 nm) (compuestos fenantrénicos). De ellos, los de menor polaridad son posiblemente aristolactamas ($R_f=0.81$) y los de mayor polaridad ($R_f=0.32$) corresponden posiblemente a ácidos aristolóquicos.



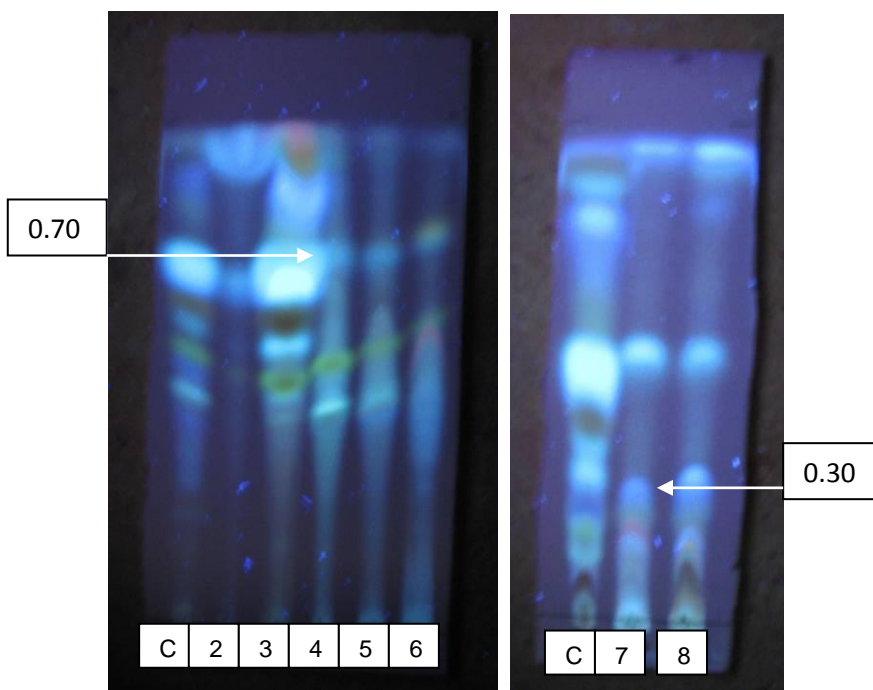
Placa 2, Sistema de elución $\text{CH}_3\text{-MeOH}$ 83:17, ExtCrudoTotal (3), Exp2-Ext CHCl_3 -lavado (2) y Exp2-ExtAcOEt-lavado: A) en UV (λ 200-780 nm), R_f de posibles aristolactamas de 0.81 y posibles ácidos aristolóquicos de 0.32. B) Placa revelada con el reactivo de Dragendorff. C) Placa revelada con sulfato cérico-ácido sulfúrico.

El extracto Exp2-Ext CHCl_3 -lavado se sometió a un fraccionamiento en columna con gradiente $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$. No fue posible la obtención de compuestos puros ya que cada

fracción posee, por lo menos, dos compuestos mayoritarios, además de varios compuestos de menor concentración.

Se obtuvieron ocho fracciones, con un peso total de 1.9936 g de extracto seco (placa 3):

- Fracción 1 fue descartada por no presentar compuestos.
- Fracción 2 con 0.0267 g de peso seco,
- Fracción 3 con 1.7304 g de peso seco.
- Fracción 4 con 0.0480 g de peso seco.
- Fracción 5 con 0.0476 g de peso seco.
- Fracción 6 con 0.0517 g de peso seco.
- Fracción 7 con 0.0571 g de peso seco.
- Fracción 8 con 0.0321 g de peso seco.



Placa 3. Sistema de elución $\text{CH}_3\text{-MeOH}$ 83:17 en UV (λ 200-780 nm), C) Exp2-Ext CHCl_3 -lavado; 2) F2, 3) F3; 4) F4, Rf de posibles aristolactamas de 0.70; 5) F5; 6) F6; 7) F7 Rf de posibles ácidos aristolóquicos de 0.30; 8) F8.

Los análisis cromatográficos de las fracciones descritas previamente, demuestran la posible presencia de aristolactamas en la fracción 4 ($R_f=0.70$) y de los ácidos

aristolóquicos en la fracción 7 ($R_f=0.30$). La prueba de Dragendorff no reaccionó en presencia de las aristolactamas contrario a lo que mencionan Li- Shian Shi y colaboradores, el reactivo de Dragendorff tampoco mostró la presencia de alcaloides en ninguna de las fracciones. Las siete fracciones se sometieron a pruebas citotóxicas y los resultados se muestran en la sección correspondiente.

Debido a que los resultados de actividad citotóxica en las líneas celulares mostraron mayor actividad en la fracción 4, se realizó un espectro de masas (Apéndice 8.7) de dicha fracción para determinar los compuestos presentes. En la tabla 2, se muestra la presencia de 14 compuestos identificados por su peso molecular, en forma general y preliminar, mayoritariamente ácidos alifáticos y derivados, con pesos de 92 a 334 y un porcentaje de área (proporción relativa en la muestra original) de 0.064899 a 39.814 (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de espectro de masas. De estos compuestos, los marcados con asterisco, son más consistentes con el tipo de planta y material empleados (apéndice 9.6.).

# Pico	Nombre	Área %	R.T. (s)	Fórmula	Peso	Similitud	CAS
1	1,2,5-cicloheptatrieno	0.064899	111.256	C ₇ H ₈	92	856	544-25-2
2	4 hidroxí-4-metil- 2-Pentanona	1.9255	153.206	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	891	123-42-2
3	Ácido carbámico, fenil éster	3.5939	259.656	C ₇ H ₇ NO ₂	137	883	622-46-8
4*	2,6-diol,2,6-dimetil 3,7-octadieno	4.6846	337.856	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	841	13741-21-4
5*	3-Metoxihex-1-eno	1.7218	537.456	C ₇ H ₁₄ O	114	734	108811-41-2
6	1-(2,2-dimetilciclopentenil - Etanona	3.6817	545.006	C ₉ H ₁₆ O	140	672	3664-75-3
7	Dihidromyrceno	3.6817	546.606	C ₁₀ H ₁₈	138	644	2436-90-0
8							
9							
10	(4.1.0) heptano, 1-metil.4(2-metiloxiranil)- 7-Oxabiciclo	8.1046	577.806	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	796	96-08-2
11*	Ácido nonanoico	1.4172	584.406	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	684	112-05-0
12*	Ácido tridecanoico, metil éster	0.68763	597.356	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	922	1731-88-0
13	1,2-15,16-Diepoxihexadecacano	3.7006	600.806	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	797	0-00-0
14	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico – dihexil ester	0.86511	608.756	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334	910	84-75-3
15*	Ácido n-hexadecanoico (n-Hexadecanoic acid)	39.814	625.056	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	921	57-10-3
16*	5,7-dodecadieno, (Z,Z)-(5,7-Dodecadiene, (Z,Z)-)	11.391	666.306	C ₁₂ H ₂₂	166	848	6108-62-9
17							

7.3. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica del extracto completo y de las fracciones se determinó mediante el porcentaje de inhibición obtenida de las diferentes concentraciones en las líneas celulares: HeLa, K562, SW480 y SW620. Los resultados obtenidos en cada una de las líneas celulares se presentan a continuación.

7.3.1. Experimento 1

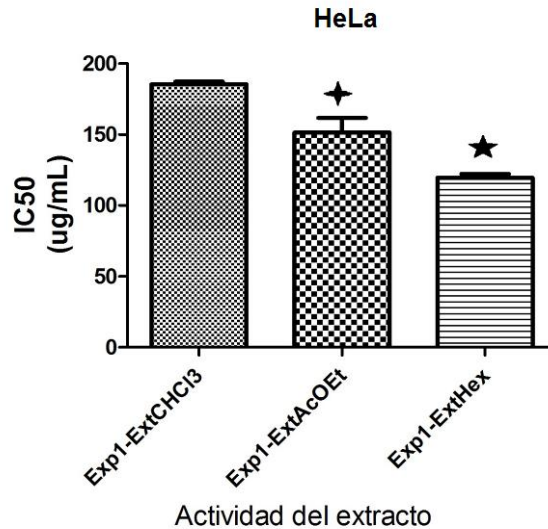
7.3.1.1. Línea celular HeLa

Los porcentajes de inhibición obtenidos en la línea celular de HeLa a concentraciones de: 0.025, 0.25, 2.5, 25 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃, se presentan en la tabla 3. El extracto Exp1-ExtHex presentó una mayor actividad citotóxica a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ a comparación de los extractos Exp1-ExtAcOEt y Exp1-ExtCHCl₃.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición en la línea celular de HeLa en las diferentes concentraciones de Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃. El análisis estadístico se realizó con $p < 0.05$. Extracto Exp1-ExtAcOEt: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) a las demás concentraciones, Extracto Exp1-ExtHex: $\beta \neq$ a las demás concentraciones, Extracto Exp1-ExtCHCl₃: $\chi \neq \delta \neq \varepsilon \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Extracto	Concentración $\mu\text{g/mL}$				
	0.025	0.25	2.5	25	250
Exp1-ExtAcOEt	9.1987 \pm 4.68	8.7865 \pm 3.59	10.5347 \pm 4.96	3.9469 \pm 1.42	78.5842 \pm 2.89 α
Exp1-ExtHex	-2.9378 \pm 5.29	3.6216 \pm 6.75	11.1842 \pm 6.73	8.8751 \pm 3.78	92.0602 \pm 3.08 β
Exp1-ExtCHCl ₃	2.8929 \pm 0.43 χ	4.0516 \pm 1.72 χ	8.8005 \pm 1.00 δ	20.6412 \pm 0.93 ε	64.1091 \pm 0.78

Se determinó la IC₅₀ mediante el porcentaje de inhibición (tabla 3) en la línea celular de HeLa de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃, en función de la concentración y la inhibición de la proliferación celular. El extracto Exp1-ExtHex presentó una mayor actividad citotóxica, con una IC₅₀ de 119.50 $\mu\text{g/mL}$, mientras que Exp1-ExtCHCl₃, Exp1-ExtAcOEt presentaron una IC₅₀ de 185.44 $\mu\text{g/mL}$ y 151.44 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (gráfica 1), el taxol presentó una IC₅₀ de 20.09 μM .



Gráfica 1. IC₅₀ de los extractos Exp1-ExtCHCl₃ y Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex en la línea celular de HeLa, ★, p < 0.05 vs ✦ y, Exp1-ExtCHCl₃. ✦, p < 0.05 vs Exp1-ExtCHCl₃.

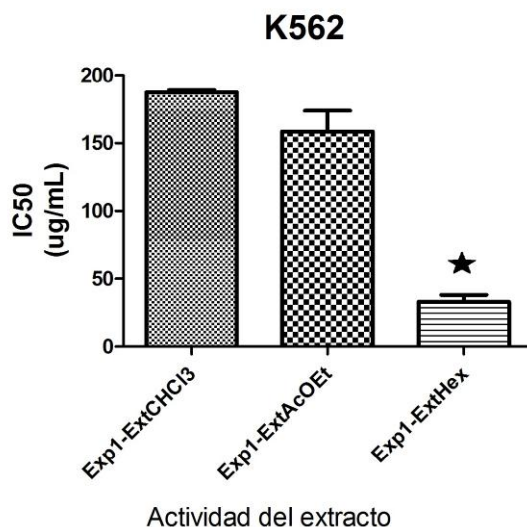
7.3.1.2. Línea celular K562

El porcentaje de inhibición de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃ en la línea celular K562, permitió determinar que el extracto Exp1-ExtAcOEt presentó una mayor respuesta inhibitoria a partir de la concentración de 0.025 µg/mL, la fracción con mayor porcentaje de inhibición fue a una concentración de 250 µg/mL de Exp1-ExtHex con 86.2375 ± 2.12 % (tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición en la línea celular de K562 en las diferentes concentraciones de Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃. El análisis estadístico se realizó con p < 0.05. Extracto Exp1-ExtAcOEt: α ≠ (diferente significativamente) a las demás concentraciones, Extracto Exp1-ExtHex: β ≠ χ ≠ 0.025 µg/mL, Extracto Exp1-ExtCHCl₃: δ ≠ ε ≠ 250 µg/mL.

Extracto	Concentración µg/mL				
	0.025	0.25	2.5	25	250
Exp1-ExtAcOEt	9.1333± 4.65	8.7235± 3.57	10.46± 4.92	27.6345± 1.71	72.9561± 8.33 α
Exp1-ExtHex	-3.01853± 5.26	3.4952± 6.72 β	11.0043± 6.70 β	27.5992± 7.51 β	86.2375± 2.12χ
Exp1-ExtCHCl ₃	2.07876± 0.41 δ	3.9186± 1.69 δ	8.6347± 1.00 δ	20.3914± 0.94 ε	63.5507± 0.74

Se calculó la IC₅₀ de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃ con base en el porcentaje de inhibición de cada extracto. El extracto Exp1-ExtHex presentó una mayor IC₅₀ con 32.88 µg/mL por lo tanto resultó ser el más citotóxico, a diferencia de los extractos Exp1-ExtCHCl₃ y Exp1-ExtAcOEt las cuales presentaron una IC₅₀ de 187.44 µg/mL y 158.56 µg/mL respectivamente (grafica 2), el taxol presentó una IC₅₀ de 1.01 µM.



Gráfica 2. IC₅₀ de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃, en la línea celular de K562 ★, p<0.05 vs. Exp1-ExtAcOEt y Exp1-ExtCHCl₃.

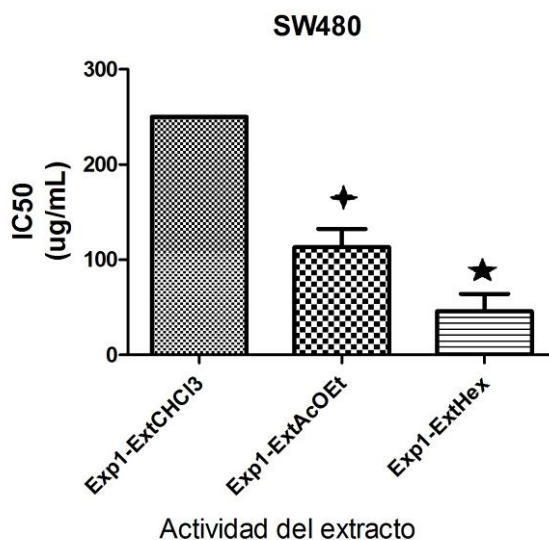
7.3.1.3. Línea celular SW480

Los porcentajes de inhibición de los extractos Exp1-ExtCHCl₃, Exp1-ExtAcOEt y Exp1-ExtHex, demostraron que el extracto Exp1-ExtHex presentó un mayor porcentaje de inhibición, seguido de éste se encuentra el extracto Exp1-ExtAcOEt a una concentración de 250 µg/mL. El extracto Exp1-ExtCHCl₃ presentó una inhibición de 7.2371 ± 4.51 % a una concentración de 0.025 µg/mL pero disminuyó a posteriores concentraciones, teniendo un máximo de inhibición de 35.4943 ± 2.98 % a 250 µg/mL (tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición en la línea celular de SW480 en las diferentes concentraciones de Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃. El análisis estadístico se realizó con $p < 0.05$. Extracto Exp1-ExtAcOEt: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\neq \beta \neq \chi \neq 250 \mu\text{g/mL}$, Extracto Exp1-ExtHex: $\delta \neq 25$ y $250 \mu\text{g/mL}$. Extracto Exp1-ExtCHCl₃: $\varepsilon \neq$ a las demás concentraciones.

Extracto	Concentración $\mu\text{g/mL}$				
	0.025	0.25	2.5	25	250
Exp1-ExtAcOEt	-9.64777 \pm 5.42 α	-5.7737 \pm 5.21 α	-31.8135 \pm 6,63 β	26.0009 \pm 3.49 χ	82.8171 \pm 0.82
Exp1-ExtHex	-6.8618 \pm 5.22 δ	-5.0848 \pm 5.12 δ	5.3785 \pm 5.07 δ	80.2032 \pm 0.90	85.5894 \pm 0.83
Exp1-ExtCHCl₃	7.2371 \pm 4.51	-1.2401 \pm 4.96	-12.356 \pm 5.38	3.2936 \pm 4.71	35.4943 \pm 2.98 ε

Mediante el porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos se calculó la IC₅₀. El extracto Exp1-ExtHex presentó la mayor inhibición con una IC₅₀ de 45.93 $\mu\text{g/mL}$ mientras que el extracto Exp1-ExtAcOEt presentó una IC₅₀ de 133.43 $\mu\text{g/mL}$ y el extracto Exp1-ExtCHCl₃ una IC₅₀ de 250 $\mu\text{g/mL}$ (grafica 3), el taxol presentó una IC₅₀ de 9.83 μM .



Gráfica 3. IC₅₀ de los extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃, en la línea celular de SW480, \star , $p < 0.05$ vs \blacklozenge y Exp1-ExtCHCl₃, \blacklozenge , $p < 0.05$ vs Exp1-ExtCHCl₃.

