



Doctorado en Ciencias Ambientales

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y/O ANTIOXIDANTE DE *Phyllonoma
laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*,
PATRIMONIO NATURAL DE USO EMPÍRICO EN LA REGION DE LA
MONTAÑA DE GUERRERO**

PRESENTA:

Jorge Bello Martínez

Para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Director de Tesis

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Co-Director

Dr. José Luis Rosas Acevedo

Dra. María Laura Sampedro Rosas

Vocal

Dra. Luz Patricia Ávila Caballero

Vocal

Dr. Félix Torres Guzmán

Vocal

Acapulco, Gro. Febrero de 2017

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de Jorge Bello Martínez hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado **CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y/O ANTIOXIDANTE DE *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*, PATRIMONIO NATURAL DE USO EMPÍRICO EN LA REGION DE LA MONTAÑA DE GUERRERO** y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Ambientales.

Atentamente:

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Director de Tesis

Dr. José Luis Rosas Acevedo

Secretario

Dra. María Laura Sampedro Rosas

Vocal

Dra. Luz Patricia Ávila Caballero

Vocal

Dr. Felix Torres Guzmán

Vocal

«El paraíso yace a los pies de las madres».
Profeta Mahoma

*Dedicado a mi madre, prueba viviente
de estas palabras.*

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la aprobación y financiamiento del presente proyecto.

A mis sinodales, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, Dr. José Luis Rosas Acevedo, Dra. María Laura Sampedro Rosas, Dra. Luz Patricia Ávila Caballero y al Dr. Félix Torres Guzmán, por todo su apoyo académico que me proporcionaron durante la elaboración de mi tesis en la Universidad Autónoma de Guerrero y en la Universidad de Sonora.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, a las Químicas Fabiola Escalante Erosa y Karlina García Sosa del CICY Yucatán, por darme la confianza de trabajar a su lado, por todos sus grandes consejos, ánimos y buenos deseos que me proporcionaron durante el tiempo que estuve en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A mis compañeros de Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Sonora, Heriberto Torres Moreno y Max Vidal Gutiérrez, por todo ese tiempo lleno buenos momentos que pasamos juntos, así como todos sus consejos y enseñanzas que siempre recordaré.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada y a la Química Rosario Tavera del Instituto de Química de la UNAM por brindarme de sus conocimientos, consejos y técnicas de trabajo dentro y fuera del laboratorio.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda por darme la oportunidad y confianza de trabajar a su lado en este maravilloso proyecto, por compartirme de su experiencia, sabiduría y amistad a cada momento dentro y fuera del laboratorio. De esta manera espero estar honrando aquel gran tiempo y esfuerzo que nos dedica a cada uno de sus alumnos.

DEDICATORIAS

A Dios por prestarme vida día a día, por colocarme en el camino experiencias que me han formado como persona al lado de la mejor familia, amigos y compañeros.

A mis abuelos que desde el cielo me llenan de bendiciones.

A mi madre Ernestina Donají Martínez Polito que con su dedicación, esfuerzo y amor nos ha sacado siempre adelante con el único objetivo de ver triunfar a su familia.

A mi padre Jorge Bello Nieves que con el sudor de su frente nos ha sacado adelante teniendo como inspiración el amor que tiene por sus hijos.

A mis hermanos Alejandra, Pancho, Oliver, Cuco y Azucena, que siempre han estado conmigo apoyándome incondicionalmente a seguir siempre firme.

A mi compañera de vida y mejor amiga, que con su amor, paciencia y comprensión he logrado obtener inspiración para salir adelante, Mónica Gatica Salmerón.

A mis Hijos Jorge y Brenda Bello Gatica que siempre me apoyaron y fueron parte del éxito de esta parte de mi vida.

A mi Maestro, José Luis Parra Mijangos, quien siempre estuvo dándome ánimos, bendiciones y sabios consejos para salir adelante.

A mi amigo, Andrés Nájera Hernández, por su apoyo y sus consejos.

LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
ANEXOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Medicina tradicional	3
2.2 Generalidades del Cáncer	4
2.3 Epidemiología del Cáncer.....	4
2.4 Radicales libres: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	5
2.5 Funciones fisiológicas de los radicales libres	5
2.6 Estrés Oxidativo y daño a biomoléculas	6
2.7 Los antioxidantes.....	7
2.8 Antioxidantes de origen natural	8
2.9 Generalidades del amate prieto (<i>Ficus obtusifolia</i> Kunth)	9
2.9.1 Nombres comunes	9
2.9.2 Taxonomía	9
2.9.3 Sinonimia del nombre científico.....	10
2.9.4 Etnobotánica.....	10
2.10 Generalidades del palo de Brasil (<i>Haematoxylum brasiletto</i> Karst)	10
2.10.1 Nombres comunes	11
2.10.2 Taxonomía	11
2.10.3 Sinonimia del nombre científico.....	12
2.10.4 Etnobotánica.....	12
2.11 Generalidades de Mil hojas (<i>Phyllonoma laticuspis</i>).....	12
2.11.1 Nombres comunes	13
2.11.2 Taxonomía	13
2.11.3 Sinonimia del nombre científico.....	14
2.11.3 Etnobotánica.....	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	15
General	15
Particulares	15
VI. MEDODOLOGÍA.....	16
Material Vegetal	16
Preparación de extractos de plantas.....	16
Aislamiento de metabolitos bioactivos de <i>H. brasiletto</i>	17
Elucidación estructural	17
Actividad Reductora de radicales libres (ensayo de DPPH).....	18
Capacidad reductora del radical ABTS	18
Cultivo y líneas celulares	19
Ensayo de proliferación celular.....	19

Análisis estadístico	20
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Actividad antioxidante	21
Actividad antiproliferativa.....	23
Flavonoide aislado del extracto de etanol de <i>H. brasiletto</i>	24
Actividad antiproliferativa de Brazilina.....	26
IX. CONCLUSIONES	30
X. REFERENCIAS.....	31
XII. ANEXOS.....	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Taxonomía de <i>Ficus obtusifolia</i> Kunth.....	10
Cuadro 2 Taxonomía de <i>Haematoxylum brasiletto</i> Karst.....	12
Cuadro 3 Taxonomía de <i>Phyllonoma laticuspis</i>	13
Cuadro 4 Lista de plantas del estado de Guerrero, México estudiadas en su actividad antiproliferativa y antioxidante in vitro.....	16
Cuadro 5 Actividad antioxidante de extractos y fracciones de <i>P. laticuspis</i> , <i>H. brasiletto</i> y <i>F. obtusifolia</i> mediante los ensayos de DPPH y ABTS+	22
Cuadro 6 Actividad Antiproliferativa de extractos y fracciones de <i>P. laticuspis</i> , <i>H. brasiletto</i> y <i>F. obtusifolia</i> en tres líneas celulares, mediante el ensayo de MTT.	24
Cuadro 7 Datos de análisis espectroscópicos de brazilina	25
Cuadro 8 Actividad antiproliferativa in vitro de brazilina en siete líneas celulares mediante el ensayo de MTT.	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 <i>F. obtusifolia</i> KUNTH (GONZÁLEZ-CASTAÑEDA., ET AL 2010).....	9
FIGURA 2 <i>H. brasiletto</i> KARST (CONABIO, 2009)	11
FIGURA 3 <i>P. laticuspis</i> (CONABIO, 2009)	14
FIGURA 4 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FLAVONOIDE BRAZILINA.....	26
FIGURA 5 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE BRAZILINA EN LINEAS CELULARES SIHA, MDA- MB-231, HELA, A549, ARPE-19, LS 180 Y H1299.....	28

ANEXOS

ANEXO 1 ESPECTRO DE ^1H A 400 MHz	38
ANEXO 2 ESPECTRO DE ^{13}C A 400 MHz.....	39
ANEXO 3 ESPECTRO DEL EXPERIMENTO HMBC A 400 MHz	40
ANEXO 4 ESPECTRO DEL EXPERIMENTO COSY A 400 MHz.....	41
ANEXO 5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	42

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud caracterizado por ser una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2012 se registraron 8.2 millones de muertes a causa de este padecimiento en el mundo y 14 millones de nuevos casos el mismo año. En México los tipos de cáncer con más mortalidad son el cáncer de pulmón y bronquios, próstata, hígado, estómago y mama (INEGI, 2013). La necesidad de obtener nuevos medicamentos con mayor efectividad y sobre todo con menos efectos secundarios contra el cáncer es importante para reducir el número de muertes. Las plantas representan el patrimonio natural de las comunidades y una fuente importante de compuestos contra el cáncer ya que se han logrado aislar de ellas medicamentos anticancerígenos como el taxol y la vinblastina. En México existe un amplio número de plantas conocidas por sus efectos medicinales contra el cáncer. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y antiproliferativa de las plantas, *Ficus obtusifolia*, *Haematoxylum brasiletto* y *Phyllonoma laticuspis*, utilizadas por las comunidades rurales de la región Montaña del estado de Guerrero. Para ello se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y DPPH, y la actividad antiproliferativa sobre tres líneas celulares (A549, RAW 264.7 y L-929) mediante el método del MTT. Los extractos etanólicos y sus fracciones obtenidos de *F. obtusifolia* y *H. brasiletto* mostraron actividad antioxidante por ambos métodos. Las fracciones con mayor actividad fueron acetato de etilo en *F. obtusifolia* ($55.0 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$), seguido de fracciones de *H. brasiletto* acetato de etilo y diclorometano ($63.0 \pm 6.3 \mu\text{g/mL}$) y ($60.0 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$) respectivamente. La fracción de diclorometano de *H. brasiletto* mostró la mayor actividad antiproliferativa dosis dependiente, con una alta actividad contra A549 y RAW 264.7 con valores de 22.57 ± 0.86 y $23.87 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, seguido por la fracción hexánica de *F. obtusifolia* con ($\text{IC}_{50} 48.13 \pm 4.84 \mu\text{g/mL}$ y $42.21 \pm 2.11 \mu\text{g/mL}$) contra A549 and RAW 264.7, respectivamente. El extracto de *P. laticuspis* no mostró evidencia de actividad antiproliferativa a la máxima concentración evaluada. La fracción de diclorometano fuéfraccionada mediante cromatografía en columna con sílica gel, las subfracciones fueron separadas por cromatografía en placa preparativa, la estructura química del compuesto purificado:

brazilina, (C₁₆H₁₄O₅)(6aS,11bR)-7,11b-Dihidro-6H-indeno[2,1-c]cromeno-3,6a,9,10-tetrol), fue elucidada por diferentes métodos químicos y espectroscópicos, (¹H RMN, RMN ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC y IR). Se evaluó la actividad antiproliferativa de brazilina, el agente quimioterapéutico de amplio espectro doxorubicina se incluyó como control positivo, resultando que produce un efecto inhibitor moderado sobre el crecimiento en las líneas celulares humanas, SiHa, MDA, A549 y H1299 con valores de IC₅₀ de 44.29, 48.69, 45.44 y 48.73 μM, respectivamente. En LS180 y HeLa se observó un efecto bajo a IC₅₀ 62,21 y 71,96 μM, respectivamente. Brazilina mostró un efecto antiproliferativo moderado sobre la línea celular no cancerosa ARPE-19 con valores de IC₅₀ de 37.94 μM, lo que sugiere que la actividad antiproliferativa de brazilina es de tipo no selectivo. Se aisló e identificó a brazilina como el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en las líneas celulares evaluadas.

ABSTRACT

Cancer is a health problem characterized by being the diseases with the highest mortality rate worldwide. According to the World Health Organization (WHO) in 2012, there were 8.2 million deaths due to this disease in the world and 14 million new cases the same year. In Mexico the types of cancer with more mortality are cancer of the lung and bronchi, prostate, liver, stomach and breast (INEGI, 2013). The need to obtain new drugs more effectively and especially with fewer side effects against cancer is important to reduce the number of deaths. The plants represent the natural heritage of communities and an important source of anti-cancer compounds since they have been isolated from anticancer drugs such as taxol and vinblastine. In Mexico there is a large number of plants known for their medicinal effects against cancer. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antiproliferative activity of the plants *Ficus obtusifolia*, *Haematoxylum brasiletto* and *Phyllonoma laticuspis*, used by the rural communities of the region Mountain of the state of Guerrero. For this purpose, the antioxidant activity was evaluated using the ABTS and DPPH methods, The antiproliferative activity on three cell lines (A549, RAW 264.7 and L-929) by the MTT method. Ethanolic extracts and their fractions obtained from *F. obtusifolia* and *H. brasiletto* showed antioxidant activity by both methods. The fractions with the highest activity were ethyl acetate in *F. obtusifolia* ($55.0 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$), Followed by ethyl acetate and dichloromethane fractions of *H. brasiletto* ($63.0 \pm 6.3 \mu\text{g/mL}$) y ($60.0 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$) respectively. The dichloromethane fractions of *H. brasiletto* showed the highest dose dependent antiproliferative activity, with high activity against A549 y RAW 264.7 with values of 22.57 ± 0.86 y $23.87 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$ respectively, followed by the hexanic fraction of *F. obtusifolia* with (IC_{50} $48.13 \pm 4.84 \mu\text{g/mL}$ y $42.21 \pm 2.11 \mu\text{g/mL}$) against A549 and RAW 264.7, respectively. The extract of *P. laticuspis* did not show evidence of antiproliferative activity at the highest concentration evaluated. The active dichloromethane fraction was fractionated by silica-column chromatography and active sub-fractions were separated using preparative-TLC. The chemical structure of the purified compound: brazilin, (6aS,11bR)-7,11b-Dihidro-6H-indeno[2,1-c]cromeno-3,6a,9,10-tetrol) was elucidated with different chemical and spectroscopic methods, (^1H RMN, RMN ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC y IR). The antiproliferative activity of

braziline was evaluated, the broad-spectrum chemotherapeutic agent doxorubicin was included as a positive control, resulting in a moderate inhibitory effect on growth in human cell lines, SiHa, MDA, A549 y H1299 con valores de IC₅₀ de 44.29, 48.69, 45.44 y 48.73 μ M, respectively. In LS180 and HeLa a low effect was observed with IC₅₀ 62,21 y 71,96 μ M, respectively. Brazilin exhibited a moderate antiproliferative effect on the non-cancerous cell line ARPE-19 with an IC₅₀ value of 37.9 μ M. Brazilin, was isolated, this compound demonstrated antiproliferative activity against several human cancer cell lines.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de productos naturales derivados de plantas, animales o microorganismos con fines medicinales tiene una larga historia (Jiménez-Estrada *et al.*, 2013). Las plantas medicinales son una fuente de metabolitos secundarios, que tienen múltiples aplicaciones por lo que incluso hoy en día el hombre todavía depende de ellos para tratar algunas de sus enfermedades. Las plantas son también importante fuente natural de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados con fines terapéuticos ya que sus componentes químicos proporcionan la base para la síntesis de productos farmacéuticos (Mark, 2004).

El conocimiento etnobotánico de las plantas medicinales representa una alternativa para la identificación de metabolitos secundarios con actividad antioxidante, cuya importancia reside en su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno y el potencial para reducir el estrés oxidativo (Hemendra, 2011; Devasagayam, 2002; Mark, 2004).

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas (Bergstrom, 2012; Yuang, 2007), por lo que este es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados (Ueda, *et al.*, 2002). Algunos de los tipos de cáncer más comunes, como el de mama, el de cuello uterino, el oral y el colorrectal tienen altas tasas de curación cuando se detectan temprano y se tratan de acuerdo con algunos medios eficaces, incluyendo cirugía, radiación y quimioterapia (OMS, 2016). Sin embargo, todos los tratamientos también están acompañados de efectos secundarios graves (Kitzios, *et al.*, 2004). De esta manera, el conocimiento etnobotánico de las plantas medicinales, como patrimonio natural, representa una alternativa para la identificación de metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa como flavonoides, una clase de metabolitos secundarios que podría ser una fuente prometedora de futuros fármacos contra el cáncer (Gordaliza, 2007; Kalekar *et al.*, 2013; Ren, *et al.*, 2003).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas en los organismos debido al impacto de la luz UV, la radiación iónica, las reacciones químicas y los procesos metabólicos causan múltiples daños como la peroxidación de lípidos y proteínas, daño al ADN, degeneración celular, envejecimiento y cáncer (Böhm, *et al.*, 1998; Yuang, 2007). Esto a su vez puede reducirse por el efecto del consumo de compuestos tales como polifenoles producidos por las plantas debido a su capacidad para capturar los radicales libres que poseen (Sati, *et al.*, 2010; Kalekar *et al.*, 2013).

Haematoxylum brasiletto Karst, conocido como "Palo de Brasil", *Ficus obtusifolia* "Amate Negro" y *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. conocido como "Mil hojas" son plantas utilizadas en el Estado de Guerrero. El uso etnobotánico de estas especies incluye el tratamiento de heridas infectadas, pie diabético, calambres menstruales, infecciones estomacales y cáncer (Argueta, 2004), que como patrimonio natural se deben conservar y explotar de manera racional. El objetivo de este trabajo fue la caracterización química de compuestos con actividad antiproliferativa y/o antioxidante de los extractos orgánicos de estas plantas, que como patrimonio natural de uso empírico en Guerrero, es importante valorar y preservar.

II. ANTECEDENTES

2. 1 Medicina tradicional

La medicina tradicional, como patrimonio natural, comprende conocimientos y técnicas basados en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas; utilizados para mantener la salud, prevenir, diagnosticar o tratar enfermedades físicas y mentales (Torres *et al.*, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define medicina tradicional como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias físicas, mentales y espirituales, aplicadas de forma individual o colectiva para mantener el bienestar (OMS, 2002). Además, la estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional, plantea como objetivos integrarla a los sistemas de salud, fomentar su seguridad, eficacia, calidad y uso apropiado por parte de proveedores y consumidores e incrementar su disponibilidad.

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia en la medicina tradicional, este recurso es rescatable en gran medida por constituir un importante elemento al combinar el conocimiento popular con el científico para el tratamiento de diversas enfermedades en la atención primaria de la salud. Entre las plantas más utilizadas se encuentra la albahaca, esta es eficaz contra el dolor de estómago, la falta de apetito y el estreñimiento, la manzanilla tiene efectos sedantes y antiinflamatorios, es útil para tratar la artritis y cólicos intestinales, el sauce es útil para bajar la fiebre, quitar calofríos y aliviar dolores reumáticos, también es utilizada como desinfectante y astringente (Villarreal *et al.*, 2014).

El uso de productos naturales derivados de plantas, animales o microorganismos con fines medicinales tiene una larga historia (Jiménez-Estrada *et al.*, 2013). Las plantas medicinales son una fuente de metabolitos secundarios, que tienen múltiples aplicaciones por lo que incluso hoy en día el hombre todavía depende de ellos para tratar algunas de sus enfermedades. Las plantas son también importante fuente natural de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados con fines terapéuticos ya que sus componentes químicos proporcionan la base para la síntesis de productos farmacéuticos (Mark, 2004). De ahí, la importancia de caracterizar

químicamente la actividad antiproliferativa y/o antioxidante, de tres especies vegetales (*Phylloma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*) que como patrimonio natural son utilizadas de manera empírica en la región de la montaña de Guerrero.

2.2 Generalidades del Cáncer

El cáncer es una enfermedad causada por diferentes factores de riesgo como los son los genéticos, físicos, químicos y biológicos; carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida); carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (OMS, 2015).