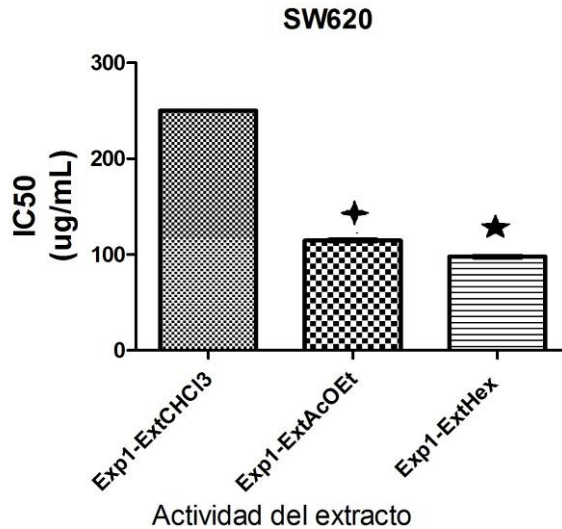
7.3.1.4. Línea celular SW620

El porcentaje de inhibición de los extractos Exp1-ExtCHCl₃, ExtAcOEt y Exp1-ExtHex en la línea celular SW620 a diferentes concentraciones se presentan a continuación. El extracto Exp1-ExtHex presentó un mayor porcentaje de inhibición de 86.26 ± 0.83 % a una concentración de 250 µg/mL, seguida de la Exp1-ExtAcOEt con 80.2 ± 0.03 % a una concentración de 250 µg/mL. Ninguno de los tres extractos presentó una inhibición en la concentración de 0.025 µg/mL (tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición en la línea celular de SW620 en las diferentes concentraciones de Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃. El análisis estadístico se realizó con p < 0.05. Extracto Exp1-ExtAcOEt: α ≠ (diferente significativamente) β ≠ χ ≠ δ ≠ 250 µg/mL, Extracto Exp1-ExtHex: ε ≠ 25 y 250 µg/mL. Extracto Exp1-ExtCHCl₃: φ ≠ a las demás concentraciones.

Extracto	Concentración µg/mL				
	0.025	0.25	2.5	25	250
Exp1-ExtAcOEt	-6.4217± 0.20 α	-1.1606± 0.19 β	-3.431± 0.19 χ	-19.4761± 0.22 δ	80.2± 0.03
Exp1-ExtHex	-8.5392± 5.22 ε	-4.1077± 5.12 ε	-7.4041± 5.07 ε	-19.0395± 0.90	86.2688± 0.83
Exp1-ExtCHCl ₃	-1.4226± 4.51	-0.2001± 4.96	8.5318± 5.38	1.3496± 4.71	35.8193± 2.98 φ

Se determinó el IC₅₀ para los tres extractos (Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃), El extracto Exp1-ExtHex tuvo una mayor inhibición con un valor de IC₅₀ de 97.88 µg/mL, mientras que para el extracto Exp1-ExtAcOEt su IC₅₀ fue de 114.70 µg/mL y la Exp1-ExtCHCl₃ presentó una inhibición mayor a 250 µg/mL (gráfica 4), el taxol presentó una IC₅₀ de 20.08 µM.



Gráfica 4. IC₅₀ de los extractos extractos Exp1-ExtAcOEt, Exp1-ExtHex y Exp1-ExtCHCl₃, en la línea celular de SW620, ★, p < 0.05 vs Exp1-ExtCHCl₃ y Exp1-ExtAcOEt, ★, p < 0.05 vs Exp1-ExtCHCl₃.

Los resultados mostraron que el extracto Exp1-ExtHex con compuestos poco polares tiene un efecto inhibitorio en todas las líneas celulares, con una IC₅₀ en HeLa de 119.50 µg/mL, en K562 de 32.88 µg/mL, en SW480 de 80.32 µg/mL y SW620 de 97.88 µg/mL, a diferencia del extracto Exp1-ExtAcOEt que presentó actividad inhibitoria importante en las líneas celulares de HeLa, SW480 y SW620 con 97.88 µg/mL, 133.47 µg/mL y 97.88 µg/mL respectivamente. Esto puede deberse a que el extracto Exp1-ExtHex posee una mayor concentración del principio activo, terpenos y/o aristolactamas presentando posiblemente un efecto sinérgico. Se han realizado estudios para observar la actividad citotóxica de los terpenos pertenecientes al género *Aristolochia*; Geraldo, A., et al⁴⁸, demostraron la actividad citotóxica de los diterpenos kaurenos aislados de las especies *A. rodriguensii* y *A. triangularis* en células tumorales de próstata, colon y mama; otro estudio que respalda la actividad inhibitoria en líneas celulares de los terpenos, es el realizado por León-Díaz, R., et al⁵², quienes aislaron los terpenos licarina A y licarina B de la especie *A. taliscana*, el terpeno licarina A inhibe la Cy1 (PLCy1) de las células tumorales a una IC₅₀ de 15.8 ± 1.3 µM, mientras que el terpeno licarina B presenta actividad citotóxica contra la leucemia HL-60. La actividad citotóxica de las aristolactamas se encuentran reportados por los autores Young Lok Choi, et al³² y Yi-Chen Chia, et al³³, los estudios realizados por Young Lok Choi, et al³², sintetizaron

aristolactamas y demostraron que inhiben la proliferación de las células cancerosas L1210 de leucemia, mientras que en el estudio de por Yi-Chen Chia, et al³³, las aristolactamas presentaron actividad citotóxica de las líneas P388 de neoplasma linfóide de ratón, carcinoma de boca y mama.

El extracto Exp1-ExtCHCl₃ cuyo contenido incluye ácidos aristolóquicos presentó la actividad citotóxica menor al resto en las cuatro líneas celulares, esto puede deberse a varias causas: dosis, disolución en el medio de cultivo, antagonismo farmacológico y/o fisiológico de los ácidos aristolóquicos. Los estudios de Chaouki, W., et al⁴⁶, demuestran que el extracto clorofórmico donde se presenta el ácido aristolóquico de la especie *A. baetica* presenta una CL₅₀ (Concentración Letal 50) de 216.06 µg/mL ± 15 µg/mL en la línea MCF-7, similar a la IC₅₀ obtenida en nuestros experimentos lo cual nos permite determinar que este efecto citotóxico del extracto Exp1-ExtCHCl₃ obtenido concuerda con lo encontrado por otros autores.

7.3.2. Experimento 2

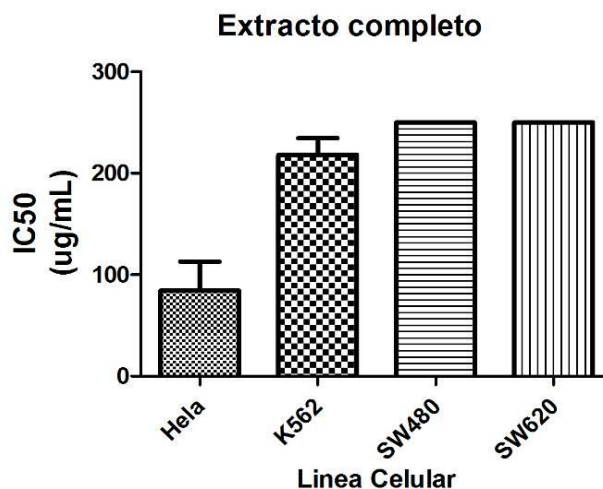
7.3.2.1. Extracto completo (Exp2-Ext CrudoTotal)

Se determinó el efecto citotóxico del extracto completo (Exp2-Ext CrudoTotal) para observar la actividad de los compuestos en su conjunto en las líneas celulares HeLa, K562, SW480 y SW620. Los resultados muestran que la inhibición celular del extracto Exp2-ExtCrudoTotal en las células HeLa y SW620 se dio a partir de la concentración de 0.25 µg/mL (14.9801 ± 0.97 % y de 4.5402 ± 1.79 % respectivamente); mientras que en la línea celular K562 el porcentaje de inhibición fue de 1.1369 ± 0.41 a partir de la concentración 0.025 µg/mL; en la línea SW480 la actividad citotóxica se presentó a partir de la concentración 25 µg/mL (0.9531 ± 2.41 %). Las líneas celulares HeLa y K562 a una concentración de 250 µg/mL mostraron una inhibición de 53.8938 ± 1.25 % y 54.4925 ± 4.08 % respectivamente, siendo las líneas más afectadas comparadas con las demás líneas, mientras que las líneas SW480 y SW620 a la misma concentración, presentaron una inhibición de 21.4324 ± 1.39 % y 31.8678 ± 2.17 % respectivamente (tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620 a diversas concentraciones de Exp2-ExtCrudoTotal. El análisis estadístico se realizó con $p < 0.05$. Línea celular HeLa: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\beta \neq \chi \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Línea celular K562: $\delta \neq$ a las demás concentraciones. Línea celular SW480: $\varepsilon \neq$ a las demás concentraciones. Línea celular SW620: $\phi \neq \gamma \neq \eta \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Línea celular	Concentración $\mu\text{g/mL}$				
	0.025	0.25	2.5	25	250
HeLa	-1.1656 \pm 4.64 α	14.9801 \pm 0.97 β	25.6200 \pm 3.93 χ	31.1011 \pm 1.97 χ	53.8938 \pm 1.25
K562	1.1369 \pm 0.41	9.3178 \pm 0.46	10.7875 \pm 2.27	17.8591 \pm 3.26	54.4925 \pm 4.08 δ
SW480	-2.9956 \pm 5.25	-2.342 \pm 3.96	-5.9912 \pm 3.45	0.9531 \pm 2.41	21.4324 \pm 1.39 ε
SW620	-2.8448 \pm 0.57 ϕ	4.5402 \pm 1.79 γ	9.3678 \pm 1.87 η	14.7988 \pm 3.78 η	31.8678 \pm 2.17

Mediante el porcentaje de inhibición de cada línea celular se calculó la IC_{50} del extracto completo en cada una de las líneas celulares. La línea celular HeLa presenta mayor efecto inhibitorio provocado por el extracto completo con una IC_{50} de 127.78 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en las líneas celulares K562 y SW620 se observó un efecto inhibitorio menor ya que la IC_{50} es de 250 $\mu\text{g/mL}$ (grafica 5), la IC_{50} del taxol en la línea HeLa fue de 21.26 μM , en la línea K562 de 1.03 μM , en la línea SW480 de 9.94 μM y en la línea SW620 de 20.10 μM .



Gráfica 5. Muestra la IC_{50} en cada una de las líneas celulares.

El efecto inhibitorio menor del extracto Exp2-ExtCrudoTotal en las líneas celulares K562, SW480 y SW620 comparado con el Ext1-ExtHex, puede deberse a diversos factores: dosis insuficiente y/o la no disolución de los compuestos en el medio de cultivo. Sin embargo, el efecto citotóxico en estas líneas celulares comparado con el extracto Exp1-ExtCHCl₃ permite observar su similitud en las IC₅₀, una razón podría deberse a que los compuestos en ambos extractos podrían estar actuando de manera similar obteniendo con ello una baja actividad citotóxica. Contrario a lo que se observó en la línea celular HeLa, la cual presentó una mayor actividad inhibitoria evidenciando que es más susceptible a los compuestos de la planta extraídos de esta manera.

7.3.2.2. Fraccionamiento del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado

Se fraccionó el extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado mediante cromatografía en columna para corroborar la actividad citotóxica de los posibles ácidos aristolóquicos y aristolactamas en las cuatro líneas celulares⁵². La cromatografía en capa fina de las posibles aristolactamas en la fracción 4 presentó una Rf=0.70 y los posibles ácidos aristolóquicos de la fracción 7 presentó una Rf=0.30.

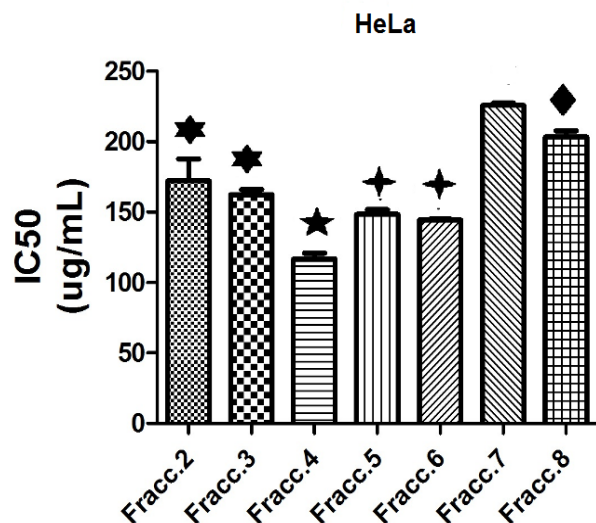
7.3.2.2.1. Línea celular HeLa

Los porcentajes de inhibición obtenidos en la línea celular de HeLa del fraccionamiento del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado se muestran en la tabla 8. En la concentración inicial (1 µg/mL) la fracción 7 presentó el 13.0953 ± 2.57 % contrario a las demás que poseen una mayor inhibición a concentraciones más altas. A una concentración de 250 µg/mL, las fracciones 2, 3 y 6 son las que poseen el porcentaje de inhibición más alto con 81.0744 ± 0.46 %, 80.7187 ± 0.51 % y 81.1793 ± 0.54 % .

Tabla 8. Porcentaje de inhibición en la línea celular de HeLa del fraccionamiento del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado. El análisis estadístico se realizó con p< 0.05. . Fracción 2: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\beta \neq \chi \neq 250 \mu\text{g/mL}$ Fracción 3: $\delta \neq \varepsilon \neq \phi \neq \gamma \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 4: $\eta \neq \iota \neq \vartheta \neq 1 \mu\text{g/mL}$. Fracción 5: $\lambda \neq \mu \neq \nu \neq \Omega \neq 1 \mu\text{g/mL}$. Fracción 6: $\pi \neq \theta \neq \rho \neq 1 \mu\text{g/mL}$. Fracción 7: $\sigma \neq \tau \neq \upsilon \neq 1 \mu\text{g/mL}$. Fracción 8: $\varpi \neq \psi \neq \zeta \neq \Delta \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Fracción	Concentración $\mu\text{g/mL}$				
	1	10	100	200	250
2	-14.0852 \pm 2.47 α	10.0484 \pm 2.97 β	12.8337 \pm 0.54 β	61.3573 \pm 0.78 χ	81.0744 \pm 0.46
3	-6.0683 \pm 2.58 δ	-17.7711 \pm 1.59 ε	33.7289 \pm 1.33 ϕ	63.2795 \pm 0.81 γ	80.7187 \pm 0.51
4	-18.1337 \pm 1.37	23.1740 \pm 2.17 η	43.8748 \pm 0.96 ι	79.9464 \pm 0.53 ϑ	78.6917 \pm 0.54 ϑ
5	-7.5733 \pm 2.24	8.2589 \pm 1.63 λ	34.3085 \pm 1.38 μ	66.2670 \pm 0.42 ν	76.7814 \pm 0.62 Ω
6	-11.3358 \pm 2.08	-2.8626 \pm 1.44 π	27.7865 \pm 0.50 θ	79.4156 \pm 0.52 ρ	81.1793 \pm 0.54 ρ
7	13.0953 \pm 2.57	4.0355 \pm 1.68 σ	9.0646 \pm 2.49 σ	34.9751 \pm 1.14 τ	69.8568 \pm 0.74 υ
8	-7.0037 \pm 1.71 ϖ	18.4334 \pm 2.44 ψ	6,8363 \pm 1.46 ζ	44.9928 \pm 1.12 Δ	71.1936 \pm 0.56

Con los porcentajes de inhibición de cada una de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado se obtuvieron las IC₅₀, se observó que la fracción 4 es la que tiene una IC₅₀ de 116.75 $\mu\text{g/mL}$ siendo ésta la que posee un mayor efecto citotóxico, contrario a la fracción 7 la cual presenta una menor actividad citotóxica con 225.73 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las demás fracciones (gráfica 6), el taxol presentó una IC₅₀ del 17.31 μM .



Gráfica 6, Muestra la IC₅₀ de cada una de las fracciones obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado en la línea celular HeLa, ★, p < 0.05 vs ◆, ◆ y fracción 7. ◆, p < 0.05 vs ★, ◆ y fracción 7. ◆, p < 0.05 vs ◆ y fracción 7. ◆, p < 0.05 vs fracción 7.

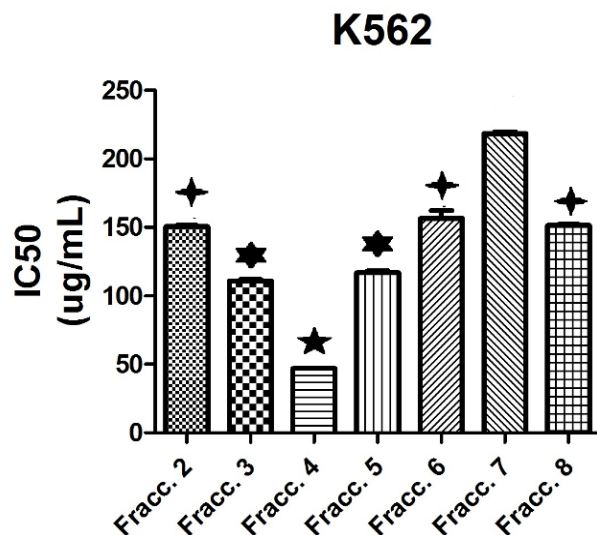
7.3.2.2.2. Línea celular K562

Los porcentajes de inhibición en la línea celular K562 variaron en cada una de las fracciones de Exp2-ExtCHCl₃-lavado. Las fracciones 3 y 5 presentaron una respuesta inhibitoria a partir de la concentración inicial (1 µg/mL) de 5.3532 ± 0.34 % y 4.5551 ± 0.89 % respectivamente; las fracciones 2, 7 y 8 (5.3132 ± 0.46 %, 2.3820 ± 0.28 % y 6.0422 ± 0.10 %) presentaron una inhibición a partir de la concentración de 10 µg/mL. Por otra parte, la fracción que presentó una respuesta citotóxica mayor a una concentración de 250 µg/mL fue la 2 con 79.605 % (tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de inhibición en la línea celular K562 de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado. El análisis estadístico se realizó con p< 0.05. . Fracción 2: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\beta \neq \chi \neq \delta \neq 250 \mu\text{g/mL}$ Fracción 3: $\varepsilon \neq \phi \neq \gamma \neq \eta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 4: $\iota \neq \vartheta \neq \lambda \neq \mu \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 5: $\nu \neq \Omega \neq \pi \neq \theta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 6: $\rho \neq \sigma \neq \tau \neq 1 \mu\text{g/mL}$. Fracción 7: $\upsilon \neq \omega \neq \psi \neq \zeta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 8: $\Delta \neq \Sigma \neq \xi \neq \Upsilon \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Concentración $\mu\text{g/mL}$					
Fracción	1	10	100	200	250
2	-0.1679 \pm 0.14 α	5.3132 \pm 0.46 β	27.3004 \pm 0.25 χ	78.17 \pm 0.19 δ	79.6043 \pm 0.18
3	5.3532 \pm 0.34 ε	18.2026 \pm 0.42 ϕ	46.752 \pm 0.30 γ	73.1791 \pm 0.25 η	70.6853 \pm 0.36
4	1.2675 \pm 0.09 ι	20.9354 \pm 0.9 ϑ	62.4512 \pm 0.21 λ	70.723 \pm 0.28 μ	68.0311 \pm 0.33
5	4.5651 \pm 0.89 ν	17.4953 \pm 0.42 Ω	44.983 \pm 0.51 π	69.6013 \pm 0.27 θ	66.62 \pm 0.40
6	-18.7906 \pm 0.97	-5.3933 \pm 0.03 ρ	26.6786 \pm 3.35 σ	69.3085 \pm 0.21 τ	72.0395 \pm 0.26 τ
7	-5.9644 \pm 0.38 υ	2.3820 \pm 0.28 ω	20.659 \pm 0.31 ψ	45.2192 \pm 0.36 ζ	58.3245 \pm .40
8	-17.3016 \pm 0.41 Δ	6.0422 \pm 0.10 Σ	35.7294 \pm 0.26 ξ	62.6871 \pm 0.21 Υ	70.2713 \pm 0.28

Se calculó la IC₅₀ con base en el porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado. La fracción 4 presentó una mayor actividad citotóxica con una IC₅₀ de 46.95 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la fracción 7 fue la que presentó una menor actividad citotóxica con una IC₅₀ de 218.41 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 7), el taxol presentó una IC₅₀ de 3.53 μM .