Estos agentes tienen la característica de dañar regiones del ADN afectando la expresión de proteínas necesarias para funcionamiento normal de la célula. Otro tipo de mutación es aquella que sufren las regiones del ADN que codifican a una proteína en particular afectando la función de la misma. El conjunto de estas alteraciones al material genético, tienen la capacidad de convertir el genoma de la célula de normal a canceroso (NIH, 2012).

Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales o cancerosas que puede desarrollarse en prácticamente todos los tejidos del cuerpo estos “tumores malignos” o “neoplasias”. se extienden más allá de los límites normales y pueden invadir partes adyacentes del tejido afectado y propagarse a otros órganos. Este proceso se denomina “metástasis”. Las metástasis son la causa principal de muerte por cáncer (OMS, 2015).

2.3 Epidemiología del Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 se registraron 8.2 millones de muertes a causa de este padecimiento en el mundo y 14 millones de nuevos casos el mismo año. Se prospecta que las muertes por cáncer seguirán aumentando y se esperan alrededor de 22 millones de muertes para el 2030 (OMS, 2015).

En los países desarrollados el cáncer es la enfermedad con mayor índice de mortalidad, los principales tipos de cáncer en países de primer mundo son: próstata,

pulmón, mama y colon. Mientras que en los países emergentes como los de África, América Latina y Asia, los tipos de cáncer más frecuentes son hígado, pulmón, estómago y cuello uterino. En México, el INEGI registró en 2011, 71 mil 350 muertes por cáncer, siendo las principales causas de muerte el asociado a vías respiratorias, de próstata y aparato digestivo con 9.4%, 8% y 7.8% de la cifra respectivamente (INEGI, 2016).

2.4 Radicales libres: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Se denomina radical libre a toda especie molecular que contiene uno o más electrones no apareados en sus orbitales. Este cambio confiere una gran inestabilidad química por lo que, para recuperar su configuración electrónica, el radical libre tiende a reaccionar con moléculas vecinas y a adquirir electrones de ellas, es decir a oxidarlas; por este motivo, los radicales libres también son conocidos como especies reactivas. La pérdida de electrones de las moléculas atacadas por radicales libres las convierte en nuevas especies reactivas que actúan sobre otras moléculas, promoviendo así una reacción en cadena (Laso Guzmán, 2011).

Como producto del metabolismo del ser humano se generan distintos tipos de radicales libres, ERO's: como el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo y el radical hidroxilo. A su vez también se sabe de la existencia de las especies reactivas de nitrógeno (ERN) tales como el óxido nítrico y el radical peroxinitrito, entre otros, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico. Sin embargo, los radicales libres también son generados por factores exógenos como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como plaguicidas, herbicidas y fungicidas (Finkel-Holbrook, 2000).

2.5 Funciones fisiológicas de los radicales libres

La acción de los radicales libres o sus derivados como mediadores fisiológicos incluye la regulación del tono vascular, la percepción de la presión y la regulación de funciones que son controladas por la concentración de oxígeno, así como la potenciación de la transducción de señales intracelulares de varios receptores de la

membrana, incluyendo el receptor de antígeno de linfocitos y respuestas de estrés oxidante que aseguran el mantenimiento del sistema redox (reacciones de oxidación-reducción). El NO es una molécula única, con las características propias de un neurotransmisor; tiene actividad vasodilatadora, es estimulante de la síntesis de músculo liso vascular y antiagregante plaquetario (Maldonado Saavedra *et al.*, 2010).

En el sistema inmune los radicales libres son mediadores fisiológicos en contra de infecciones bacterianas. La presencia de O₂ es un requisito vital para la destrucción y digestión de los agentes patógenos por los fagocitos. La fracción más abundante de las células de la sangre que pueden fagocitar son los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. El O₂ es el mediador del inicio del proceso fagocítico; los fagocitos captan el oxígeno en forma acelerada, conociéndose este fenómeno como colapso respiratorio, que es empleado para eliminar patógenos, y al mismo tiempo produce algunos radicales libres, con enorme poder destructor, gracias a su poder oxidante, tales como O₂⁻, H₂O₂, OH⁻ y el ácido hipocloroso (HClO) (Hampton *et al.*, 1998). Otra de las funciones de los radicales libres es ser mediadores en la síntesis de prostaglandinas, colesterol y hormonas esteroideas. La hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina a hidroxilisina e hidroxiprolina, necesarios para la biosíntesis del colágeno, requiere de la participación del radical libre OH⁻. (Maldonado Saavedra *et al.*, 2010).

2.6 Estrés Oxidativo y daño a biomoléculas

El estrés oxidativo es el rompimiento del equilibrio que debe existir entre los radicales libres (especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno) y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento elevado de la producción de especies reactivas.

Las principales consecuencias del estrés oxidativo ocasionado por especies reactivas de oxígeno (ERO) son:

Oxidación de lípidos y proteínas: los radicales libres de oxígeno, especialmente el •OH, actúan sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana generando a su vez, radicales lipídicos que pueden reaccionar con nuevas moléculas de ácido graso poliinsaturado, intensificando la lesión. La oxidación de

proteínas trae consigo la degradación de proteínas estructurales y la inactivación de enzimas. Destaca la lesión de la membrana celular y de organelos como la mitocondria y los lisosomas.

Daño del ADN: incluye la rotura de las dos cadenas de nucleótidos y cambios en la estructura de las bases nitrogenadas, con las consiguientes mutaciones.

Acción proinflamatoria: los radicales libres de oxígeno activan el factor nuclear Kappa B (NF κ B), un factor de transcripción de diversos mediadores de la inflamación (v.g. citocinas proinflamatorias, eicosanoides). A su vez, en la inflamación se liberan también radicales libres de oxígeno, creándose por tanto un “círculo vicioso”.

De igual manera, las especies reactivas de nitrógeno (ERN) ocasionan diversos problemas fisiológicos, por ejemplo, el radical óxido nítrico (NO•) generado a partir de la L-arginina, puede lesionar la célula de forma directa o indirecta por conversión en otras especies altamente reactivas, tras unirse con el radical superóxido (como el anión peroxinitrito, ONOO-) (Laso Guzmán, 2011).

2.7 Los antioxidantes

Los radicales libres están asociados con numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena; estas reacciones solo son eliminadas por la acción de otras moléculas que se oponen a este proceso tóxico en el organismo, los llamados sistemas antioxidantes defensivos. Un primer grupo trabaja sobre la cadena del radical inhibiendo los mecanismos de activación, un segundo grupo neutraliza la acción de los radicales libres ya formados, detiene la cadena de propagación. El sistema antioxidante protege de esta manera a los tejidos de los efectos de los radicales libres. El primer grupo, los antioxidantes primarios o enzimáticos, protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres; entre estos se encuentran:

Superóxido dismutasa (SOD): transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno.

Glutación peroxidasa (GPX): convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.

Proteínas de unión a metales (GR): frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical •OH.

En el segundo grupo, los antioxidantes secundarios no enzimáticos; se pueden distinguir dos subgrupos:

Antioxidantes hidrofílicos: entre los que se encuentran la vitamina C, (ácido ascórbico), el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina.

Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentran la vitamina E (α -tocoferol), los carotenoides y las ubiquinonas.

Dentro de los antioxidantes terciarios, encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres se incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Céspedes y Sánchez, 2000).

2.8 Antioxidantes de origen natural

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100 % de eficiencia por lo que sí existe un desbalance entre las sustancias oxidantes y antioxidantes hay probabilidades de alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Venéreo Gutiérrez, 2002). Este desbalance se encuentra asociado con el envejecimiento prematuro, carcinogénesis y cardiopatías, entre otras enfermedades (Maldonado *et al.*, 2010). Dado que los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención y tratamiento de patologías que involucran el estrés oxidativo, en los últimos años ha crecido el interés en la búsqueda de productos con actividad antioxidante de origen natural tanto en el campo de la farmacología como en la industria alimentaria (Mendiola, *et al.*, 2009). Por esta razón la importancia del presente trabajo, en la dilucidación de la actividad antiproliferativa y antioxidante de tres especies vegetales, patrimonio natural y cultural de la región de la montaña de Guerrero.

2.9 Generalidades del amate prieto (*Ficus obtusifolia* Kunth)

Árboles hemiepífitos, perennifolios, de 4-12 m de altura, tallos monopódicos, sin contrafuertes definidos, troncos huecos y raíces aéreas, corteza pardo grisácea, con exudado blanco, abundante en las ramas jóvenes, copa abierta, de formas variadas, verde oscura (Durán-Ramírez, *et al.*, 2010) (Cuadro 1, Figura 1).

Ficus obtusifolia se distribuye desde México hasta Brasil. En la República Mexicana se distribuye por la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas y por la vertiente del Atlántico desde Tamaulipas hasta la Península de Yucatán, mientras que hacia el centro del país se le ha colectado en Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí. En la PBDB sólo se le registra en Guerrero, México y Michoacán. En orden decreciente, se le encuentra en el bosque tropical subcaducifolio, bosque de *Quercus*, bosque mesófilo de montaña, bosque de galería y bosque tropical caducifolio; su distribución altitudinal va de 300 a 1,550 m s.n.m. (González-Castañeda, *et al.*, 2010)



Figura 1.- *Ficus obtusifolia* Kunth (González-Castañeda., et al 2010)

2.9.1 Nombres comunes

Amate, amate prieto o texcalamate.