Gráfica 7, Muestra la IC₅₀ de cada una de las fracciones de Exp2-ExtCHCl₃-lavado obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, en la línea celular K562, ★ , p< 0.05, vs ★ , ★ y fracción 7. ★ , p< 0.05 vs ★ y fracción 7. ★ , p< 0.05 vs fracción 7.

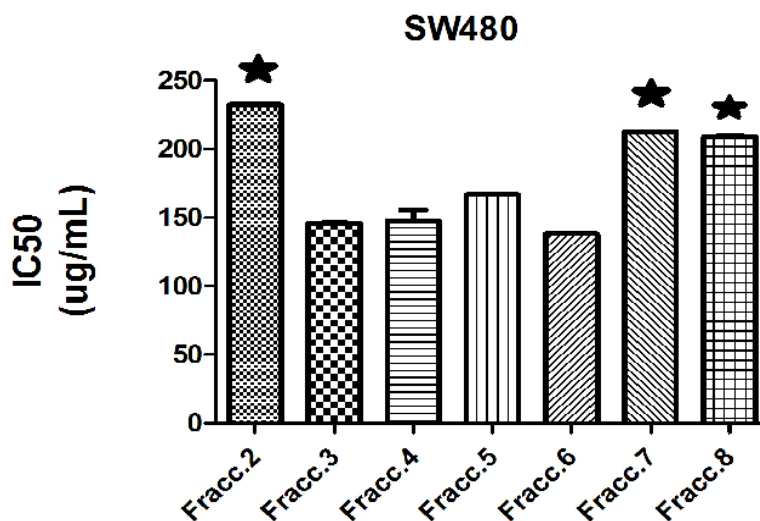
7.3.2.2.3. Línea celular SW480

En la línea celular SW480 los porcentajes de inhibición de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, mostraron que las fracciones 3, 5 y 8 (7.1432 ± 0.10 %, 3.8682 ± 0.09 % y 1.8119 ± 0.19 %) presentaron una actividad citotóxica a una concentración de 10 μ g/mL contrario a las demás fracciones. Las fracciones 3 y 4 presentaron una mayor actividad citotóxica a una concentración de 250 μ g/mL con un porcentaje de inhibición de 78.3037 ± 0.04 % y 78.6816 ± 0.14 % respectivamente, comparadas con las demás fracciones (tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de inhibición en la línea celular SW480 de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado. El análisis estadístico se realizó con p< 0.05. . Fracción 2: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\beta \neq \chi \neq \delta \neq 250 \mu\text{g/mL}$ Fracción 3: $\varepsilon \neq \phi \neq \gamma \neq \eta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 4: $\iota \neq \vartheta \neq 100 \mu\text{g/mL}$. Fracción 5: $\lambda \neq \mu \neq \nu \neq \Omega \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 6: $\pi \neq \theta \neq \rho \neq \sigma \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 7: no se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones. Fracción 8: $\tau \neq \upsilon \neq \varpi \neq \psi \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Concentración $\mu\text{g/mL}$					
Fracción	1	10	100	200	250
2	-17.5065 \pm 0.12 α	-1.9084 \pm 0.12 β	-3.0441 \pm 0.20 χ	43.3124 \pm 0.11 δ	53.5551 \pm 0.73
3	-12.5545 \pm 0.09 ε	7.4132 \pm 0.10 ϕ	33.2809 \pm 3.40 γ	64.9823 \pm 0.08 η	78.3037 \pm 0.04
4	-2.9431 \pm 9.56 ι	1.0093 \pm 9.14 ι	32.9759 \pm 6.04	71.6228 \pm 2.34 ϑ	75.9873 \pm 1.939
5	-5.9573 \pm 0.09 λ	3.8682 \pm 0.09 μ	34.3184 \pm 0.15 ν	57.0617 \pm 0.08 Ω	68.4898 \pm 0.09
6	-13.8541 \pm 0.16 π	-5.2138 \pm 0.15 θ	35.7314 \pm 0.12 ρ	73.195 \pm 0.05 σ	78.6816 \pm 0.14
7	-7.5468 \pm 3.73	-2.6978 \pm 1.23	3.2985 \pm 3.19	14.8571 \pm 14.83	44.8406 \pm 22.41
8	-6.0966 \pm 0.18 τ	1.8119 \pm 0.19 υ	10.6797 \pm 0.18 ϖ	46.8819 \pm 0.15 ψ	66.8075 \pm 0.09

Los porcentajes de inhibición de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, fueron utilizados para determinar la IC₅₀ de cada fracción en la línea celular SW480. Se observó que las fracciones 3-6 presentan una actividad citotóxica similar con una IC₅₀ de 138 $\mu\text{g/mL}$ a 166.8 $\mu\text{g/mL}$, la diferencia de las fracciones 2,7 y 8 las cuales presentaron una menor actividad citotóxica de 208.9 $\mu\text{g/mL}$ a 232.42 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 8), el taxol presentó una IC₅₀ de 9.84 μM .



Gráfica 8, Muestra la IC₅₀ de cada una de las fracciones obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, en la línea celular SW480, ★ , p < 0.05 vs fracción 3,4,5 y 6.

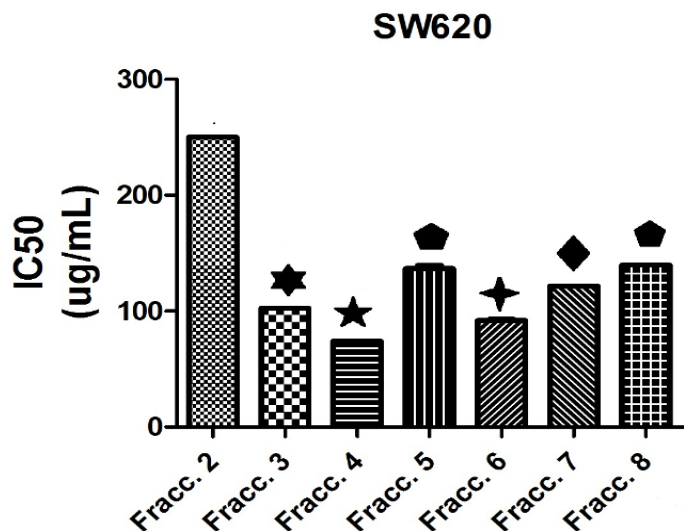
7.3.2.2.4. Línea celular SW620

El porcentaje de inhibición de cada fracción del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, permitió determinar que la fracción 4 tuvo una actividad citotóxica desde la concentración de 10 µg/mL con 14.3072 ± 0.03 % a diferencia del resto de las fracciones las cuales presentaron actividad citotóxica a mayores concentraciones. La fracción 3 y 6 presentaron la mayor actividad citotóxica a concentraciones de 250 µg/m, 81.7911 ± 0.03 % y 82.7736 ± 0.01 % respectivamente (tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de inhibición en la línea celular de SW620 de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, el control negativo no presentó inhibición. El análisis estadístico se realizó con $p < 0.05$.
 . Fracción 2: $\alpha \neq$ (diferente significativamente) $\beta \neq \chi \neq \delta \neq 250 \mu\text{g/mL}$ Fracción 3: $\varepsilon \neq \phi \neq \gamma \neq \eta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 4: $\iota \neq \vartheta \neq \lambda \neq \mu \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 5: $\nu \neq \Omega \neq \pi \neq \theta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 6: $\rho \neq \sigma \neq \tau \neq \upsilon \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 7: $\varpi \neq \psi \neq \zeta \neq \Delta \neq 250 \mu\text{g/mL}$. Fracción 8: $\Sigma \neq \text{£} \neq \text{¥} \neq \text{€} \neq 250 \mu\text{g/mL}$.

Concentración $\mu\text{g/mL}$					
Fracción	1	10	100	200	250
2	-16.1523 \pm 0.03 α	-19.8526 \pm 0.03 β	10.7676 \pm 0.02 χ	35.4628 \pm 0.02 δ	37.3245 \pm 0.008
3	-23.4066 \pm 0.04 ε	-1.5809 \pm 0.005 ϕ	49.2488 \pm 0.01 γ	76.1883 \pm 0.01 η	81.7911 \pm 0.03
4	-9.8596 \pm 0.03 ι	14.3072 \pm 0.03 ϑ	60.2372 \pm 0.12 λ	77.4518 \pm 0.17 μ	79.9514 \pm 0.04
5	-25.016 \pm 0.02 ν	-7.1000 \pm 0.005 Ω	43.7863 \pm 0.01 π	61.4289 \pm 0.01 θ	70.711 \pm 0.02
6	-21.7341 \pm 0.002 ρ	-10.5495 \pm 0.009 σ	51.811 \pm 0.32 τ	75.9583 \pm 0.01 υ	82.7736 \pm 0.01
7	-7.8108 \pm 0.01 ϖ	-4.8423 \pm 0.004 ψ	43.638 \pm 0.01 ζ	70.8155 \pm 0.02 Δ	77.7817 \pm 0.05
8	-29.2602 \pm 0.04 Σ	-4.0061 \pm 0.03 £	39.1223 \pm 0.03 ¥	65.1918 \pm 0.02 €	71.9651 \pm 0.02

Se calculó la IC₅₀ de cada una de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado mediante el porcentaje de inhibición. La fracción 4 presentó una IC₅₀ de 74.20 $\mu\text{g/mL}$, siendo esta la fracción con mayor actividad citotóxica, contrario a la fracción 2, la cual presentó una menor actividad citotóxica con una IC₅₀ de 250 $\mu\text{g/mL}$ (grafica 9), el taxol presento una IC₅₀ de 19.86 μM .



Gráfica 9, Muestra la IC50 de cada una de las fracciones obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, en la línea celular Sw480, ★, p< 0.05 vs ◆, ◆, ◆ y fracción 2. ◆, p< 0.05 vs ◆, ◆, ◆ y fracción 2. ◆, p< 0.05 vs ◆, ◆ y fracción 2. ◆, p< 0.05 vs ◆ y fracción 2. ◆, p< 0.05 vs fracción 2.

7.3.2.3. Observación de citotóxicidad

Las observaciones de la celular de las líneas HeLa, K562, SW480 y SW620 se realizaron en un microscopio invertido en cada una de las concentraciones en del experimento 1 y de las fracciones del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado del experimento 2. Se tomaron fotografías de la exposición de las fracciones extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado en la línea celular HeLa a una concentración de 200 µg/mL, con la ayuda de una cámara digital adaptada (imagen 1).

El cultivo celular expuesto a la fracción 3 presentó abundante precipitado en todo el cultivo, el precipitado es similar a la arena fina; en la exposición de las células a la fracción 4, se observó precipitación en la mayor parte del cultivo celular con una apariencia de arena de mayor grosor a comparación de la fracción 3, pese a ello se logran observar algunas células que perdieron su forma. En los cultivos expuestos a las fracciones 6, 7 y 8 el precipitado se encuentra condensado en algunas partes del cultivo por lo que se logran observar que las células no han perdido su forma.

Las células expuestas a la fracción 2 presentaron un efecto de encogimiento citoplasmático con aparente condensación de la cromatina, una especie de burbujeo celular conocido como “bebbling” y en comparación con el control negativo las células perdieron su aspecto poligonal, lo cual sugiere que las células tienen una probable muerte celular del tipo apoptótica⁶⁰.

La fracción 5 mostró una precipitación en el cultivo por parte de los compuestos de la fracción, a pesar de ello se observó que las células presentan una muerte por necrosis ya que se observa en la fotografía que la membrana ha perdido la integridad celular, aumentando su citoplasma y estando a punto de estallar liberando su contenido.

En cuanto al control positivo (taxol), se observan que las células del cultivo adquirieron una forma redonda y con presencia de “blebbling”, lo cual sugiere muerte por apoptosis⁶⁰.

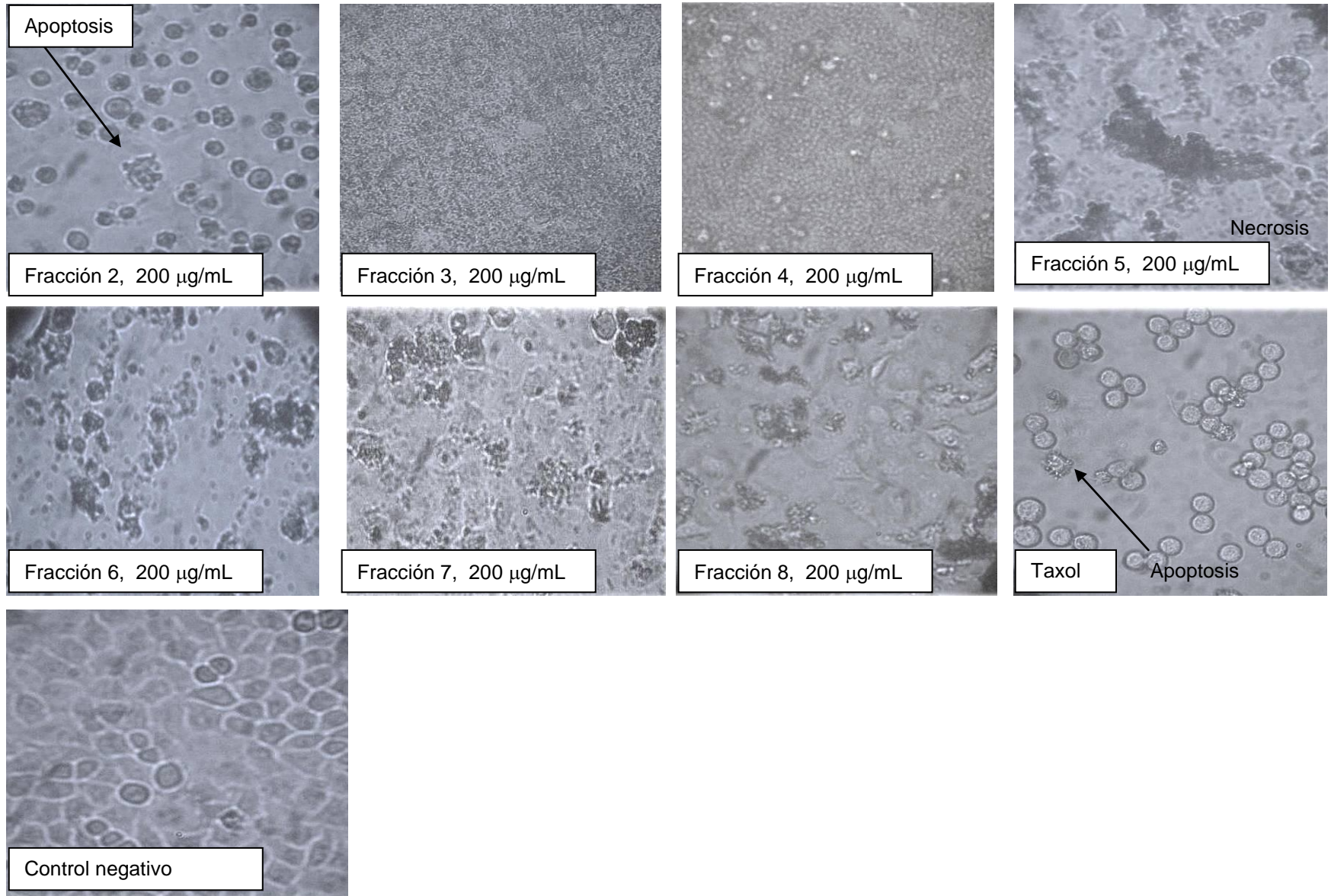


Imagen 1. Fotografías tomadas en microscopio compuesto en un aumento de 40x, de la línea celular HeLa a concentraciones de 200 µg/mL y 250 µg/mL.

De los resultados obtenidos al exponer las fracciones obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado a las líneas celulares de HeLa, K563 y SW620. La fracción 4 muestra una mayor actividad de 116.75 µg/mL, 46.95 µg/mL y 74.20 µg/mL respectivamente, dicha fracción se encuentra compuesta mayoritariamente por ácidos alifáticos y sus derivados (tabla 2). La actividad citotóxica de los compuestos encontrados en la fracción 4 es posible, ya que otras especies del género *Aristolochia* presentan actividad citotóxica en compuestos diferentes a los ácidos aristolóquicos y aristolactamas, principalmente los diterpenos aislados de *A. rodriguensii* y *A. triangularis* los cuales presentan actividad citotóxica en líneas celulares de próstata, colon y mama ⁴⁸ y licarina B aislado de *A. taliscana* el cual presenta actividad citotóxica contra la leucemia HL60 ⁵².

La fracción 7 presenta probablemente ácidos aristolóquicos por su fluorescencia en la luz UV en cromatografía de placa fina (Rf= 0.30), dicha fracción presenta una baja actividad citotóxica en las líneas celulares de HeLa, K562 y SW480, estos resultados son semejantes a los obtenidos en el experimento 1, lo cual nos indicaría que los ácidos aristolóquicos, extraídos por diferentes métodos, poseen una actividad citotóxica menor que los demás extractos y fracciones. Sin embargo, la fracción 7 presentó una mayor actividad citotóxica comparado con los resultados anteriores en la línea celular SW620, lo cual puede deberse a la susceptibilidad del cultivo celular a los compuestos presentes en dicha fracción, que podrían estar actuando de manera sinérgica.

Las fotografías obtenidas en la línea celular de HeLa al exponer las fracciones, no muestran claramente la actividad citotóxica de las fracciones 4 y 7 a una concentración de 200 µg/mL, debido a una precipitación de los compuestos presentes. Dealle, F. y colaboradores mencionan que el ácido aristolóquico lleva a la célula a muerte por apoptosis ²⁹. Las fotografías de las fracciones 2 y 5 mostraron muerte celular por apoptosis y necrosis respectivamente, por lo que ambos mecanismos podrían estar implicados en los extractos que mostraron una importante actividad citotóxica.

8. Conclusión

En el estudio biodirigido para determinar la presencia de compuestos citotóxicos en la planta identificada como *Aristolochia grandiflora* Sw., en las líneas celulares de HeLa, K562, SW480 y SW620 se concluye que:

Experimento 1. De las fracciones Exp1-ExtCHCl₃, Exp1-ExtAcOEt y Exp-ExtHex, la fracción Exp1-ExtHex presentó una mayor actividad citotóxica en las cuatro líneas celulares, esta fracción está constituida por compuestos poco polares: aristolactamas, terpenos y posiblemente ésteres de ácidos alifáticos. La fracción Exp1-AcOEt presentó poca actividad citotóxica en las líneas celulares HeLa, SW480 y SW620, mientras que la fracción Exp1-CHCl₃ presentó una menor actividad citotóxica en las cuatro líneas celulares, pese a que dicha fracción es en la que se reporta que se encuentran presentes los ácidos aristolóquicos.

Experimento 2. El extracto Exp2-ExtCrudoTotal presentó una mayor actividad citotóxica en la línea celular de HeLa, mientras que la actividad citotóxica en las líneas celulares K562, SW480 y SW620 es menos activa pero similar a la obtenida en la fracción Exp1-CHCl₃ y Exp1-AcOEt en la línea celular K562.

De las fracciones 2-8 obtenidas del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado, la fracción 4 fue la que presentó una mayor actividad citotóxica, en esta fracción están presentes 14 componentes, mayoritariamente ésteres de ácidos alifáticos, identificados por su peso molecular en un espectro de masas, de éstos sólo 6 son consistentes a los reportes encontrados con respecto a la planta estudiada, por lo que un análisis químico más detallado de los extractos permitiría su purificación y con ello el aislamiento de compuestos puros y la determinación de su actividad citotóxica; no se determinó la presencia de aristolactamas en dicha fracción.

La fracción 7 en la que posiblemente se encuentran los ácidos aristolóquicos, reportados como compuestos citotóxicos tiene poca actividad, comparada con la fracción 4, debido a esto la fracción 7 no fue purificada.

La inhibición de la proliferación celular mostrada en los extractos con actividad citotóxica, importante, puede deberse a la muerte por apoptosis como se observó en la fracción 2, así como necrosis que se observó en la fracción 5, ambas fracciones pertenecientes al extracto Exp-CHCl₃-lavado.

Con los resultados obtenidos en esta tesis, se concluye que la planta identificada como *Aristolochia grandiflora* Sw., recolectada en Fortín de las Flores, Ver., presentó compuestos con actividad citotóxica entre los que se encuentran los ácidos aristolóquicos, además otros compuestos los cuales se pueden extraer con disolventes poco polares, por lo que se sugieren estudios posteriores que permitan conocer mejor los compuestos presentes en las plantas pertenecientes a este taxón y su actividad citotóxica.

9. Apéndices

9.1. Uso tradicional de especies del genero *Aristolochia*.

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
<i>Aristolochia acutifolia</i>	Erisipela		Toda la planta	38
<i>Aristolochia albida</i>	Cólicos		Rizoma	44
	Insecticida			44
	Mordedura de víboras venenosas		Rizoma	44
<i>Aristolochia arborencis</i>	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
<i>Aristolochia argentina</i>	Antiséptico		Parte aérea	44
	Artritis		Parte aérea	44
	Diaforético		Parte aérea	44
	Diurético		Parte aérea	44
	Emenagogo		Parte aérea	44
	Envenenamiento		Parte aérea	44
<i>Aristolochia baetica</i>	Antitumoral		Raíz	48
	Emenagogo		Raíz	44
<i>Aristolochia barbata</i>	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
<i>Aristolochia birostris</i>	Antitumoral		Raíz	44
<i>Aristolochia bracteata</i>	Emenagogo		Parte aérea	44
	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
<i>Aristolochia brevipes</i>	Artritis		Rizoma	44
	Dolor de muelas		Rizoma	44
	Heridas		Rizoma	44
	Mordedura de víboras venenosas		Rizoma	44
<i>Aristolochia chammissonis</i>	Debilidad		Toda la planta	44
<i>Aristolochia chilensis</i>	Emenagogo		Raíz	44
<i>Aristolochia cinnabarina</i>	Analgésico		Raíz	44
<i>Aristolochia clematitis</i>	Antitumoral		Raíz	44
	Estimula el sistema inmune			62
<i>Aristolochia constricta</i>	Analgésico		Parte aérea	44
	Antiespasmódico		Parte aérea	44
	Antiinflamatorio		Parte aérea	44
	Antimalarico		Parte aérea	44
	Antitumoral		Parte aérea	44

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
	Emenagogo		Parte aérea	44
	Mordedura de víboras venenosas		Parte aérea	44
<i>Aristolochia contorta</i>	Antitumoral		Raíz	44
	Dolor abdominal		Raíz	62
<i>Aristolochia cucurbitifolia</i>	Anodino		Frutos y Raíz	44
	Antiasmático		Fruto, Raíz	37
	Antiflogístico			44
	Antiinflamatorio		Fruto, Raíz	44
	Expectorante		Frutos y Raíz	44
	Mordedura de víboras venenosas		Fruto, Raíz	44
<i>Aristolochia debilis</i>	Insectos venenosos		Raíz	62
	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
	Problemas bronquiales		Fruto, Raíz	44
<i>Aristolochia fangchi</i>	Analgésico			62
	Diurético			62
<i>Aristolochia foetida</i>	Antiblenorrágico		Raíz	21
	Antidiarreico	Oral	Raíz	21
	Antidisentérico	Oral	Raíz	21
	Antiséptico	Local	Raíz	21
	Cólera		Raíz	20
	Detersivo		Raíz	20
	Metrorragias		Raíz	20
	Vulnerario		Hoja	20
<i>Aristolochia fragrantissima</i>	Alexitere	Local, Oral	Raíz, Tallo	20
	Analgésico	Local	Raíz, Tallo	20
	Antiblenorrágico	Local	Tallo	20
	Antidisentérico	Local	Raíz, Tallo	20
	Antiespasmódico	Oral	Tallo	20
	Antirreumático	Local	Raíz, Tallo	20
	Antiséptico	Local	Raíz, Tallo	20
	Astringente	Local	Tallo	20
	Diaforético	Local	Raíz, Tallo	20
	Emenagogo	Local	Raíz, Tallo	20
	Oftalmia purulenta		Tallo	20
	Vaginitis	Local	Tallo	20

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
<i>Aristolochia gibertii</i>	Antiinflamatorio		Toda la planta	44
	Dolor de estomago		Toda la planta	44
<i>Aristolochia gigantea</i>	Abortivo		Toda la planta	44
	Antiséptico		Toda la planta	44
	Emenagogo		Toda la planta	44
	Enfermedades de la piel		Toda la planta	44
	Heridas		Toda la planta	44
<i>Aristolochia grandiflora</i>	Abortiva			19
	Abscesos	Local	Raíz	21
	Acaricida	Oral	Tallo	20
	Alexíttere	Oral	Raíz	20
	Analgésico		Raíz	21
	Antiasmática			19
	Antiblenorrágico	Local	Tallo	19
	Antidepresiva			19
	Antidisentérico	Oral	Raíz	21
	Antimalárica			19
	Antimicrobiano			44
	Antipirético			21
	Antirreumático	Local		21
	Antitumoral	Local	Raíz	21
	Antitusígeno			21
	Astringente	Local	Tallo	20
	Cálculos de la vesícula			21
	Cálculos renales			21
	Carminativo			21
	Catártico			21
	Cefalalgias			21
	Corroborante			21
	Detener la menstruación			19
	Diurético			21
	Emenagogo	Oral	Raíz	20
	Enfermedades de los ojos			21
	Enfermedades hepáticas			19
	Estimulante	Oral	Tallo	20

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
<i>Aristolochia grandiflora</i>	Eupéptico	Oral	Raíz	21
	Expectorante			21
	Expele el frío			21
	Fiebre amarilla			19
	Flujo			21
	Oftalmia purulenta	Local	Tallo	20
	Rabia			19
	Repelente de mosca y gusano		Partes aéreas	44
	Sífilis			19
	Sordera			21
	Tétanos			19
	Tónico			21
	Uterotónico			44
	Vaginitis	Local	Tallo	20
	Vesicante		Jugo	20
<i>Aristolochia heterophylla</i>	Analgésico		Fruto, Raíz	44
	Antitusivo		Fruto, Raíz	44
	Asma		Fruto, Raíz	44
	Expectorante		Fruto, Raíz	44
	Mordedura de serpiente		Fruto, Raíz	36
<i>Aristolochia impudica</i>	Cólicos			63
	Dolor de corazón			63
	Latido en la barriga			63
	Mareo			63
<i>Aristolochia indica</i>	Abortivo			44
	Antiinflamatorio		Raíz	44
	Diurético		Raíz	44
	Emenagogo			44
	Lombrices intestinales			44
<i>Aristolochia indica</i>	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
	Ponzoña de insectos			61
	Sedante		Raíz	44
	Tónico cardiaco		Raíz	44

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
<i>Aristolochia kaempferi</i>	Antibacterial		Toda la planta	44
	Antídoto		Planta entera	44
	Emético		Toda la planta	44
	Expectorante		Toda la planta	44
	Hipotensor		Toda la planta	44
	Tos		Toda la planta	44
<i>Aristolochia kankauensis</i>	Analgésico		Fruto, Raíz	44
	Antiasmático		Fruto, Raíz	36
	Antitusivo		Fruto, Raíz	36
	Expectorante		Fruto, Raíz	44
<i>Aristolochia liukinensis</i>	Anodino		Raíz	44
	Antiflogístico		Raíz	44
<i>Aristolochia longa</i>	Antitumoral		Toda la planta	44
	Esclerosis		Toda la planta	44
	Estimulante	Oral	Raíz	20
	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
<i>Aristolochia macroura</i>	Abortivo		Toda la planta	44
	Antiinflamatorio		Toda la planta	44
	Antiséptico		Toda la planta	44
	Estimula la circulación		Toda la planta	44
	Mordedura de víboras venenosas		Toda la planta	44
	Reumatismo		Toda la planta	44
<i>Aristolochia manshuriensis</i>	Diurético			62
	Presión alta		Toda la planta	44
	Problemas bronquiales		Toda la planta	44
<i>Aristolochia maurorum</i>	Antiséptico		Raíz	44
	Cicatrización		Raíz	44
	Roña de ovejas		Raíz	44
<i>Aristolochia maxima</i>	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
	Profilaxis del cólera	Oral		20
<i>Aristolochia mexicana</i>	Alexíttere	Local	Planta entera	20
	Anticrotalico	Local		21
	Antiespasmódico	Oral	Raíz	21
	Antisifilico		Hoja, Jugo	20

Espece	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
	Carminativo			21
	Contra el aire	Oral		21
	Diaforético			21
	Emenagogo		Hoja, Jugo	20
	Estimulante	Local		21
	Punzada	Oral		21
<i>Aristolochia micrantha</i>	Emenagogo	Oral	Raíz	21
	Estornutatorio	Local		21
<i>Aristolochia microphyla</i>	Antiblenorrágico		Raíz	21
	Antidiarreico	Oral	Raíz	20
	Antidisentérico	Oral	Raíz	21
	Antiséptico	Local	Raíz	21
	Metrorragias		Raíz	21
<i>Aristolochia mollissima</i>	Analgésico		Fruto, Raíz	44
	Antiinflamatorio		Fruto, Raíz	36
	Antimalárico		Fruto, Raíz	44
	Antitumoral		Fruto, Raíz	44
	Dolor abdominal		Fruto, Raíz	44
	Dolor de estómago		Fruto, Raíz	44
	Presión alta		Fruto, Raíz	44
	Problemas bronquiales		Fruto, Raíz	44
	Reumatismo		Fruto, Raíz	44
<i>Aristolochia odoratissima</i>	Alexítete	Oral	Raíz, Tallo	20
	Antiblenorrágico	Local	Tallo	20
	Antiespasmódico	Oral	Raíz	20
	Antineurálgico	Local	Hoja	20
	Antipirético	Oral	Raíz	20
	Antisifilico	Local	Hoja	20
	Antitumoral	Local	Jugo	20
	Astringente			21
	Diaforético	Oral	Raíz	20
	Diurético			21
	Estimulante	Oral	Raíz	20
	Refrescante	Oral	Raíz	20
	Tónico	Oral	Raíz	20

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
	Vaginitis	Local	Raíz, Tallo	20
<i>Aristolochia ovalifolia Duch.</i>	Mordedura de víboras venenosas		Tallo	63
<i>Aristolochia paucinervis</i>	Dolor abdominal		Toda la planta	44
	Enfermedades de la piel		Rizoma	44
	Gangrena gaseosa		Toda la planta	44
	Infecciones del tracto respiratorio		Toda la planta	44
	<i>Aristolochia pentandra</i>	Antipirético		
	Antipodágrico			21
	Antirreumático			21
	Emenagogo			21
	Hemorroides		Frutos	62
	Presión alta		Fruto, Raíz	44
	Tónico			21
<i>Aristolochia pilosa</i>	Afrodisíaco	Parental	Planta entera	20
	Anticrotálico	Oral	Raíz	21
<i>Aristolochia pringlei. (sinonimia: Aristolochia longecaudata)</i>	Antitumoral			63
	Calma los dolores			63
	Cura las Petequias			63
	Destierra los fríos en las fiebres			63
	Fortalece el corazón, estómago y cerebro			63
	Limpia el empacho y el estómago			63
	Picadura de alacrán			64
<i>Aristolochia ringens</i>	Mordedura de víboras venenosas		Toda la planta	61
<i>Aristolochia rodriguessi</i>	Abortivo		Toda la planta	44
	Antiinflamatorio		Toda la planta	44
	Mordedura de víboras venenosas		Toda la planta	44
<i>Aristolochia rotunda</i>	Antitumoral		Toda la planta	44
	Depurativo		Toda la planta	44
	Estimulante	Oral	Raíz	20
<i>Aristolochia schippii</i>	Mordedura de víboras venenosas		Tallo	63
<i>Aristolochia serpentaria</i>	Alexitere		Raíz	20
	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	20
	Tónico	Oral	Raíz	20

Especie	Uso	Vía adms	Parte usada	Ref.
<i>Aristolochia subclausa</i>	Antiespasmódico		Raíz	20
	Emetocatártico	Parental	Planta entera	20
	Estimulante		Raíz	20
<i>Aristolochia theriaca</i>	Mordedura de víboras venenosas		Planta entera	61
<i>Aristolochia triangularis</i>	Abortivo		Corteza	44
	Antídoto		Corteza	44
	Anti fertilidad		Corteza	44
	Antiséptico		Corteza	44
	Diaforético		Corteza	44
	Diurético		Corteza	44
	Emenagogo		Corteza	44
	Problemas de la piel		Corteza	44
	Reumatismo		Corteza	44
<i>Aristolochia trilobata</i>	Antimicrobiano		Toda la planta	64
<i>Aristolochia tuberosa</i>	Dolor de garganta		Raíz	44
	Mordedura de víboras venenosas		Raíz	44
	Tuberculosis		Raíz	44
<i>Aristolochia uhdana</i>	Anti diarreico		Flor	20
	Anti disentérico		Flor	20
	Astringente	Local	Raíz	20
	Metrorragias		Flor	20
	Vulnerario		Hoja	20
<i>Aristolochia yunnanensis</i>	Dolores		Raíz	44
	Enfermedades gastrointestinales		Raíz	44
	Tricomaniasis		Raíz	44
<i>Aristolochia zollingerianaj</i>	Analgésico		Fruto, Raíz	44
	Antitusivo		Fruto, Raíz	44
	Asma		Fruto, Raíz	44
	Expectorante		Fruto, Raíz	44
	Mordedura de víboras venenosas		Fruto, Raíz	44

9.2. Distribución en México de *Aristolochia grandiflora*, de acuerdo a la información obtenida de los herbarios MEXU, FCME y ENCB.