2.9.2 Taxonomía

Cuadro 1 Taxonomía de *Ficus obtusifolia* Kunth

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Viridiplantae</i>
División:	<i>Tracheophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	Rosales
Familia:	Moreceae
Género:	<i>Ficus</i>
Especie:	<i>Ficus obtusifolia</i>

2.9.3 Sinonimia del nombre científico

F. bonplandiana

F. involuta

2.9.4 Etnobotánica

El látex es usado como purgante para expulsar parásitos. Los frutos son alimentos de aves endémicas. Proporciona excelente sombra para el descanso de ganado. Ayuda a conservar la humedad en hondonadas y nacimientos de agua. Puede alcanzar 16 m de altura. Su tronco es corto y tiene una corteza grisácea. Su corona es generalmente de hoja y proporciona una gran sombra. Su fruto, conocido como higos, son comestibles y atraer a diversas especies de aves. La madera de este tipo se utiliza en la fabricación de recipientes de madera y contenedores, así como cajones, puertas y paneles centrales y producción de tableros de partículas y madera contrachapada (González, 2010)

El análisis fitoquímico de los extractos de *F. obtusifolia* Kunth reveló la presencia de taninos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, sapogeninas, lactonas, cumarinas, esteroides e isoprenoides (Sandabe, 2005).

2.10 Generalidades del palo de Brasil (*Haematoxylum brasiletto* Karst)

Son arbustos o árboles, que alcanzan un tamaño de 2–10 (12) m de alto, tronco profundamente estriado; ramas frecuentemente espiraladas y armadas con espinas

fuertes de hasta 2 cm de largo. Hojas paripinnadas, 5–8 cm de largo, foliolos generalmente 3 pares, obovados a suborbiculares, con frecuencia ampliamente cuneados, 1.5–3 cm de largo y 1–2.5 cm de ancho, ápice profundamente emarginado, base aguda. Inflorescencias racimos axilares, 1.5–3 cm de largo, con pocas flores, pedicelos 10–20 mm de largo, glabros; cáliz levemente campanulado, lobos 5, 5 mm de largo; pétalos 5, oblongos, 7–8 mm de largo, amarillos; estambres 10, libres, casi tan largos como los pétalos lanceolado-oblongo, plano, 3–8 cm de largo y 8–15 mm de ancho, membranáceo, delicadamente reticulado; semillas 2–3, transversales, oblongas, 6–9 mm de largo y 2–3 mm de ancho (CONABIO, 2009) (Cuadro 2, Figura 2).

Se distribuye desde México a Costa Rica, Colombia y Venezuela en la selva baja caducifolia y sabana, es una especie que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Es una planta silvestre y está asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, así como a bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino. (CONABIO, 2009)



Figura 2.- *Haematoxylum brasiletto* Karst (CONABIO, 2009)

2.10.1 Nombres comunes

Palo de brasil, azulillo o palo tinto.

2.10.2 Taxonomía

Cuadro 2 Taxonomía de *Haematoxylum brasiletto* Karst

Reino:	Plantae
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Género:	<i>Haematoxylum</i>
Especie:	<i>H. brasiletto</i>

2.10.3 Sinonimia del nombre científico

Haematoxylon boreale S.Watson

Haematoxylon brasiletto H.Karst (Linares, 2005)

2.10.4 Etnobotánica

Es muy frecuente el uso tradicional del tallo de palo Brasil, ya sea la corteza, madera o el "corazón" del tronco, en padecimiento del sistema cardiovascular. En Baja California Sur se usa en infusión o agua de uso para tratar hipertensión. En el Estado de México, para regular la presión arterial se toma el macerado rojizo del corazón del tallo. En Morelos, para purificar la sangre se usa la corteza y/o la madera remojada o su cocimiento. De igual forma, se utiliza la corteza y el tronco, hervidos o remojados, como agua de uso para los riñones, males renales. De igual manera se emplea en algunos malestares digestivos, mal de los dientes, úlceras gástricas y cáncer (Argueta, 2004). Se ha reportado la presencia de brasilina y hematoxilina en la madera de esta planta (Sánchez-Marroquin *et al.*, 1958, Pratt y Yuzuriha, 1959)

2.11 Generalidades de Mil hojas (*Phyllonoma laticuspis*)

Planta por lo común arbustiva, a veces a manera de árbol, hasta de 15 m de alto, ramas delgadas, flexibles; estípulas ovadas a triangulares, de 0.7 a 1.3 mm de largo por 0.5 a 1 mm de ancho, peciolas de 2 a 13 mm de largo, canaliculados dorsalmente, láminas lanceoladas a ovado-lanceoladas, de 1.6 a 10.3 cm de largo y

0.5 a 2.3 cm de ancho, brácteas ovadas; flores de color verde, verde-blanquecino, ocasionalmente con tintes púrpureos, sobre pedicelos de 0.5 a 3 mm de largo, hipantio usualmente más largo que ancho; sépalos triangulares, de 0.2 a 0.4 mm de largo por 0.2 a 0.5 mm de ancho, fimbriados en la base, libres entre sí, adnados al hipantio; pétalos ovados a ampliamente ovado-triangulares, de 0.9 a 1.2 mm de largo por 0.7 a 0.9 mm de ancho; filamentos de \pm 0.5 mm de largo, anteras globosas; estilo bifido, muy ocasionalmente trifido, de ca. 0.3 mm de largo; fruto globoso a subgloboso, de 5 a 7 mm de largo y 4.5 a 9 mm de diámetro, coronado en el ápice por restos del cáliz; semillas 2 a 9 por fruto, de 1.5 a 2.5 mm de largo por 0.9 a 1.7 mm de ancho (INECOL, 1999). Se distribuye desde México hasta Sudamérica. En México se ha registrado en los estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca y Veracruz en Bosque de Pinus-Quercus y bosque tropical caducifolio. En elevaciones de 1500-2350 m (INECOL, 1999).

2.11.1 Nombres comunes

Mil hojas, cuendilla o hierba de la viruela.

2.11.2 Taxonomía

Cuadro 3 Taxonomía de *Phyllonoma laticuspis*

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Rosales</i>
Familia:	<i>Phyllonomiaceae</i>
Género:	<i>Phyllonoma</i>
Especie:	<i>P. laticuspis</i>



Figura 3.- *Phyllonoma laticuspis* (CONABIO, 2009)

2.11.3 Sinonimia del nombre científico

Phyllonoma coriácea (García-Mendoza & Meave, 2011)

2.11.3 Etnobotánica

Es muy frecuente el uso tradicional de las hojas de “Mil hojas”. En la región de la montaña de Guerrero se usa en infusión para lavar heridas. De igual manera se emplea en algunos malestares digestivos, úlceras gástricas y cáncer (Argueta, 2004).

Un estudio fitoquímico reportó en *P. laticuspis* la presencia de Flavonoides, alcaloides, cumarinas, taninos y terpenos (Bello-Martínez, 2015)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud caracterizado por ser una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2012 se registraron 8.2 millones de muertes a causa de este padecimiento en el mundo y 14 millones de nuevos casos el mismo año, las plantas representan el patrimonio natural de las comunidades rurales y una fuente importante de compuestos contra el cáncer, por lo que es necesario contribuir en obtener nuevos compuestos más efectivos y con menos efectos secundarios, además de ser alternativas naturales contra los efectos del estrés oxidativo y contra el cáncer.

IV. OBJETIVOS

General

Aislar y caracterizar químicamente compuestos con actividad antiproliferativa y/o antioxidante, presentes en *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*.

Particulares

- a) Evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y fracciones de *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*.
- b) Evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos etanólicos y fracciones de *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*.
- c) Aislar y caracterizar químicamente los compuestos bioactivos, que determinan la actividad antioxidante y antiproliferativa de los extractos o fracciones de mayor actividad presentes en *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto*.
- d) Validar el uso empírico, que los habitantes de las comunidaes rurales realizan de *Phyllonoma laticuspis*, *Ficus obtusifolia* y *Haematoxylum brasiletto* como parte de la medicina tradicional y de su patrimonio cultural.

VI. MEDODOLOGÍA

Material Vegetal

Las plantas fueron recolectadas en varias regiones del estado de Guerrero, México, en marzo de 2015. Las plantas fueron identificadas taxonómicamente por la profesora María de los Ángeles Venalanzo Martínez en el Herbario de la Universidad Autónoma de Guerrero y un voucher les fue asignado (Cuadro 4). Las muestras colectadas fueron secadas a 40 °C en un secador de aire caliente.

Cuadro 4 Lista de plantas del estado de Guerrero, México estudiadas en su actividad antiproliferativa y antioxidante in vitro.

Planta	Nombre común	Voucher	Lugar de Colecta	Uso Medicinal
<i>Phyllonoma laticuspis</i>	Mil hojas	UAGROPLH15	Leonardo Bravo 99°48'34,67" W; 17° 34'26,95" N	Diarrea, infecciones y cáncer.
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Palo de Brasil	UAGROHBH15	Mochitlán 99° 21'19,03" W; 17°29'03,27" N	Infecciones , calculos renales y cancer.
<i>Ficus obtusifolia</i>	Amate Negro	UAGROFOH15	Chilpancingo 99° 22 '16" W; 17°09'25" N	Antiinflamatorio, cancer.

Preparación de extractos de plantas

Los extractos de plantas se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por González-Salvatierra *et al.* 2010. Brevemente, los extractos de las plantas *P. laticuspis* y *F. obtusifolia* se prepararon a partir de muestras de hojas secadas al aire (1 kg) finamente trituradas; el extracto de *H. brasiletto* se obtuvo con polvo de duramen (1 kg); se maceraron con etanol a una proporción 3:1 P/V a temperatura ambiente durante un período de 10 días con breve agitación manual dos veces al día.