Para determinar su distribución en México se examinó la colección del Herbario Nacional (MEXU), Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB) y el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FCME), encontrando ejemplares en los estados de:

-CHIAPAS: Acacoyahua, Sin colector 17628 (MEXU). **Ocosingo:** Ojo de Agua y la Herradura, G. Aguilar 325 (MEXU); Cascada de Misolha, Palenque, M. J. Huff (MEXU); Lacandona de Lacanhá-Chansayab, a 130 km al SE de Palenque por la carretera fronteriza hasta el cruce San Javier, después de 8 km hacia el O, S. Levy 337 (MEXU); Martínez 25498 (MEXU); 4 km al S de Ejido Benemerito de las Américas Camino a Flor de Cacao, E. Martínez 10753 (MEXU); 4 km al SE de Nuevo Guerrero camino a Boca de Cacntum, E. Martínez 16714 (MEXU); en la estación Chujul a la orilla del río La Cantún, E. Martínez, 14-25180 (MEXU); 200 m al O de Nuevo Guerrero, J. Calónico 23407 (MEXU); 4 km al SE de Nuevo Guerrero camino a Boca de Cacntum E. Martínez 16714 (MEXU); Orillas del río Lacanjá, 3 km al S del centro arqueológico Bonampak, J. Meave 13-1370 (MEXU); SO de Palenque 70 km, a lo largo de Jol Uk'um, D. E. Breedlove 47192 (ENCB). **Ostuacán.** 2 km de Ostuacán Pichucalco, R. J. Burnham 137 (MEXU); Pichucalco hacia el Carbón, E. Miranda 6642 (MEXU).

-OAXACA: Distrito de Mixe: En el camino a Santiago Tuxtla entrando por la Sabana, al N de Palomares, R. Torres 4642 (FCME, MEXU). **Minatitlán:** Al E de la laguna, sobre terracería a Uxpanapa. 3.8 km al E del poblado, T. Wendt 3434a (FCME). **Tuxtepec Oaxaca:** 300m al O de Sacrificios, M. Martínez 43 (MEXU). **Pochutla:** C. Conzatti 15/03/1905 (MEXU).

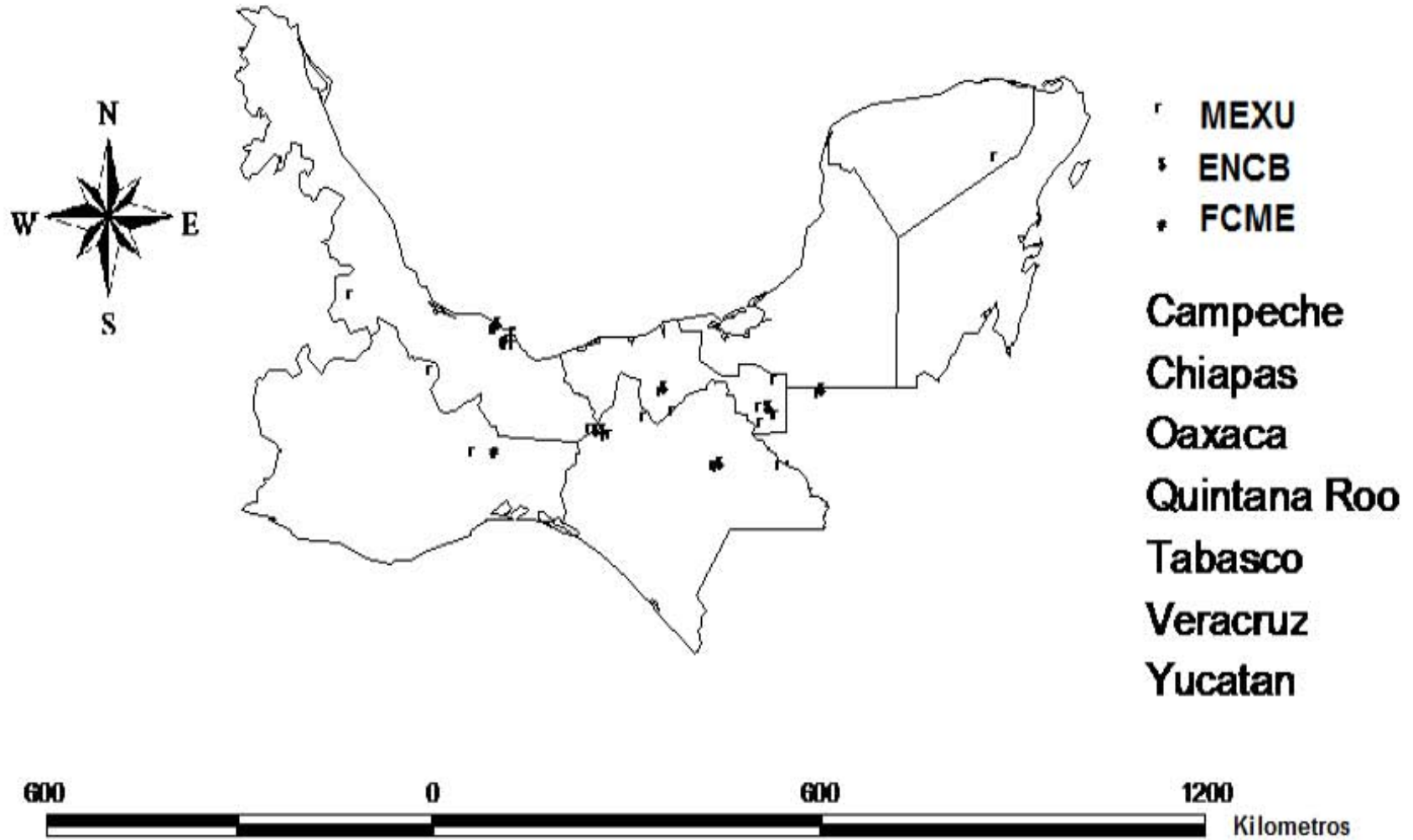
-TABASCO: Balancán: 5 km al S de Balancán, R. Fernández 1342, IIB42 (ENCB, MEXU). **Camoapan:** NO de Villahermosa A. Gómez Pompa 1279 (MEXU). **Huimanguillo:** En el río Pedregal, S. Zamudio 903 (ENCB, MEXU); 16- 23 km carretera

hacia la antena de microondas, entronque con la carretera estación Chontalpa-Malpaso, G. Ortiz 5163 (MEXU). **Macuspana:** Agua Blanca, F. Ventura 20947 (MEXU); M. Magaña 1212 (MEXU). **Tacotalpa:** Rancho Villaluz, A. Espejo 1489 (MEXU); 100 m al E de la entrada a Puyacatengo, C. Cowan (MEXU). **Teapa:** Grutas del Cocona de Teapa, G. Ramos 2695 (MEXU); Ladera N de las grutas de Cocona, L. Rico 734 (MEXU); G. Ramos 308 (MEXU); G. Ramos 2695 (MEXU); En el puente de Puyacatengo, M. Magaña 1014 (MEXU); 3 km al E de Teapa sobre el camino a Tecotalpa, R. Fernández 2215A (ENCB).

-VERACRUZ: **Amatlán de los Reyes:** 3 km al SE de la Patrona, F. Ramón FRF-202 (ENCB). **Catemaco:** Puente del poblado la Palma a 25 km al N de Catemaco, I. Calzada 3561 (MEXU); La Palma después de Sontecomapan, J. F Ortega 286 (MEXU); Alrededores de Playa Escondida, L. Tapia 182 (ENCB, MEXU); F. Vázquez 745 (MEXU). **Córdoba:** Chocamán, F. Salazar (MEXU). **Hidalgotitlán:** M. Neé 29721 (ENCB); Brecha Hermanos, Cedillo- La Escuadra, B. Vázquez 40460 (MEXU); 2 km al O del campamento hermanos Cedillo, B. Vázquez 1661 (MEXU). **Jesús Carranza:** Camino a Río Alegre, J. F. Ortega 325 (MEXU). **Minatitlán:** 8.2 km al N de la terracería La Laguna-Río Grande, sobre el camino nuevo a Ejido Belisario Domínguez, el cual sale de la terracería 14.6 km al E de Laguana; T. Wendt 2583 (MEXU). **San Andrés Tuxtla:** Tescaltitlán, M. Sousa 3041 (MEXU); Salto de Eyipantla, carretera Catemaco-San Andrés, R. Cedillo 3041 (MEXU); J. F Ortega 287 (MEXU); J. F Ortega 295 (MEXU); Tepalapan, J. F. Ortega 293 (MEXU); J. F. Ortega 306 (MEXU); Texcaltitlán, J. F. Ortega 294 (MEXU); Sinapán, J. F Ortega 308 (MEXU), Tepalapan camino a Sinapán, J. F. Ortega 306 (MEXU), Tescaltitlán, M. Sousa 2796 (MEXU). **San Felipe Usila:** Senda de Arroyo de Flor de San Pedro Tlatepusco, I. Calzada 16898 (MEXU). **Santiago Tuxtla:** Cilapa, F. Ventura 20711 (MEXU), **Sontecomapa:** La Palma, M. Sousa 2553 (MEXU).

-Yucatán, su distribución se encuentra en los municipios: **Valladolid:** sobre Yolcoba, J. J. Ortíz 496 (MEXU).

9.3. Mapa de distribución de *Aristolochia grandiflora* Sw., realizado con base en la colección de los herbarios MEXU, ENCB y FCME



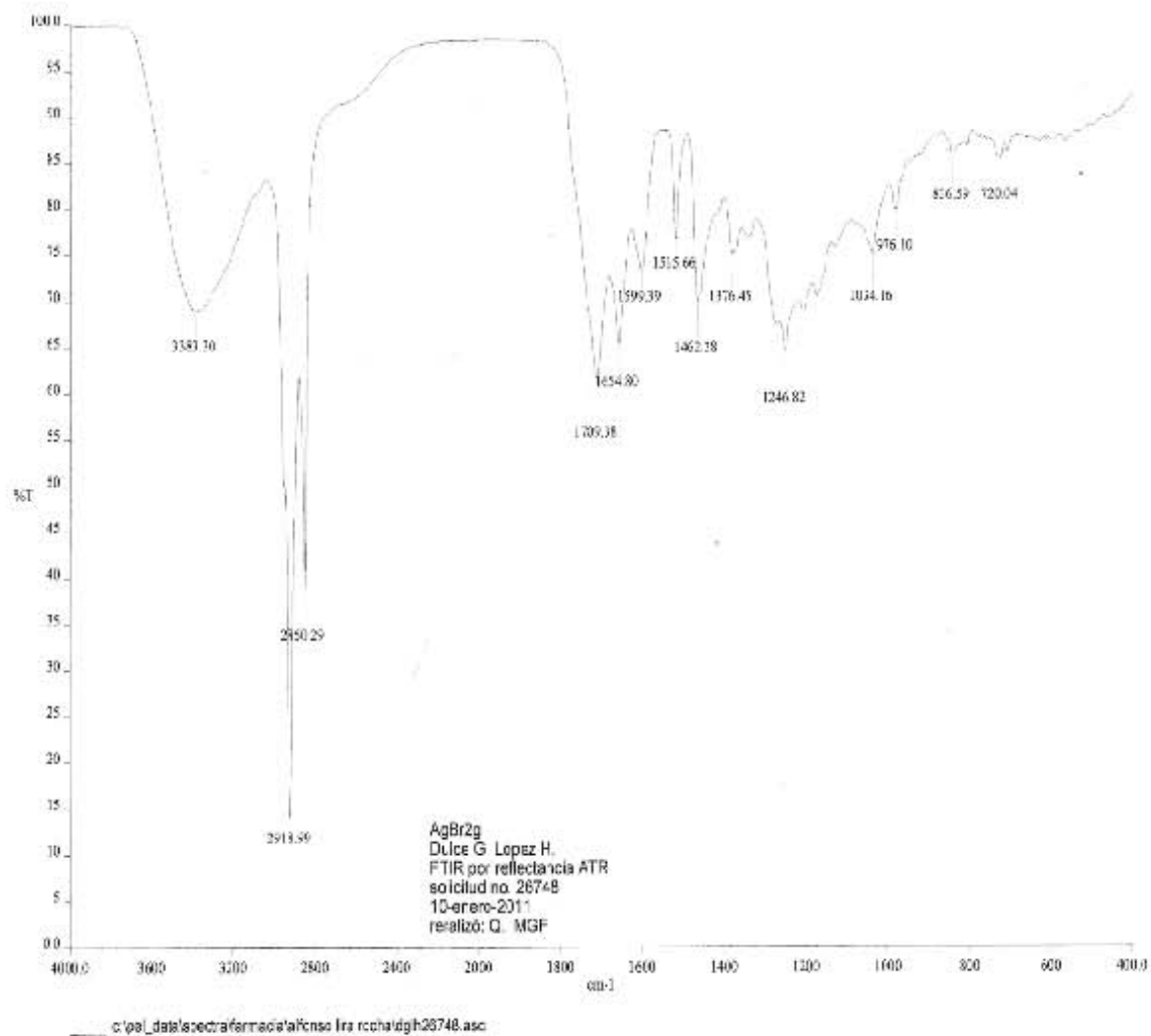
9.4. Ejemplares de *Aristolochia grandiflora*, consultados en los herbarios de MEXU, FCME y ENCB

Estado	Municipio	Localidad	Colector	Determinó	Fecha colecta	Núm. Colecta	Herbario
Chiapas	Acacoyagua				29/02/1948	17628	MEXU
	Ocosingo	Ojo de Agua y la Herradura	G. Aguilar			325	MEXU
	Ocosingo	Cascada de Misolha, por Palenque	M. J. Huff		08/10/1984		MEXU
	Ocosingo	Lacandona de Lacanhá-Chansayab, a 130 km al SE de Palenque por la carretera fronteriza hasta el cruce San Javier, después de 8 km hacia el O.	S. Levy	J. García	26/12/1994	337	MEXU
	Ocosingo	4 km al S de Ejido Benemérito de las Américas Camino a Flor de Cacao	E. Martínez	J. I. Calzada	18/02/1985	10753	MEXU
	Ocosingo	4 km al SE de Nuevo Guerrero camino a Boca de Cacatum	E. Martínez	E. Martínez	24/01/1986	16714	MEXU
	Ocosingo	En la estación Chujul a la orilla del río La Cantún	E. Martínez	L. Kelly	22/07/1984	14-25180	MEXU
	Ocosingo	200 m al O de Nuevo Guerrero	J. Calónico	A. Cruz	08/05/2002	23407	MEXU
	Ocosingo	4 km al SE de Nuevo Guerrero camino a Boca de Cacatum	E. Martínez	E. Martínez	24/01/1986	16714	MEXU
	Ocosingo	En la estación Chajul a la orilla del río	E. Martínez		27/10/1992	25498	MEXU
	Ocosingo	Orillas del río Lacanjá, 3 km al S del centro arqueológico Bonampack	J. Meave	J. Meave	28/08/1982	13-1370	MEXU
		2 km de Ostuacan Pichucalco	R. J. Burnham	F. Ramos	25/02/1984	137	MEXU
		Pichucaleo hacia el Carbón	E. Miranda	E. Miranda	25/08/1950	6642	MEXU
	Ocosingo	SO de Palenque 70 km, a lo largo de Jol Uk'um	D. E. Breedlove			47192	IPN
Oaxaca	Mixe	En el camino Santiago Tuxtla entrando por la Sabana, al N de Palomares	R. Torres	F. González	12/02/1984	4642	MEXU
	Mixe	En el camino a Santiago Tuxtla entrando por la Sabana, al N de Palomares	R. Torres	F. González	12/02/1984	4642	MEXU
	Tuxtepec Oaxaca	300 m al O de Sacrificios	M. Martínez	B. González	09/11/1962	43	MEXU
	Distrito de Mixe	En el camino a Santiago Tuxtla entrando por la Sabana, al N de Palomares	R. Torres	R. Torres	12/02/1984	4642	FCME

Estado	Municipio	Localidad	Colector	Determinó	Fecha colecta	Núm. Colecta	Herbario
Oaxaca	Minatitlán	Al E de la laguna, sobre terracería a Uxpanapa. 3.8 km al E del poblado	T. Wendt	T. Wendt	20/06/1982	3434A	IPN
	Pochutla		C. Conzatti	B. González	15/03/1905		MEXU
Tabasco	Balancán	5 Km al S de Balancán	R. Fernández	R. Fernández	04/04/1983	1342	MEXU
	Camoapan	NO de Villahermosa	A. Gomez Pompa		16/12/1965	1279	MEXU
	Huimanguillo	16- 23 km carretera hacia la antena de microondas, entronque con la carretera Estacuib Chontalpa-Malpaso	G. Ortiz		23/08/1997	5163	MEXU
	Huimanguillo	En el río pedregal	S. Zamudio	S. Zamudio	05/07/1983	903	MEXU
	Macuspana	Agua Blanca	F. Ventura	R. Fernández	17/02/1984	20947	MEXU
	Macuspana	Centro recreativo Agua Blanca	M. Magaña		17/02/1984	1212	MEXU
	Tacotalpa	Rancho Villaluz	A. Espejo	A. Espejo	20/02/1985	1489	MEXU
	Tacotalpa	100 m al E de la entrada a Puyacatengo	C. Cowan		18/11/1978		MEXU
	Teapa	Grutas del Cocona de Teapa	G. Ramos		18/11/1979	2695	MEXU
	Teapa	Ladera N de las grutas de Cocona	L. Rico	F. Ramos	14/02/1984	734	MEXU
	Teapa	Atrás de la entrada a las grutas de Cocona	G. Ramos	J. F. Ortega.	12/11/1979	308	MEXU
	Teapa	En el puente de Puyacatengo	M. Magaña		25/02/1983	1014	MEXU
	Balancán	5 km al S de Balancán, Palo Verde	R. Fernández	R. Fernández	04/03/1983	IIB42	ENCB
	Huimanguilli	En el río Pedregal	S. Zamudio	S. Zamudio	05/07/1983	903	ENCB, MEXU
	Teapa	3 km al E de Teapa sobre el camino a Tecotalpa	R. Fernández	R. Fernández	21/11/1989	2215A	ENCB
Veracruz	Catemaco	Puente del poblado I Palma a 25 km al N de Caemaco	I. Calzada	F. González		3561	MEXU
	Catemaco	La Palma despues de Sontecomapan	J. F Ortega	J. F. Ortega.	25/01/1982	286	MEXU
	Catemaco	Alrededores de Playa Escondida	L. Tapia	J. F. Ortega.	20/02/1983	182	MEXU
	Catemaco	Playa Escondida, alrededores	F. Vázquez	J. F. Ortega.	21/02/1983	745	MEXU
	Córdoba	Chocaman	F. Salazar	F. González	11/05/1912		MEXU
	Hidalgotitlán	Brecha Hermanos, Cedillo- la escuadra	B. Vázquez	F. González	27/02/1974	40460	MEXU
	Hidalgotitlán	2 km al O del capamento hermanos Cedillo	B. Vázquez	J. F. Ortega	13/01/1975	1661	MEXU
	Jesús Carranza	Camino a Rio Alegre	J. F Ortega	J. F. Ortega	05/10/1982	325	MEXU

Estado	Municipio	Localidad	Colector	Determinó	Fecha colecta	Núm. Colecta	Herbario
Veracruz	Minatitlán	8.2 km al N de la terracería La Laguna-Río Grande, sobre el camino nuevo a Ejido Belisario Domínguez, el cual sale de la terracería 14.6 km al E de Laguna	T. Wendt	J. F. Ortega	17/07/1980	2583	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Tescaltitlán	M. Sousa	F. González	15/09/1966	s.n.	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Salto de Eyipantla, carretera Catemaco-San Andrés	R. Cedillo	F. González	19/02/1985	3041	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Tepalapan	J. F. Ortega	J. F. Ortega	22/03/1982	293	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Salto de Eyipantla	J. F. Ortega	J. F. Ortega	26/01/1982	287	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Salto de Eyipantla	J. F. Ortega	J. F. Ortega	23/03/1982	295	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Tescaltitlán	J. F. Ortega	J. F. Ortega	22/03/1982	294	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Sinapán	J. F. Ortega	J. F. Ortega	26/06/1982	308	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Tepalapan camino a Sinapán	J. F. Ortega	J. F. Ortega	16/06/1982	306	MEXU
	San Andrés Tuxtla	Tescaltitlán	M. Sousa	J. F. Ortega	15/09/1966	2796	MEXU
	San Felipe Usila	Senda de Arroyo de Flor de San Pedro Tlatepusco	I. Calzada		02/05/1991	16898	MEXU
	Santiago Tuxtla	Cilapa	F. Ventura	R. Fernández	01/10/1983	20711	MEXU
	Sontecomapa	La Palma	M. Sousa	J. F. Ortega.	07/09/1965	2553	MEXU
			E. Lott		31/05/1981	32509	MEXU
	Amatlán de los Reyes	3 km al SE de la Patrona	F. Ramon	F. Ramón	19/03/1990	FRF-202	ENCB
	Catemaco	Alrededores de playa Escondida	L. Tapia	J. F. Ortega	20/02/1983	182	ENCB
	Huidalgotitlán		M. Nee		01/03/1984	29721	ENCB
		Región de los Tuxtlas, Calería	M. Sousa	J. F. Ortega.	22/01/1965	2029	MEXU
Yucatán	Valladolid	Yolcoba	J. J. Ortiz	B. González	22/06/1984	496	MEXU

9.5. Infrarrojo del extracto Exp1-ExtCHCl₃



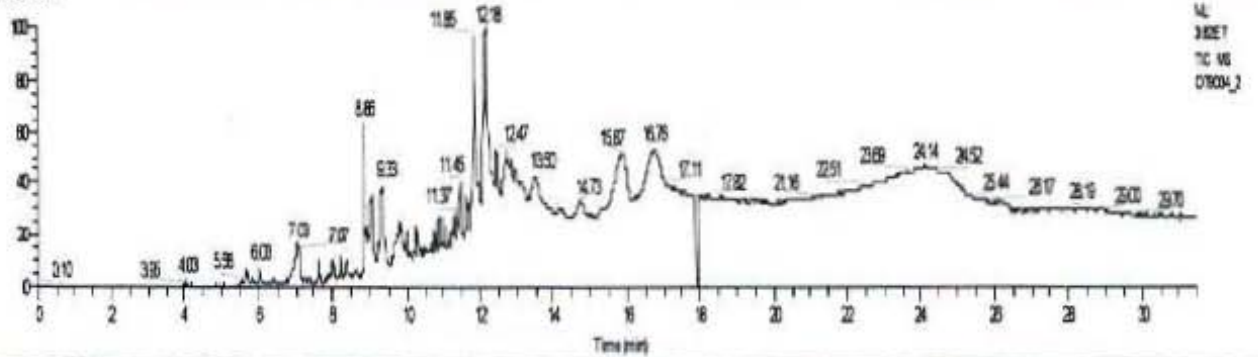
9.6. Espectro de masas del extracto Exp1-ExtHex

D:\calbur\data\USA\GOT\034_2
 OPERADOR: Margarita Guzman

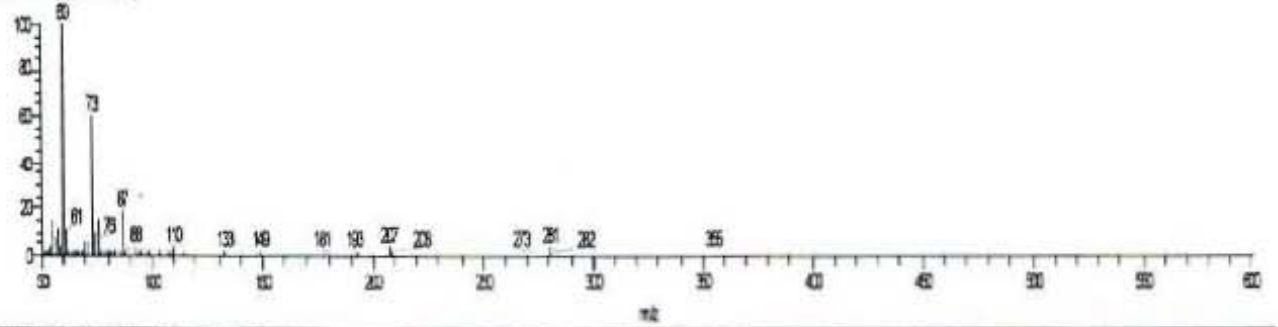
2/12/2013 1:30:03 PM

FOLG

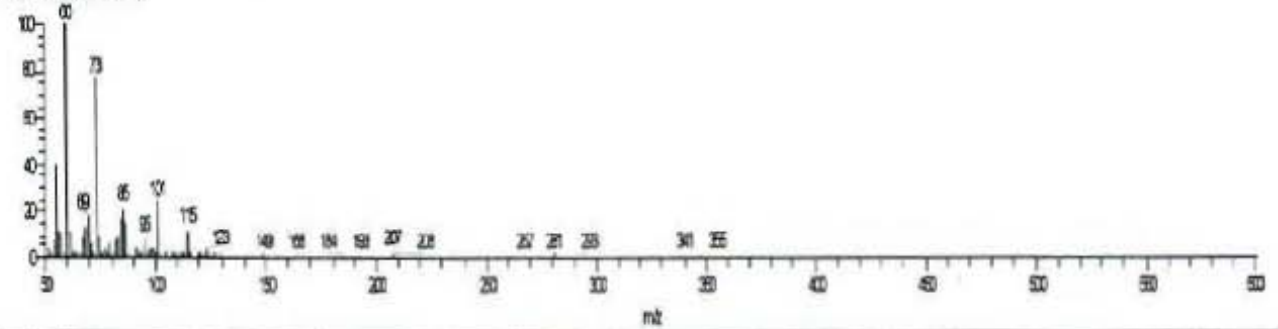
RT: 000-3191



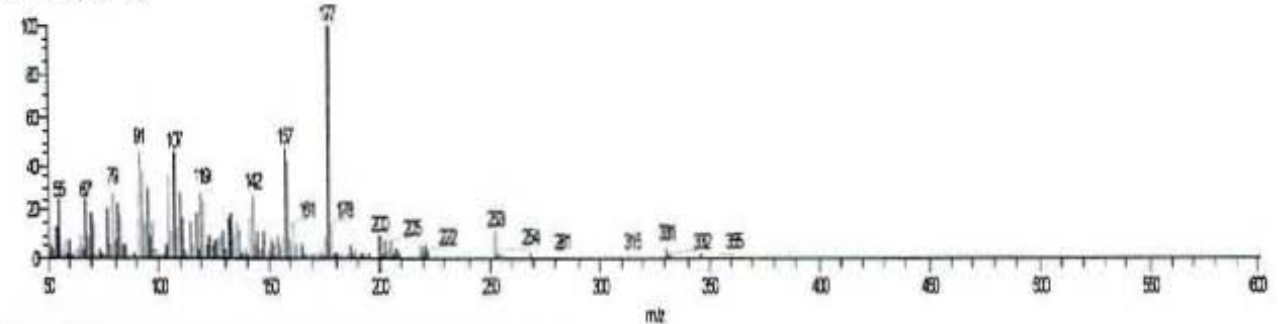
OT034_2 #34 RT: 6.67 Av: 1 NL: 10000
 T: +e\Fulms(4000000)



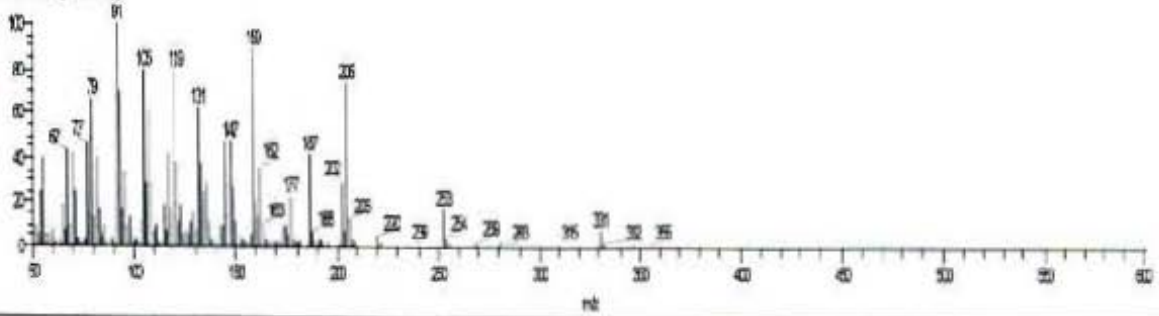
OT034_2 #48 RT: 8.62 Av: 1 NL: 10000
 T: +e\Fulms(4000000)



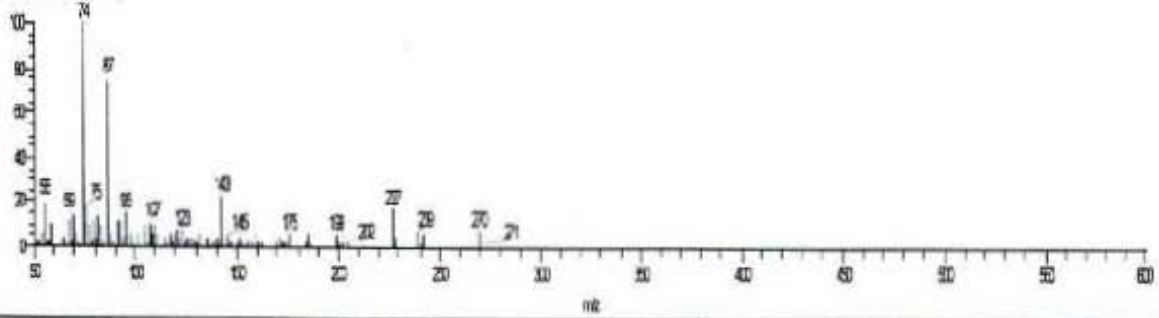
OT034_2 #50 RT: 11.01 Av: 1 NL: 10000
 T: +e\Fulms(4000000)



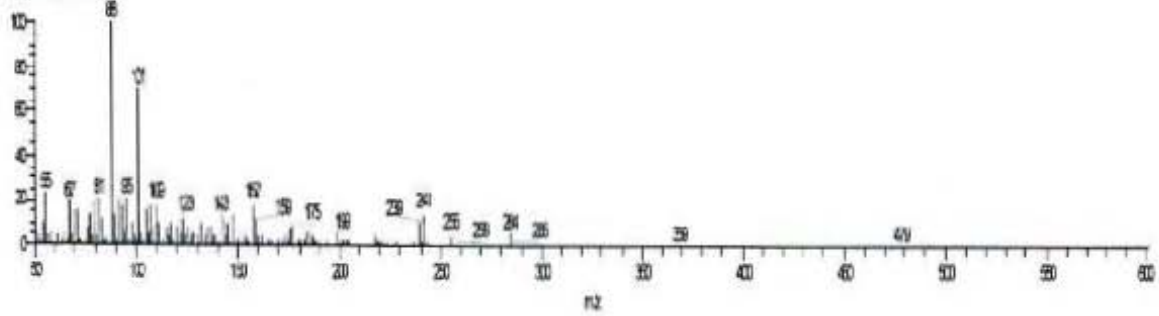
072612 #36 RT: 12.12 AV: 1 NL: 1494
T: +EFull.ms(453005)



072612 #77 RT: 15.65 AV: 1 SR: 37 NL: 1565
T: +EFull.ms(453005)



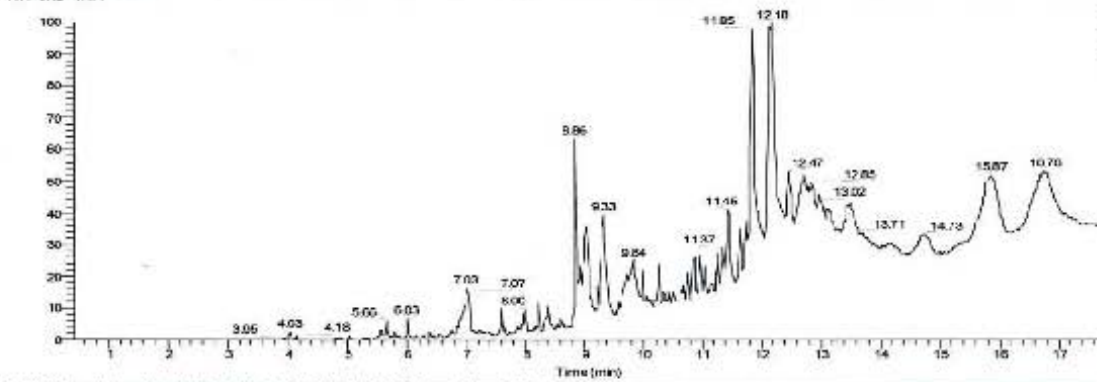
072612 #52 RT: 16.76 AV: 1 SR: 70 NL: 1625
T: +EFull.ms(453005)



D:\Calibru\GAWUSAR\OTR804_2
OPERADOR: Margarita Guzman
RT: 0.42-17.71

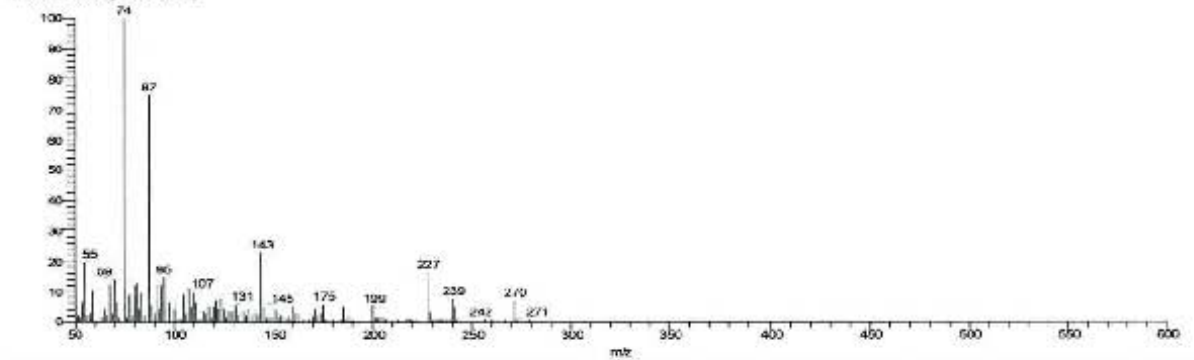
2/12/2013 1:00:00 PM

FOLIO

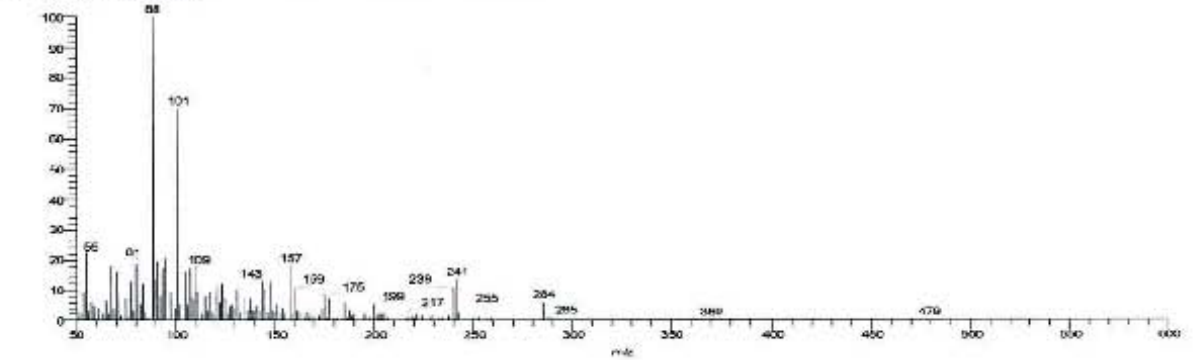


NL: 3.82E7
TK: MS
OTR804_2

OTR804_2 #777 RT: 15.83 AV: 1 SB: 367 15.86 27.11 NL: 1.00E5
T: +0.017 of ms (4930-90050)