Los extractos etanólicos se evaporaron a presión reducida, el residuo se resuspendió en 200 mL de una mezcla (3:2 agua/metanol), esta suspensión se fraccionó con n-hexano (Hx) (2:1, 1:1, 1:1, V/V), diclorometano (CH₂Cl₂)(2:1, 1:1, 1:1,

V/V) y acetato de etilo(AcOEt) (2:1, 1:1, 1:1, V/V). Cada una de las fracciones orgánicas fueron evaporadas a presión reducida. Todos los extractos y fracciones se almacenaron a -4 ° C en viales de vidrio ámbar hasta su uso.

Aislamiento de metabolitos bioactivos de *H. brasiletto*

El aislamiento de compuestos bioactivos se realizó por métodos cromatográficos; la cromatografía en columna (CC) se realizó usando gel de sílice 60 (malla 70-230, Sigma), mientras que para CC flash se usó silica gel 200-400 malla (Sigma). Las purificaciones de cromatografía líquida en vacío (VLC) se llevaron a cabo utilizando gel de sílice de calidad TLC (Merck). Las purificaciones de TLC preparativa en gel se realizaron usando placas de gel de sílice de 20x20 cm respaldadas con vidrio (2,0 mm de espesor, Merck). Para los procedimientos analíticos por TLC, se utilizaron placas de gel de sílice respaldadas con aluminio (E.M. Merck, 0,2 mm de espesor). Los cromatogramas se examinaron bajo luz UV y luego se visualizaron por sumersión de las placas en una solución de ácido fosfomolibdico (20 g) y sulfato cérico (2,5 g) en 500 ml de ácido sulfúrico (5%), seguido de secado y calentamiento (Zapata-Estrella, *et al.*, 2014).

Mediante la purificación por VLC de la fracción de diclorometano bioactivo (5 g), utilizando una elución en gradiente con mezclas de CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH, se generaron 11 fracciones principales (3A-3K). La fracción 3B (1.5 g) se purificó por CC eluyendo con n-hexano:EtOAc:MeOH (45:50:5) para producir 8 nuevas fracciones (4A-4H). La fracción 4C (152.5 mg) se purificó usando una TLC preparativa de elución múltiple (3x) eluyendo con EtOAc:CHCl₃:MeOH (70:30:10 +50 µL de ácido fórmico/10 ml de solución) dando como resultado el aislamiento de (54 mg) de un compuesto cristalino color rojo.

Elucidación estructural

El compuesto purificado se identificó mediante la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los de la literatura (Craig, *et al.*, 1965) Los espectros de RMN (1H, 13C, DEPT 135 y DEPT 90) y dos experimentos dimesionales (COSY, HSQC y HMBC) se adquirieron en un Bruker Avance III 400 MHz. El compuesto se analizó en MeOH-d₄ con tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

DART-MS se midieron usando un AccuTOF JMS-T100LC e identificando ion positivo $[M+H]^+$. Los espectros IR se tomaron en un espectrómetro Bruker Tensor 27.

Actividad Reductora de radicales libres (ensayo de DPPH)

La actividad antioxidante se determinó mediante la evaluación de la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). Se preparó una curva de calibración de la decoloración de DPPH por diferentes concentraciones de Trolox (Sigma-Aldrich) en metanol. Se utilizó metanol como blanco y una solución al 1% de Trolox en metanol como control positivo. Se añadió un volumen igual del disolvente usado para disolver las muestras a los tubos de control. Las mediciones se realizaron por triplicado. La concentración inicial de DPPH se calculó a partir de la curva de calibración usando la ecuación determinada por regresión lineal. Las mediciones de la actividad antioxidante se llevaron a cabo añadiendo alícuotas de DPPH a una solución al 1% de metanol de las muestras de ensayo. Después de 30 minutos, se midió la absorbancia a 517 nm usando un espectrofotómetro; La actividad de eliminación de radicales DPPH se calculó usando la siguiente fórmula: % de decoloración = $(1 - (A_e / A_c)) \times 100$, donde A_e y A_c son la absorbancia del extracto y el control, respectivamente. La actividad antioxidante se expresó como EC_{50} , es decir, la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Molyneux, 2003).

Capacidad reductora del radical ABTS

Para la preparación de la solución radical, se disolvieron 19.3 mg de ABTS en 5 ml de agua destilada, se añadieron 88 μ l de una solución de 140 μ M de $K_2S_2O_8$ (persulfato de potasio) y se dejó reposar durante 16 horas a oscuras a temperatura ambiente. Después de preparar la solución de etanol para alcanzar una absorbancia de 0.7 a 730 nm, se colocaron 295 μ L de la solución en una placa de 96 pocillos, a los que se añadieron 5 μ l de extractos de etanol y fracciones, se dejó en reposo durante 5 Minutos a temperatura ambiente y se lee en un lector de ELISA (BIO RAD iMark) usando una longitud de onda de 730 nm. Se realizó el mismo procedimiento para

obtener una curva de calibración con Trolox (Sigma-Aldrich) como control y para calcular equivalentes trolox (mg/mL) (Kuskoski, *et al.*, 2004).

Cultivo y líneas celulares

Líneas celulares; ARPE-19 (Epitelio pigmentado retinal humano), HeLa (carcinoma humano de cervix), SiHa (células escamosas de carcinoma de cervix humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano de células epiteliales de glándulas mamarias), NCI-H1299 (carcinoma humano de pulmón; células no pequeñas), A549 (adenocarcinoma alveolar humano), LS 180 (adenocarcinoma colorectal humano) y L-929 (tejido conectivo subcutáneo murino normal) fueron obtenidas de The American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). RAW 264.7 (leucemia de macrófagos transformadas por el virus de Albenson) fueron proporcionadas por el Dr. Emil R. Unanue del Departamento de patología e Inmunología de la Universidad de Washington. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagles's Medium (Sigma-Aldrich™) suplementado al 5% con suero fetal bovino (Gibco®) (D5F), a 37°C en una incubadora (Thermo Fisher Scientific) con una atmósfera al 5% de CO₂. La manipulación de los cultivos celulares se llevó a cabo en un gabinete de bioseguridad tipo II (LABCONCO®) equipada con filtros HEPA. (Rascón-Valenzuela, *et al.*, 2015; Torres Moreno, *et al.*, 2015).

Ensayo de proliferación celular

Para evaluar el efecto de extractos de plantas sobre la proliferación de líneas celulares, se determinó la proliferación celular usando el ensayo estándar de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983). Brevemente, se añadieron 10,000 células (50 µL) en cada pocillo de una placa plana de 96 pocillos. Después de 12 h de incubación a 37 ° C en una atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la unión celular, los cultivos celulares se incubaron con 50 µL de medio que contenía diferentes concentraciones de extracto o fracciones crudas y los cultivos celulares se incubaron durante 48 h.

El extracto crudo o fracción se disolvió primero en DMSO y luego se diluyó en D5F. Los cultivos de células de control se incubaron con DMSO (concentraciones

finales de DMSO 0,06% -0,5%). En las últimas 4 h del cultivo celular, se añadieron 10 μ L de solución madre de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo. Los cristales de formazán se disolvieron con isopropanol ácido y las placas se leyeron en un lector de placas ELISA, usando una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. La absorbancia de los pocillos fue leída dentro de los 15 minutos de adición de isopropanol. La actividad antiproliferativa de los extractos se informó como valores de IC₅₀ (se definió como la concentración de extracto evaluada que inhibe la proliferación celular en un 50%) (Torres-Moreno, *et al.*, 2015). Los valores de proliferación de al menos tres experimentos, por triplicado, se transformaron logaritmicamente, se normalizaron y se utilizó un análisis de regresión no lineal para generar una curva dosis-respuesta para calcular los valores de IC₅₀. Las diferencias en las medias se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA unidireccional) seguido por el test de Tukey GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante procedimientos de ANOVA. Una prueba post-hoc (Tukey) se llevó a cabo cuando las diferencias mostradas por los datos fueron significativas ($p < 0,05$) SAS (versión 10,0)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de *H. brasiletto* y *F. obtusifolia* y sus correspondientes fracciones mostraron que el mayor contenido de antioxidantes fue similar en ambas fracciones de acetato de etilo de las dos especies. Las fracciones con mayor actividad fueron acetato de etilo en *F. obtusifolia* ($55.0 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$), seguido de fracciones de *H. brasiletto* acetato de etilo y diclorometano ($63.0 \pm 6.3 \mu\text{g/mL}$) y ($60.0 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$) respectivamente.

El ensayo de DPPH para los valores de IC_{50} muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies (Cuadro 5). La planta *P. laticuspis* no mostró actividad antioxidante significativa. También para el ensayo ABTS+, existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los extractos y fracciones de *H. brasiletto* y *F. obtusifolia*. Los mejores valores presentaron la fracción de acetato de etilo de *F. obtusifolia*. ($149.2 \pm 9.2 \mu\text{g/ml}$) y una fracción de acetato de etilo de *H. brasiletto* ($162.8 \pm 21.9 \mu\text{g/ml}$). El extracto etanólico y las fracciones de *P. laticuspis* no mostraron actividad antioxidante significativa.

De acuerdo con estos resultados, se recomienda explorar las características estructurales de los compuestos presentes en las fracciones de diclorometano y acetato de etilo de *H. brasiletto*, mediante fraccionamiento por cromatografía para aislar y purificar metabolitos con actividad antioxidante prometedora para ensayos *in vivo* adicionales.

Al compararse los datos registrados en el cuadro 5 se puede observar variaciones en los resultados de actividad antioxidante por el método DPPH y ABTS, en ambos métodos se aprecia que *Haematoxylum brasiletto* y *Ficus obtusifolia* son las plantas que presentan la mayor actividad antioxidante de las plantas evaluadas, sin embargo, existe una variación en los resultados que se debe a la naturaleza del radical: ABTS es un radical catión que se reduce mediante la donación de electrones por parte del antioxidante, lo que genera una decoloración durante el ensayo el cual se puede cuantificar espectrofotométricamente, esta característica intrínseca del radical hace que la reducción del mismo sea relativamente rápido (5 minutos) durante la exposición

al antioxidante, sin embargo es susceptible a cambios en su conformación química por factores externos como la temperatura y la luz. En cambio, el método del radical DPPH se basa en la donación de un protón para estabilizar a un electrón que se encuentra deslocalizado en toda la molécula, esta característica química del DPPH lo hace más estable y relativamente menos susceptible a factores extrínsecos como la temperatura y la luz, al mismo tiempo la reducción del radical es más lenta durante el ensayo (30 minutos) cuando se expone al agente antioxidante; esta diferencia entre ambos radicales hace que los experimentos evalúen dos características diferentes en cuanto el mecanismo de acción de los antioxidantes, por lo que el valor de los resultados puede variar de un método a otro (Meléndez, *et al.*, 2014; Zenbio, 2010).

Cuadro 5 Actividad antioxidante de extractos y fracciones de *P. laticuspis*, *H. brasiletto* y *F. obtusifolia* mediante los ensayos de DPPH y ABTS+

Planta	DPPH CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS ⁺ CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Phyllonoma laticuspis</i>		
Extracto etanólico	420.0 \pm 10.9	1139.56 \pm 55.9
Fracción hexánica	311.0 \pm 20.3	843.89 \pm 64.9
Fracción diclorometano	342.0 \pm 25.8	927.91 \pm 97.3
Fracción acetato de etilo	155.0 \pm 19.3	420.64 \pm 35.9
<i>Haematoxylum brasiletto</i>		
Extracto etanólico	83.0 \pm 3.7	225.2 \pm 19.9
Fracción hexánica	347.0 \pm 5.1	941.48 \pm 38.9
Fracción diclorometano	63.0 \pm 6.3	170.9 \pm 11.3
Fracción acetato de etilo	60.0 \pm 3.3	162.8 \pm 21.9
<i>Ficus obtusifolia</i>		
Extracto etanólico	92.0 \pm 1.9	249.6 \pm 31.6
Fracción hexánica	211.0 \pm 3.7	572.5 \pm 45.1
Fracción diclorometano	242.0 \pm 9.9	656.6 \pm 47.9
Fracción acetato de etilo	55.0 \pm 1.5	149.2 \pm 09.2

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los extractos en las líneas celulares A549, RAW 264.7 y L929 se evaluó utilizando el ensayo MTT, que demuestra la actividad mitocondrial de las células y se usa habitualmente como medida de la viabilidad celular. Los resultados se muestran en el cuadro 6.

El extracto de *F. obtusifolia* mostró la mayor actividad antiproliferativa de una manera dosis dependiente, con mayor actividad contra las células A549 y RAW 264.7 (IC₅₀ 89.31 ± 6.78 µg/mL y 48.23 ± 1.50 µg/mL, respectivamente), seguido por el extracto de *H. brasiletto* con valores de 106.57 ± 8.14 y 58.10 ± 3.11 µg/mL frente a A549 y RAW 264.7 respectivamente. El extracto de *P. laticuspis* no mostró evidencia de actividad antiproliferativa a la concentración máxima evaluada.

Para determinar si los extractos tenían citotoxicidad inespecífica en cualquier tipo de célula, también se probó el efecto sobre el crecimiento de L929, una línea celular no cancerosa de tejido conectivo subcutáneo. En esta línea celular, el extracto de *H. brasiletto* mostró una IC₅₀ de 61.57 ± 7.90 µg/mL, *F. obtusifolia* de 94.87 ± 4.43 µg/mL y *P. laticuspis* no mostró evidencia de actividad antiproliferativa a la concentración máxima ensayada de 400 µg/mL (Cuadro 6)

Se evaluaron otras fracciones de diferentes extractos, en las que la fracción de diclorometano de *H. brasiletto* mostró la actividad más antiproliferativa con valores de 22.57 ± 0.86 µg/mL, 23.87 ± 0.84 µg/mL y 30.89 ± 0.84 µg/mL frente a A549, L929 y RAW 264.7, respectivamente. *P. laticuspis* no mostró actividad antiproliferativa significativa en las concentraciones evaluadas en este estudio.

Además de la actividad antiproliferativa significativa, como se mencionó anteriormente, la fracción de diclorometano de *H. brasiletto* presentó la mejor actividad antioxidante. Los eventos de daño celular oxidativo se correlacionan a menudo con el estrés oxidativo, de modo que la presencia de ambas propiedades en este extracto podría ser beneficiosa con fines preventivos o terapéuticos. Dado que los resultados preliminares aquí presentados son muy prometedores, es muy importante explorar el aislamiento de compuestos puros responsables de estas actividades.

Cuadro 6 Actividad Antiproliferativa de extractos y fracciones de *P. laticuspis*, *H. brasiletto* y *F. obtusifolia* en tres líneas celulares, mediante el ensayo de MTT.

Planta	IC ₅₀ a ± SD (µg/mL)		
	A549	RAW 264.7	L 929
<i>Phyllonoma laticuspis</i>			
Extracto etanólico	— ^b	— ^b	— ^b
Fracción hexánica	— ^b	— ^b	— ^b
Fracción diclorometano	— ^b	— ^b	— ^b
Fracción acetato de etilo	— ^b	— ^b	— ^b
<i>Haematoxillum brasiletto</i>			
Extracto etanólico	106.57±8.14	58.10±3.11	61.57±7.90
Fracción hexánica	— ^b	— ^b	— ^b
Fracción diclorometano	22.57±0.86	23.87±0.84	30.89±0.84
Fracción acetato de etilo	84.83±6.68	42.60±1.34	55.54±0.83
<i>Ficus obtusifolia</i>			
Extracto etanólico	89,31 ± 6,78	48.23±1.50	94.87±4.43
Fracción hexánica	48.13 ± 4.84	42.21±2.11	57.28±3.65
Fracción diclorometano	78.02 ± 11.2	51.71±1.32	59.01±1.39
Fracción acetato de etilo	— ^b	— ^b	— ^b

a 50% Concentración inhibitoria.

b — = IC₅₀ > 400 g/mL.

Flavonoide aislado del extracto de etanol de *H. brasiletto*

La purificación de la fracción de diclorometano de un extracto etanólico del duramen de *H. brasiletto* condujo al aislamiento de un compuesto conocido: brazilina, (C₁₆H₁₄O₅)(6aS,11bR)-7,11b-Dihidro-6H-indeno[2,1-c]cromeno-3,6a,9,10-tetrol (Fig. 4), caracterizado por sus datos espectroscópicos (¹H RMN, RMN ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC y IR, Anexos 1 al 5) y por comparación con los valores publicados (cuadro 7), este compuesto se describió previamente (Craig, *et al.*, 1965).

El neoflavonoide brazilina, ha sido previamente aislado de *H. brasiletto* (Sánchez-Marroquin, *et al.*, 1958, Pratt y Yuzuriha, 1959) y *Caesalpinia sappan* (Nguyen, *et al.*, 2005).

Rivero-Cruz (2008) reportó que la brazilina inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* 375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus*

faecium 379. Además, la brazilina se describió como inhibidor de enzimas NO sintasa (Sasaki, *et al.*, 2007), xantina oxidasa (Nguyen, *et al.*, 2005), proteína quinasa C (Kim, *et al.*, 1998) y aldosa reductasa (Moon, *et al.*, 1985). Sin embargo, no hay informes de investigación de actividad antiproliferativa inducida por brazilina en líneas celulares.

Cuadro 7 Datos de análisis espectroscópicos de brazilina

C n°	¹³C^a	¹H^b (m, J en Hz)
1	131.35	7.17 (dd, 8.3, 0.8)
1a	115.58	
2	112.45	6.70 (s)
3	157.86	
4	109.96	6.46 (dd, 8.3, 2.5)
4a	155.72	
6	78.09	3.68 (d, 11.3) 3.92 (d, 11.3)
6a	70.87	
7	42.92	2.76 (d, 15.7) 3.01 (d, 15.5)
7a	132.21	
8	112.86	6.59 (s)
9	137.46	
10	145.34	
11	104.28	6.28 (d, 2.5)
11a	145.65	
12	51.09	3.95 (s)

^a Los desplazamientos químicos (δ) son expresados en (ppm). Espectro realizado con CD₃OD a 100.6 MHz

^b Los desplazamientos químicos (δ) son expresados en (ppm). , multiplicidad (m) constante de acoplamiento en Hertz (Hz). Espectro realizado con CD₃OD a 400 MHz.

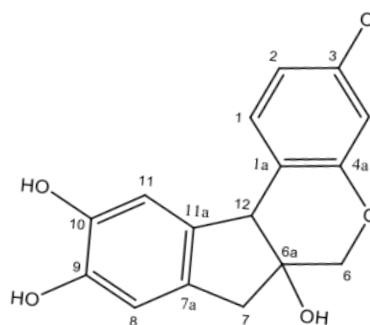


Figura 4.- Estructura química del flavonoide brazilina

Actividad antiproliferativa de Brazilina

Se evaluó el flavonoide aislado de la fracción de diclorometano de *H. brasiletto* en sus efectos sobre la proliferación de un panel de seis líneas celulares de cáncer humano (A549, LS180, H1299, HeLa, SiHa y MDA-MB-231) y una línea no cancerosa (ARPE-19). El agente quimioterapéutico de amplio espectro, la doxorrubicina, se incluyó como control positivo y con fines de comparación, debido a que puede inducir la apoptosis para la intercalación en el ADN y la interrupción de la reparación del ADN de la topoisomerasa II (Thorn, *et al.*, 2011). Los resultados se presentan en el cuadro 8 y Fig 5.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de brazilina (cuadro 8), resultando que produce un efecto inhibitor moderado sobre el crecimiento en las líneas celulares humanas, SiHa, MDA, A549 y H1299 con valores de IC_{50} de 44.29, 48.69, 45.44 y 48.73 μ M, respectivamente. En LS180 y HeLa se observó un efecto bajo a IC_{50} 62.21 y 71.96 μ M, respectivamente. Brazilina mostró un efecto antiproliferativo moderado sobre la línea celular no cancerosa ARPE-19 con valores de IC_{50} de 37.94 μ M, lo que sugiere que la actividad antiproliferativa de brasilina es de tipo no selectivo.