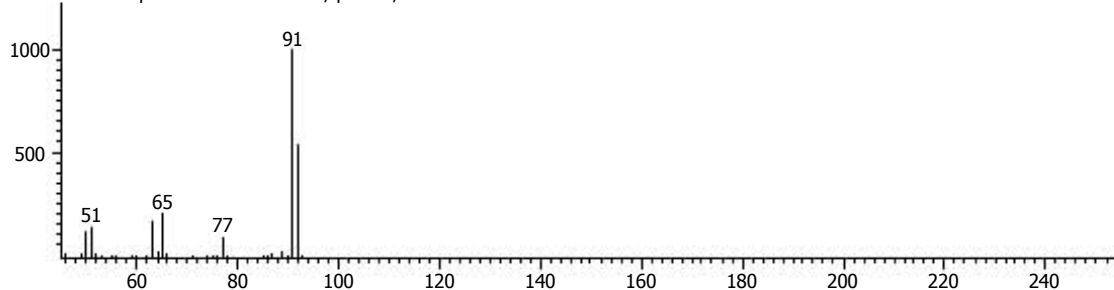


OTR804_2 #523 RT: 16.78 AV: 1 SB: 312 16.55 25.80 NL: 0.33E5
T: +0.017 of ms (8940-90066)

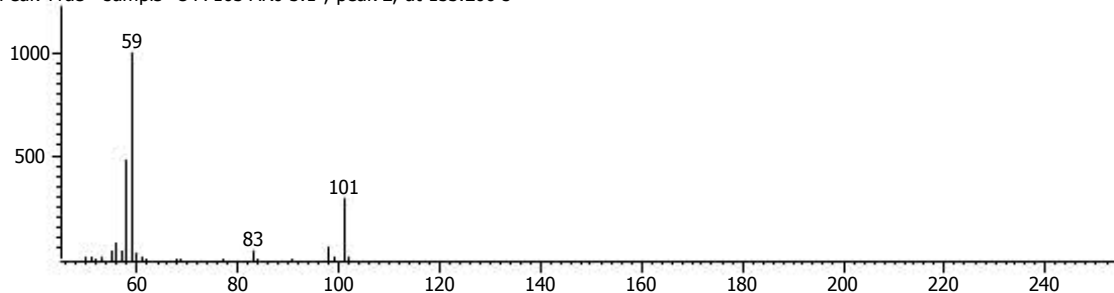


9.7. Espectro de masas de la fracción 4 del extracto Exp2-ExtCHCl₃-lavado.

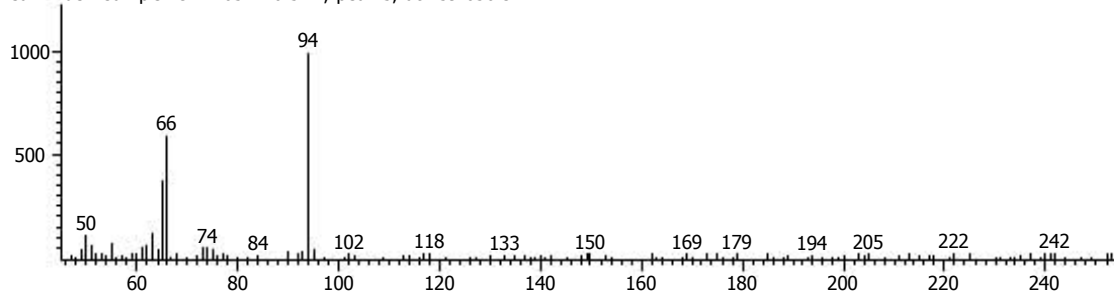
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 1, at 111.256 s



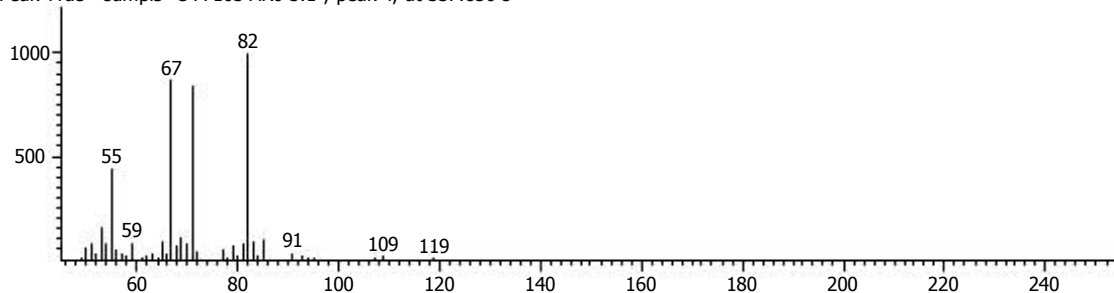
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 2, at 153.206 s



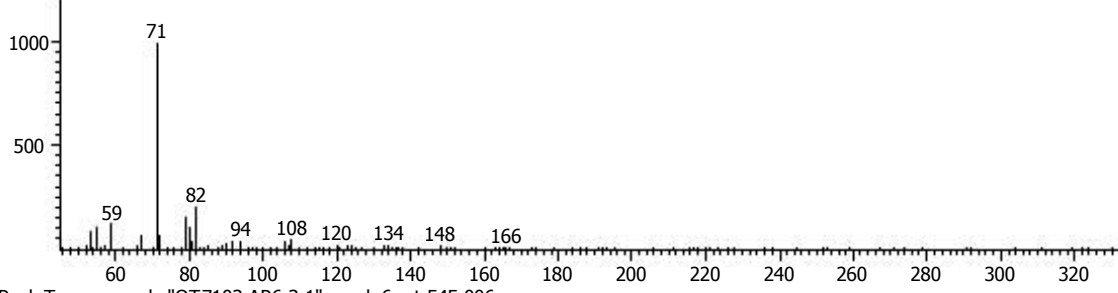
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 3, at 259.656 s



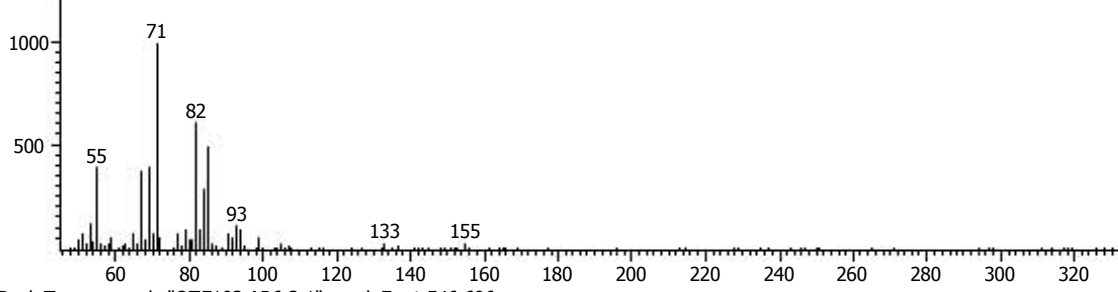
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 4, at 337.856 s



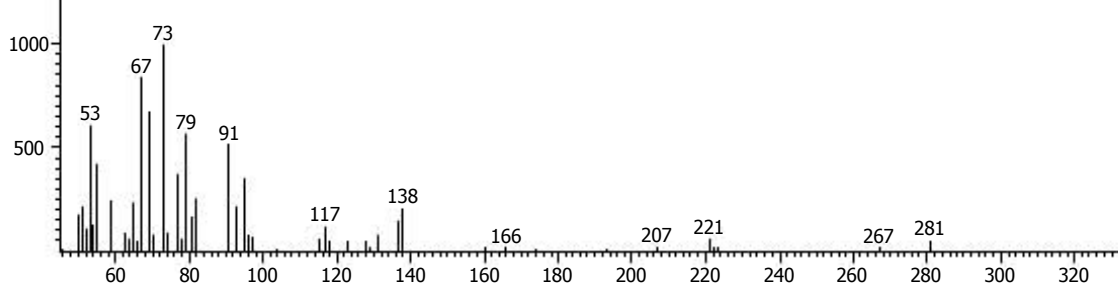
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 5, at 537.456 s



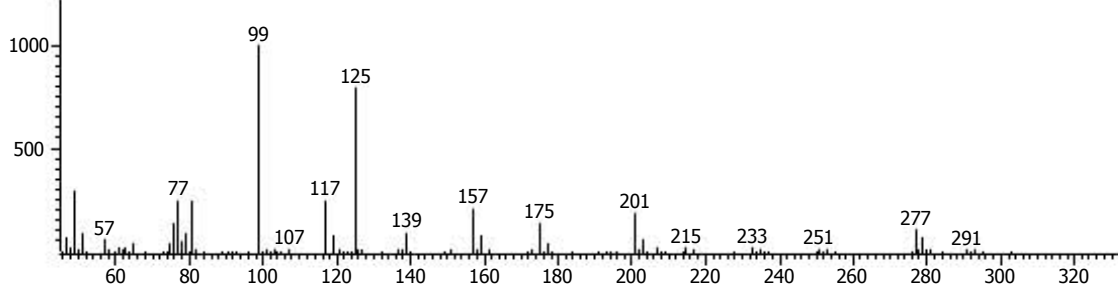
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 6, at 545.006 s



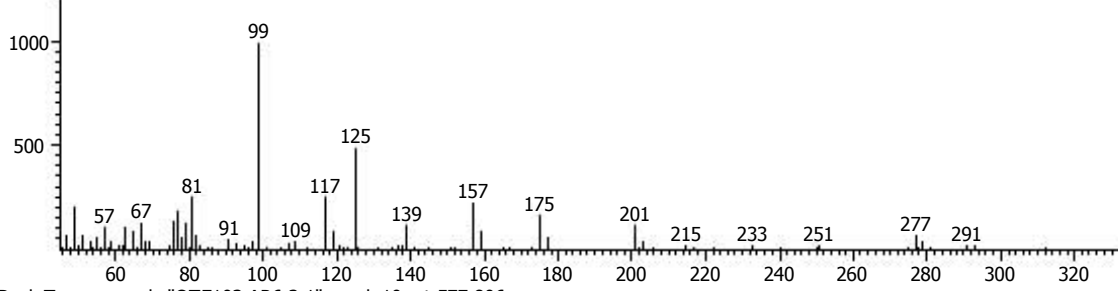
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 7, at 546.606 s



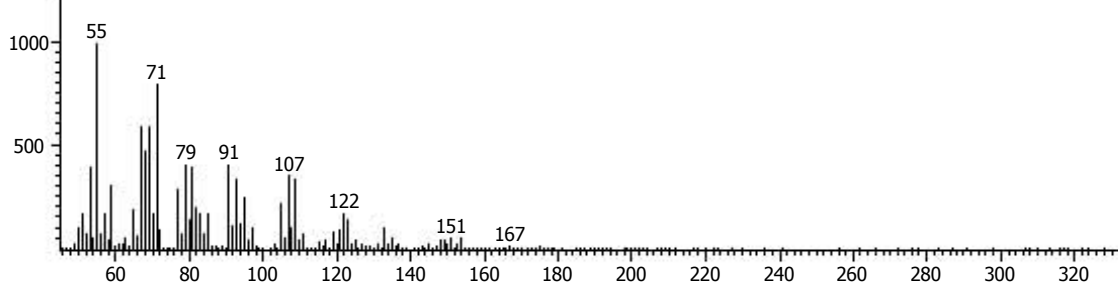
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 8, at 559.756 s



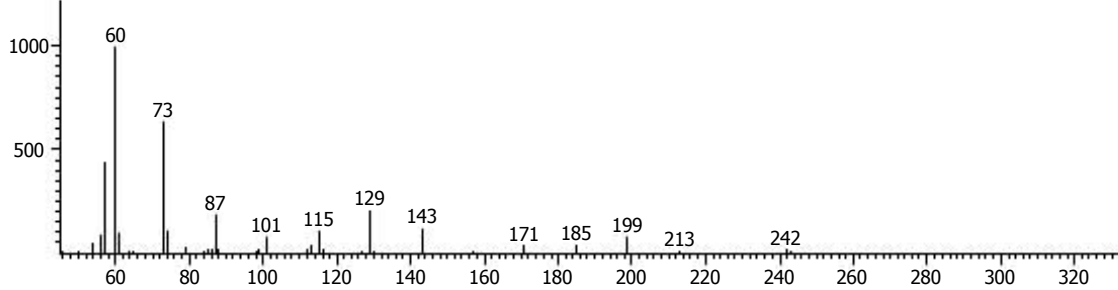
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 9, at 564.756 s



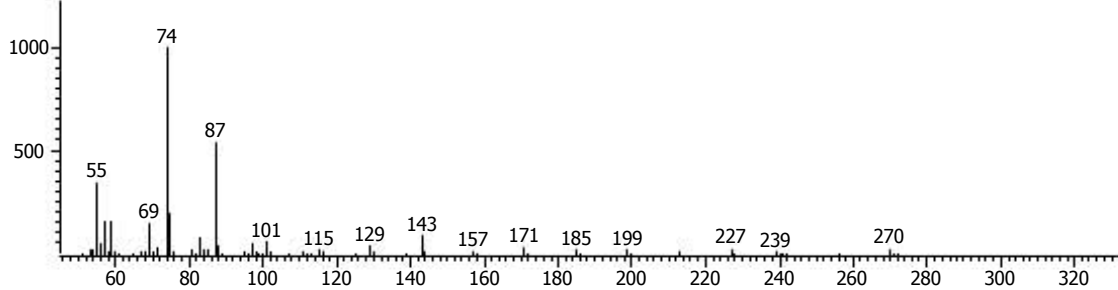
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 10, at 577.806 s



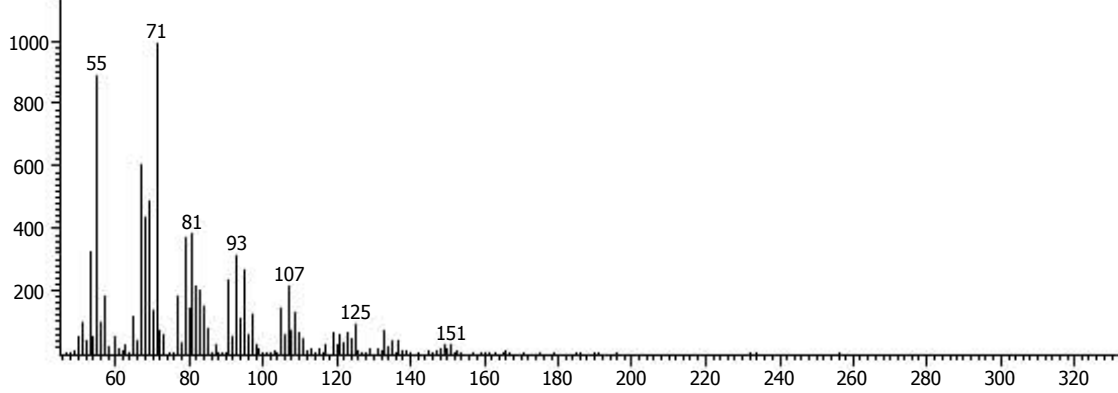
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 11, at 584.406 s



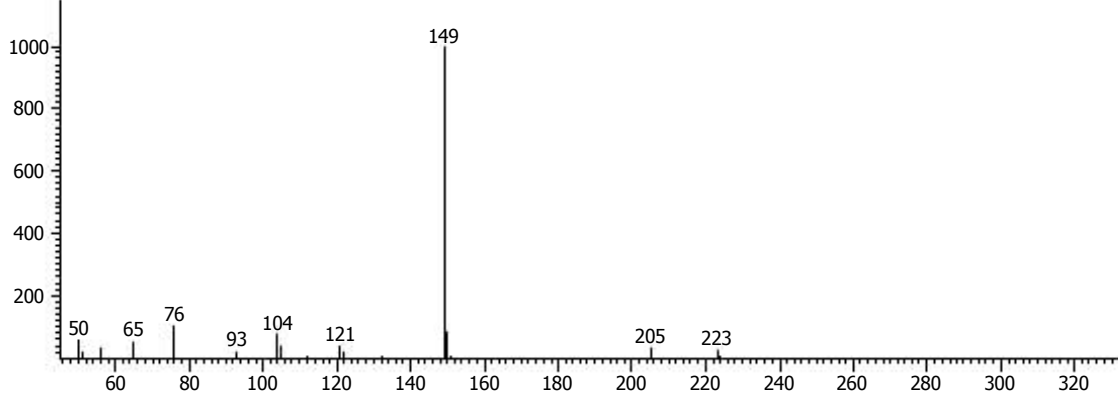
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 12, at 597.356 s