Se han descrito los flavonoides con efecto antiproliferativo, como la kaempferitrina y la curcumina (Alonzo-Castro, *et al.*, 2013). Se sabe que ROS, incluyendo el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, son

conocidos por mediar la apoptosis inducida por algún cáncer quimiopreventivo Y agentes terapéuticos (Davis, *et al.*, 2001). Además, la curcumina induce la hipometilación del promotor miR-203 y la posterior regulación positiva de la expresión de miR-203. Esto conduce a la regulación negativa de los genes objetivo de miR-203 Akt2 y Src que culmina en la disminución de la proliferación y el aumento de la apoptosis de las células de cáncer de vejiga (Saini, *et al.*, 2011). Kaempferitrin probablemente induce tanto la transcripción independiente y las vías dependientes de p53 porque regula las proteínas proapoptóticas y regula las proteínas antiapoptóticas. Además, se ha descrito que un aumento en los niveles de p53 conduce a la detención del ciclo celular en la fase G1 (Haupt, *et al.*, 2003).

Sin embargo, la brazilina es más activa que otros compuestos, como el 5-fluorouracilo, usualmente usado en terapia clínica antitumoral a IC₅₀ mayor que 100 µM en HeLa, y también otros productos naturales aislados de propóleos de Sonora en México, como el CAPE, Galangina, xantomicro, exhiben una IC₅₀ ≥ 60 µM en líneas celulares HeLa y A549 (Torres-Moreno, *et al.*, 2015). Por otra parte, la kaempferitrina, aislada de *Justicia spicigera*, presenta IC₅₀ mayor que 45 µM en HeLa (Alonzo-Castro, *et al.*, 2013).

Cuadro 8 Actividad antiproliferativa in vitro de brazilina en siete líneas celulares mediante el ensayo de MTT.

	Líneas celulares IC ₅₀ (µM)						
	A549	LS 180	H1299	HeLa	SiHa	MDA	ARPE19
Brazilina	45.4±3	62.2±3	48.7±2	71.9±2	44.3±1	48.7±2	37.9±0.7
Doxorrubicina	8.3±02	4.7±03	6.5±08	5.6±02	4.1±01	4.6±0.4	7.8±0.6

IC₅₀ valores representan la media y desviación estandar (±SD; n = 3) de tres experimentos independientes.

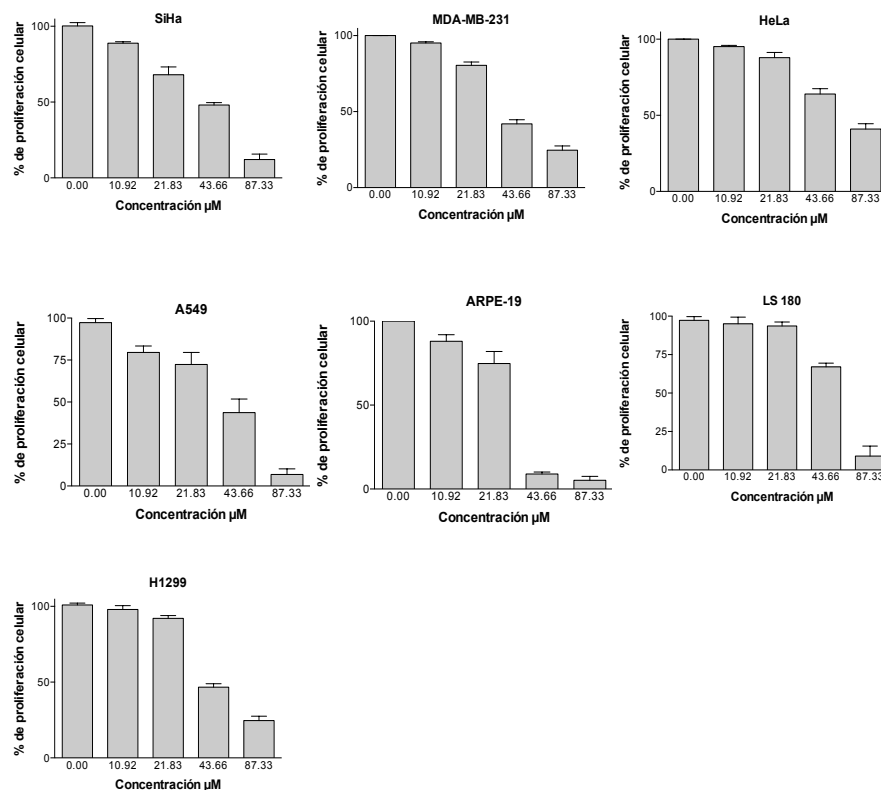


Figura 5.- Actividad antiproliferativa de brazilina en lineas celulares SiHa, MDA-MB-231, HeLa, A549, ARPE-19, LS 180 y H1299.

Las comunidades rurales utilizan como patrimonio cultural a *H. brasiletto* para padecimientos del sistema cardiovascular, hipertensi3n, males renales, malestares digestivos, mal de los dientes, ulceras gástricas y c3ncer (Argueta, 2004) 3stos padecimientos est3n relacionados con el desbalance de radicales libres en el organismo a consecuencia de la contaminaci3n ambiental, la exposici3n a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos qu3micos en alimentos procesados y algunos xenobi3ticos como plaguicidas, herbicidas y fungicidas (Finkel-Holbrook, 2000), los resultados obtenidos muestran que *H. brasiletto* contiene metabolitos con actividad antioxidante y dado que los antioxidantes juegan un papel

importante en la prevención y tratamiento de patologías que involucran el estrés oxidativo incluyendo al cáncer (OMS, 2015) por lo que el uso empírico por parte de las comunidades es adecuado. Los resultados obtenidos, muestran que *H. brasiletto* contiene el flavonoide *Brazilina*, y éste metabolito tiene una actividad antiproliferativa importante en las líneas celulares cancerosas estudiadas (cuadros 6 y 8, fig 5), por lo que el consumo de esta planta por parte de las comunidades rurales puede prevenir y combatir problemas de cáncer, por esta razón la importancia del presente trabajo, en la dilucidación de la actividad antiproliferativa y antioxidante de tres especies vegetales, rescatando el patrimonio natural y cultural de la región de la montaña de Guerrero.

Ficus obtusifolia y *Haematoxylum brasiletto*, son recursos que se encuentran distribuidos en el territorio mexicano (Argueta, 2004) lo que permite tener dichos recursos disponibles, además debe preverse un plan de manejo de estas especies para no sobreexplotar estas especies en caso de utilizarlas de manera extensiva para no ocasionar desequilibrio en los ecosistemas.

En el caso de *Phyllomona laticuspis*, sus extractos no mostraron actividad antioxidante ni actividad antiproliferativa significativa (cuadros 5 y 6) en las concentraciones evaluadas en este estudio; sin embargo debe tener especial atención en su uso ya que esta especie se encuentra en una distribución limitada en bosques de pino-encino en la sierra de Guerrero (CONABIO, 2009) así como en la lista roja de la International Union Conservation Nature (IUCN), y en la Norma Oficial Mexicana-059- SEMARNAT-2010 (NOM-059-SEMARNAT-2010) en la categoría como especies en peligro de extinción.

Se sugiere profundizar en investigaciones con el flavonoide *brazilina* para determinar el tipo de muerte celular y las vías de señalización que se encuentran implicadas en dicho proceso. También purificar las fracciones hexánica y de acetato de etilo de *F. obtusifolia*, para caracterizar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa y antioxidante respectivamente.

IX. CONCLUSIONES

El extracto etanólico del duramen de la madera de *Haematoxylum brasiletto* presentó tanto actividad antioxidante como antiproliferativa.

Se aisló e identificó a brazilina como el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en las líneas celulares A549, LS180, H1299, HeLa, SiHa y MDA-MB-231.

La mayor actividad antiproliferativa de Brazilina se observó en la línea celular SiHa, y A549 con valores de IC₅₀ de 44.29 y 45.44 μ M, respectivamente.

Ficus obtusifolia presentó actividad antioxidante en la fracción de acetato de etilo, y actividad antiproliferativa en la fracción hexánica.

El extracto y fracciones de *Phyllonoma laticuspis* no presentaron evidencia actividad antioxidante ni antiproliferativa, con la metodología utilizada.