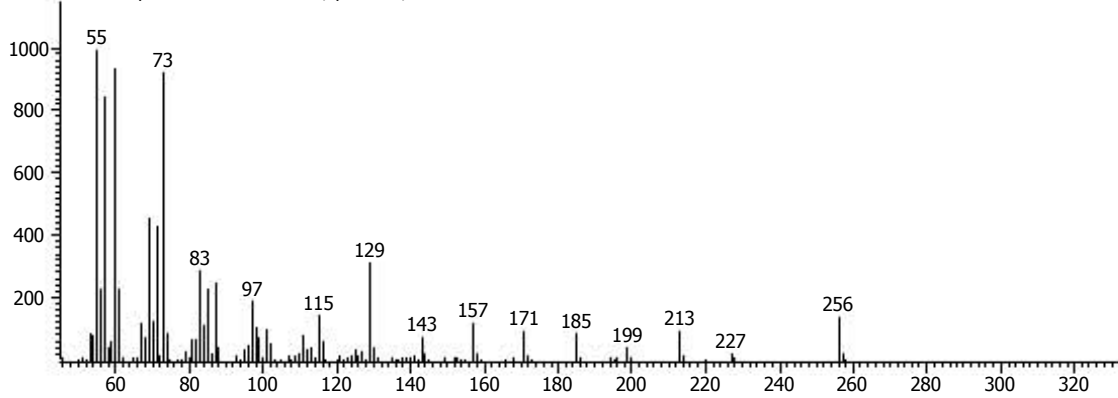
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 13, at 600.806 s



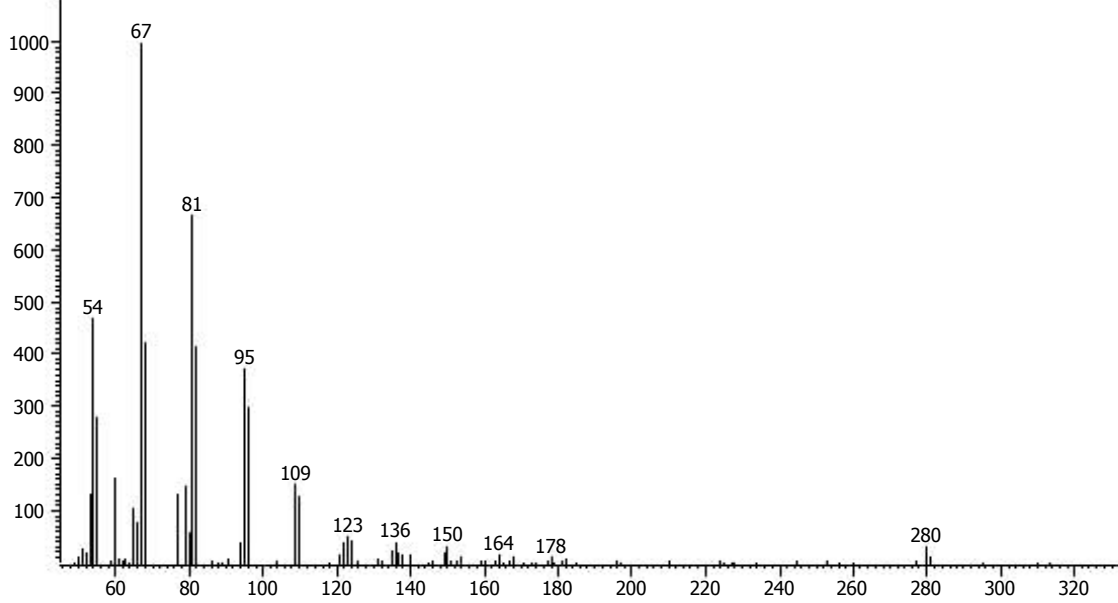
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 14, at 608.756 s



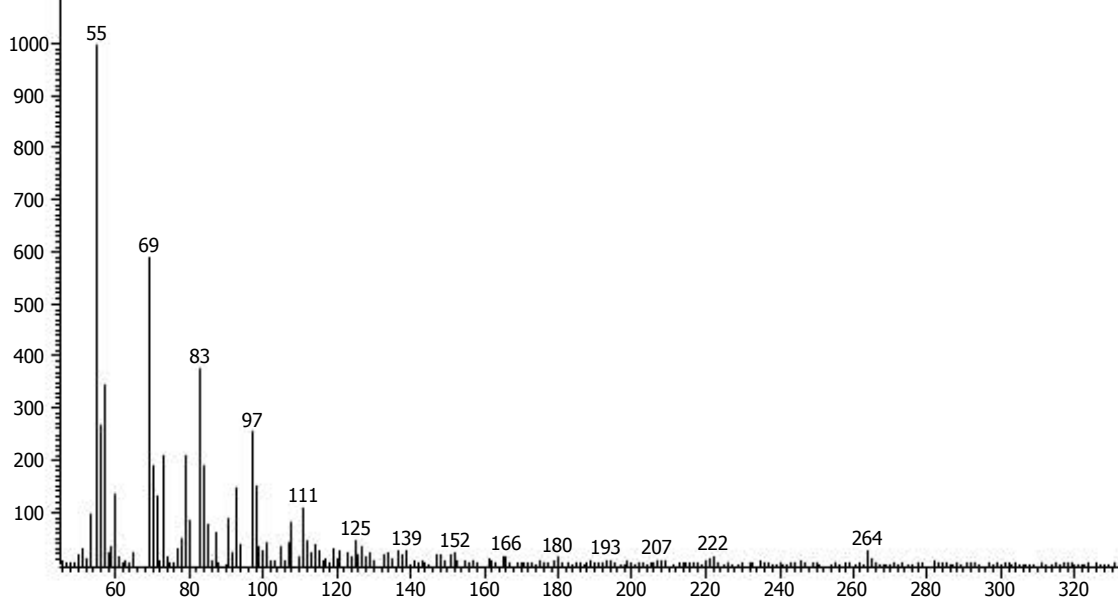
Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 15, at 625.056 s



Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 16, at 666.306 s



Peak True - sample "OT7103-AR6-3:1", peak 17, at 667.206 s



10. Referencias bibliográficas

1. Bermúdez, A., Oliveira, M., Velázquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales, INCI. 30 (8): 453-459.
2. Globocan, 21/04/2011 5: 00 pm <http://globocan.iarc.fr/>
3. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 21/04/2011 7:00 pm <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm#situacion>
4. Mohar, A., Frías-Mendivil, M., Suchil-Bernal, L., Mora-Macías, T., & de la Garza, J. 1997. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. Salud Pública de México. 39 (4): 1-6.
5. Rizo, P., Sierra, M. A., Vázquez, G., Cano, M., Meneses, A. & Mohar, A. 2007. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000-2004. Cancerología 2: 203-287.
6. Cuevas, J., & Santos, J. 2008. Oncología básica. Vector Ediciones. Madrid. 83, 76, 71, 78, 69, 13-14, 88-93, 98-99 pp.
7. Harrison, T. R. 2006. Oncología y hematología. *Principios de Medicina Interna*. Chile: McGraw-Hill Interamericana. 27-28, 76 pp.
8. Tierney, L., McPhee, S. & Papadakis, M. 2006. Diagnóstico clínico y tratamiento. Editorial Manual Moderno. 41° Edición, 1451p.
9. Vetcher, D. 2003. Drogas antimitóticas en Cardiología Intervencionista. El comienzo del éxito en la resolución de la reestenosis, Cardiología intervencionista. Revista Federal Argentina de Cardiología, (32): 406-410.
10. Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University, New York. 90-93 pp.
11. 14/10/2012 2:00 am Tropicos Missouri Garden 2013, Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2500157>
12. APG 3, 2010. Asociación de Taxonomos que organizan los Taxones. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
13. Raven, P. & Axelrod, D. 1974. Angiosperm biogeography and past continental movements. Annals of Missouri Botanical Garden 61 (3): 539-673.

14. Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens P., Donoghue, M. 2007. Plant systematic a phylogenic approach. 3rd edition. Ed. Sinauer Associates. 247-248 pp.
15. Heywood, V., 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverté, S.A., Barcelona, España. 37-38 pp.
16. González, F. 1990. Flora de Colombia: Aristolochiaceae, Instituto de Ciencias Naturales- Museo de Historia Natural. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 12: 44, 45, 82,83, 94-98 pp.
17. Kelly, L., 2000. Aristolochiaceae Juss., Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. 29: 1-8.
18. Guía de Consulta Botánica II, Magnolidae-Aristolochiaceae, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), 30p. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/diversidad/fascIII/8.%20Aristolochiaceae.pdf>
19. Bello, M., Valois-Cuesta, H. & González, F. 2006. *Aristolochia grandiflora* Sw. (Aristolochiaceae): desarrollo y morfología de la flor más larga del mundo, Rev. Acad. Colomb. Cienc. 30 (115): 181-194.
20. Díaz, J., 1976. Usos de las plantas medicinales en México, Monografías Científicas 2, Instituto Mexicano para el estudio de las plantas mexicanas, A.C. Publicaciones Científicas, México, D.F.
21. Martínez, M., 1969. Plantas Medicinales de México, ed. Botas. México
22. Mendoza, P., 2000. Las Plantas medicinales de la selva alta perennifolia de los Tuxtlas, Veracruz: en un enfoque etnofarmacológico-químico. Tesis de licenciatura, Asesor: Chilpa R., Facultad de Ciencias, UNAM, 46 pp.
23. Houong Thi Bich, Li-Li hsiao, 2008. Aristolochic acid (Chinese-herb) Nephropathy, Nephrology Rounds. 6 (2). Disponible en: <http://www.nephrologyrounds.org/>
24. Carreras, L., 1973. Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica* L. Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 30: 253-265.
25. Tao Chen, 2007. Genotoxicity of Aristolochic Acid: A review, Journal of Food and Drugs Analysis, 15 (4): 378-399.
26. Shih-Ming Chen, Mei-Yu Fan, Chia-Chi Tseng, Yih Ho & Kuang-Yang Hsu. 2007. Pharmacokinetics and nephrotoxicity of aristolochoc acid in rabbits, Toxican 50: 180-188.

27. YingLi, Zhihong Liu, Xiaohua Guo, Jian Shu, Zhaohong Chen & Leishi Li. 2006. Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells in vitro, *Arch. Toxicol.* 80 (8): 524-532.
28. Shi- Lin Hu, Hong-Qi Zhang, Chan, K. & Quan-Xi Mei. 2004. Studies on the toxicity of *Aristolochia manshuriensis* (Guanmuton), *Toxicology* 198: 195–201.
29. Debelle, F., Nortier, J., Arlt, V., Prez, E., Vienne, A., Salmon, I., Phillips, D., Deschodt-Lankman, M. & Vanherweghem, J. 2003. Effects of dexfenfluramine on aristolochic acid nephrotoxicity in a rat model for Chinese-herb nephropathy- *Arch Toxicol* 77: 218-226.
30. Rojas, V., 2000. Alcaloides y otros compuestos nitrogenados de *Aristolochia asclepiadifolia*. Tesis de licenciatura. Asesor: Espejo, O. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 2-31 pp.
31. Li- Shian Shi, Ping-chunh Kuo, Yao-Lung Tsai, Amooru Gangaiah Damu & Tian-shung Wu. 2004. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*, *Bioorganic and Medical Chemistry* 12: 439-446.
32. Young Lok Choi, Joa Kyum Kim, Yong-Ki Min, Myung-Ae Bae, Bum Tae Kim & Jung-Nyoung Heo. 2009. Synthesis of aristolactam analogues and evaluation of their antitumor activity, *Bioorganic and medicinal chemistry letter.* 19: 3036-3040
33. Yi-Chen Chia, Fang-Rong Chang, -che-Mingg Teng & Yang-Chang Wu. 2000. Aristolactams and dioxoaporphines from *Fissistigma balansea* and *Fissistigma oldhamii*, *Jornual of Naturals Products.* 73 (8): 1160-1163.
34. Hegde, V., Borges, S., Pu, H., Patel, M., Gullo, V., Wu, B., Kirschmeier, P., Williams, M., Madison, V., Fischmann, T. & Tze-Ming Chan. 2010. Semi-synthetic aristolactam inhibitors of CDK2 enzyme. *Bioorganic and medicinal chemistry letters.* 20: 1384-1387.
35. Houghton, P., & Ogutveren, M., 1991. Alkaloids and lignan from *Aristolochia ponticum*, *Phytochemistry* 330 (2): 717-718.
36. Yann Lu Leu, Yu-Yi Chan & Tian-Shung Wu. 1998. Sodium aristolochate derivates from leaves of *Aristolochia foveolata*. *Phytochemimetry* 48 (4): 743-745.
37. Tian Shung Wu, Li-Fei Ou & Che-Ming Teng. 1994. Aristolochic acids, aristolactam alkaloids and amines from *Aristolochia Kankauensis*. *Phytochemistry* 36 (4): 1063-1068.

- 38.** Pacheco, A., Silva, T., Manfrini, R., Sallum, W., Duarte, L., Piló-Veloso, D. & Alcántara, A. 2010. Estudio Químico e atividade antibacteriana do de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae). *Quim. Nova* 33(8): 1649-1652.
- 39.** Omar, S., Chang Leng Chee, Ahmad, F., Jiu Xiang Ni, Jaber, H., Jinasheng Huang & Tetsuo Nakatsu. 1992. Phenanthrene lactams from *Goniothalamus valutunus*. *Phytochemistry* 31 (12): 4395-4397.
- 40.** Chanakul W, Tuchinda, P., Anantachoke, N., Pohmakotr, M., Piyachaturawat, P., Jaritawat, S., Suksen, K., Jaipetch, T., Nuntasaeen, N. & Reutrakul, V. 2011. Cytotoxic alkaloids from stems, leaves and twigs of *Dasymaschalon blumei*. *Fitoterapia* 83 (7): 964-968.
- 41.** Ruangrunsi, N., Prathanturarug, S., Lange, G. & Organ, M. 1992. An N-methyl aristolactam an oxygenated cyclohexane derivade from *Piper ribesioides*. *Phytochemistry* 31 (7): 2397-2400.
- 42.** Olsen, C., Tyagi, O., Boll, P., Hussain, F., Parmar, V., Sharma, N., Tanejs, P. & Jain, S. 1993. An aristolactam from *Piper acutisleginum* and revision of the structures of piperlactam b and D. *Phytochemistry* 33 (2): 518-520.
- 43.** Kuate, T., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A., Tanoli, S., Nahar, S., Ali, M., Ngadjui, B., Tsamo, E., Lacaille-Dubois, M. & Luu, B. 2008. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* 69: 1726-1731
- 44.** Tian-Shung Wu, Damu, A., Chung-Ren Su & Ping-Chung Kuo. 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities, *Nat. Prod. Rep.* 21: 594–624.
- 45.** Vinod R., Borges, S., Patel, M., Das, P., Wu, B., Gullo, V. & Tze-Ming Chan. 2010. New potential antitumor compounds from the plant *Aristolochia manshuriensis* as inhibitors of the CDK2 enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20 (4): 1344-1346.
- 46.** Chaouki W., 2010. Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmaceutical Biology* 48 (3): 269-274.
- 47.** Rodríguez, B., de la Torre, M., Simones, F., Batista, O., Nacimiento, J., Duarte, A. & Mayer, F. 1995. Cytotoxic alkaloids from stems, leaves and twigs of *Dasymaschalon blumei*. Revision of the structure of an aristolane sesquiterpene aldehyde isolated from

the root of *Plectranthus hereroensis* and *Aristolochia debilis*. *Phytochemistry* 38(4): 905-907.

48. Geraldo, A., Machado de Oliveira, P., Piló-Veloso, D. & de Carvalho Alcántara, A. 2009. ¹³C-NMR Data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules*.14: 1245-1262.

49. Francisco, M., Nasser, A. & Lopes, L. 2003. Tetrahydroisoquinoline alkaloids and 2 deoxyribonolactones from *Aristolochia arcuata*. *Phytochemistry*. 62: 1265-1270.

50. Lopes, L. M. X & Holzbach, J. 2010. Aristolactams and Alkamides of *Aristolochia gigantean*. *Molecules* 15:9462-9472.

51. Navarro-Garcia, V. M., Luna-Herrera, J., Rojas-Bribiesca, M., Álvarez-Fitz, P. & Ríos, M. 2011. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*16: 7357-7364.

52. León-Díaz, R., Meckes, M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G., Vargas-Villareal, J., Torres, J., Luna-Herrera, J. & Jiménez-Arellanes, A. 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105 (1):45-51.

53. Rojas, V., 2002. Validación de actividad biológica y caracterización de componentes del género *Aristolochia*. Tesis de maestría. Asesor: Espejo, O. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 34-45 pp.

54. Jiménez, A., 2008. Aislamiento e identificación de friedelina, canofilol, ácido siquímico y amentoflavona de extractos cetónicos de *Calophyllum brasiliense* y evaluación citotóxica de amentoflavona en líneas celulares humanas. Tesis de licenciatura. Asesor: Solano, J. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 34-41 pp.

55. Herrera, J., & Chaves, M. C., 2012. Validación de un método de análisis para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía líquida de alta eficiencia en partículas PM10 y PM25. *Tecnología en Marcha*. 25 (3): 39-49

56. Morrison, R., & Boyd, R. 1998. Química orgánica, ed. Pearson, 5ª edición, México, 874 pp.

57. Mc Murry, J. 2008. Química orgánica, ed. Cengage learning, 7ma edición, México, 439, 444 pp.

58. Skoog, D., & Holler, F. 2008. Principios de análisis instrumental, ed. Cengage learning, 6ª edición, México, 460 pp.
59. 15/08/2013
http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/alcaloides.html
60. Lemos, M., Carneiro, B., Paulucio, E., Hanada, A., Chammas, R., Nair, S., & Andreu, L., 2010. Morphological Alterations and G0/G1 cell cycle arrest induced by Curcumin in human SK-MEL-37 melanoma cells. Brazilian archives of biology and technology an international journal 53 (2): 343-352.
61. López, J., & Pérez, J. 2009. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. Medicina naturista 3 (1): 17-24.
62. World Health Organization, *Aristolochia* species and aristolochic acids, en: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. 82: 69-13. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/volume82.pdf>
63. 1/03/2011 20:00 [Http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php)
64. Camporese, A., Balick, M., Arvigo, R., Esposito, N., Mosellino, N., Simone, F., & Tubano, A., 2003. Screening of antibacterial of medical from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology 83: 103-107.