El conocimiento empírico y cultural de los pueblos originarios en el uso de plantas medicinales como *H. brasiletto*, *F. obtusifolia* y *P.laticuspis* que se ha preservado hasta nuestros días, para la prevención y curación de diversas enfermedades; se comprueba mediante esta investigación que el consumo de *H. brasiletto*, *F. obtusifolia* es adecuado y recomendado como antioxidante y antiproliferativo

X. REFERENCIAS

- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A., (2012). Antitumoral and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schtdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141, 888–894
- Alonzo-Castro, A.J.; Ortiz-Sánchez, E.; García-Regalado, A.; Ruiz, G.; Núñez-Martínez, J.M.; González-Sánchez, I.; Quintanar-Jurado, V.; Sánchez-Morales, E.; Domínguez, F.; López-Toledo, G.; Cerbón, M.A.; García-Carrancá A. (2013). Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *Journal of Ethnopharmacology* 145,476–489.
- Argueta, A., (2004). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, vol.1. Instituto Nacional Indigenista, México City, México.
- Bello-Martínez, J., Morales, R.J., Nájera, H.A., Rosas, A.J.L.(2015). Polifenoles y actividad antioxidante de extractos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz) Engl. *Tlamati*. 6(4), 20-23.
- Bergstrom, R., (2012). Drivers of the cost of cancer care. *Lancet Oncology* 13, 14–15.
- Böhm, H., J. Hempel, B. Raab & A.Z. Kroke. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Mnahrungswiss* 37: 147-63.
- Céspedes Cabrera, T., Sánchez Serrano, D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*, Vol. 14, No.1, pp 55-60.
- CONABIO. (2009). CATÁLOGO taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.
- Craig, J.C., Naik, A.R., Pratt, R., Johnson, E., (1965). Nuclear magnetic spectra and stereochemistry of the antibacterial principle of *Haematoxylon braziletto*. *Journal of Organic Chemistry* 30, 1573–1576.
- Davis Jr., W., Ronai, Z., Tew, K.D., (2001). Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental*

- Therapeutics*. 296, 1–6.
- Devasagayam TP, Sainis KB. (2002). Immune system and antioxidants, especially those derived from Indian medicinal plants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40:639–655.
- Finkel T., Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, Vol. 408, pp. 239-247.
- González Castañeda, N., Cornejo Tenorio, G., Ibarra Manríquez, G., (2010). El género ficus (Moraceae) en la provincia biogeográfica de la depresión de Balsas, México. *Boletín Sociedad Botánica de México*, 1(87), pp. 105-124.
- García-Mendoza, A. J. & J. A. Meave. (2011). Diversidad florística de Oaxaca: de musgos a angiospermas (colecciones y lista de especies). Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. 351 pp.
- González-Salvatierra, C., Andrade, J. L., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K. y Peña-Rodríguez L.M. (2010). Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. *Journal of Plant Physiology*, doi:10.1016/j.jplph.2010.01.0012001.
- Gordaliza, M., (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9: 767–776.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y., (2003). Apoptosis the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116: 4077–4085.
- Hemendra S. Chouhan and Sushil K. Songh. (2011). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137:1337-1344.
- Heredia, N., Escobar, M., Rodriguez-Padilla, C., Garcia, S., (2005). Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Journal of Food Protection*, 68:1346–1351.
- Hsu CY. (2006). Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biological Research*, 39:281–288.
- Inecol (2016) www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2074.pdf

- INEGI. 2016. Estadísticas a Propósito de Día Mundial Contra el Cáncer (2 de Febrero). Inst Nac de Est y Geo , p. 1-10.
- Javvadi P, Segan AT, Tuttle SW, Koumenis C. (2008). The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen- activated protein kinase pathway. *Molecular Pharmacology*. 73:1491-1501.
- Jimenez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Velázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., Burgos-Hernández, A., Robles-Zepeda, R.E., (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complement. Alternative Medical*. 13, 12.
- Kalekar S., Munshi R., Thatte U. (2013). Do plants mediate their antidiabetic effects through antioxidant and anti-apoptotic actions An *in vitro* assay of 3 Indian medicinal plants. *Complementary and Alternative Medicine*, 13:257.
- Kim, G.-G., Kim, Y.-M., Khil, L.-Y., Jeon, S.-D., So, D.-S., Moon, C.-H., Moon, C.-K., (1998). Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. *Archives of Pharmacal Research*, 21:140–146.
- Kintzios SE, Barberaki MG. (2004). Plants that fight cancer. Boca Raton: CRC Press.
- Kuskoski E.M, Asuero A.G, García-Parrilla M.C, Troncoso A.M, Fett R. (2004). Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos Campinas*. 24(4):691-693.
- Laso Guzmán, F.J., (2011). *Introducción a la medicina clínica: fisiopatología y semiología*, 2º Edición, Ed. Elsevier Mason, Impreso en España, pp. 4-5.
- Linares, J. L. 2003 [2005]. Listado comentado de los árboles nativos y cultivados en la república de El Salvador. *Ceiba* 44(2): 105–268.
- Maldonado Saavedra O., Jiménez Vázquez E., Guapillo Vargas G., Ceballos Reyes G., Méndez Bolaina, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica UV*, Vol. 10, pp. 32-39.
- Mark S. Butler. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.

- Meléndez, N.P, Nevárez-Moorillón V, Rodríguez-Herrera R, Espinoza J. C, Aguilar C.N. (2014). A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal Biochemical Research*, 8(1):14-18.
- Mendiola, J.A., Martín Alvarez, P.J., Señorans, F.J., Reglero,G., Capodicasa, A.F., Nazzaro, F., Sada, A., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2009). Diseño de nuevos antioxidantes de origen vegetal para la industria cárnica empleando métodos quimiométricos. *V Iberolab*, pp. 1-6.
- Molyneux P. (2003). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26: 211–219.
- Moon, C.K., Yun, Y.P., Lee, J.H., Wagner, H., Shin, Y.S., (1985). Inhibition of lens-aldose reductase activity by brazilin and hematoxylin. *Planta Medica*, 66–67.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65:55–63.
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Hara Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical. Biology and Medicine*; 21:895–902.
- Nguyen, M.T.T., Awale, S., Tezuka, Y., Le Tran Q., Kadota, S., (2005). Xanthine oxidase inhibitors from the heartwood of vietnamese *Caesalpinia sappan*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53, 984–988.
- NIH. 2012. Cell Biology and Cancer. Colorado Springs: National Institutes of Health
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Norma Oficial Mexicana- 059- SEMARNAT-2010 (NOM-059-SEMARNAT-2010).
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 08 de noviembre de 2016, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Pratt, R., Yuzuriha, Y. (1959). Antibacterial activity of the heartwood of *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 48, 69–72.

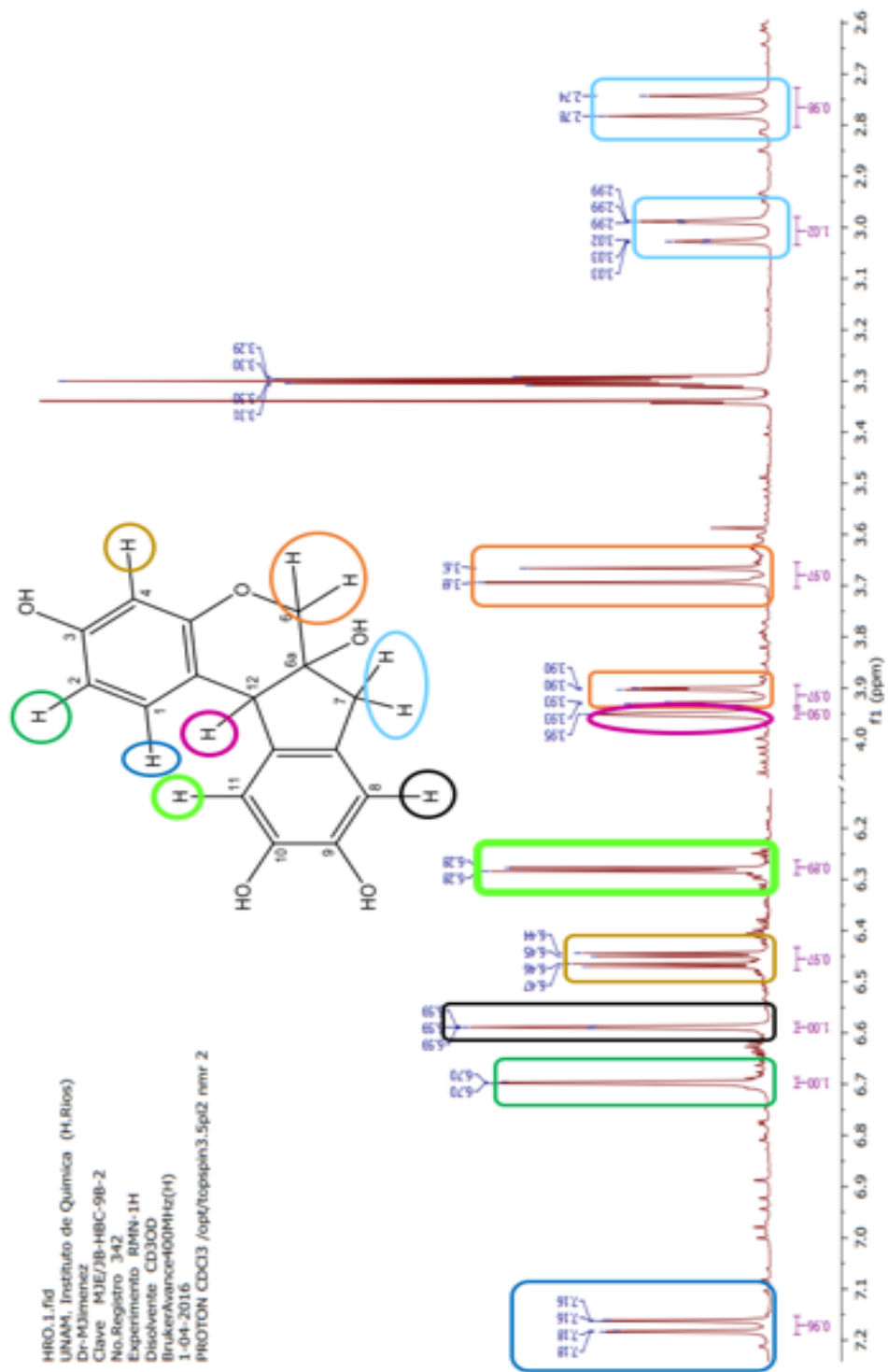
- Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Coqueiroc, A., Robles-Zepeda, R.E., (2015). Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*. 69, 48–54
- Rascón-Valenzuela, L., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, Medina-Juárez, L.A., Vilegas, W., Robles-Zepeda, R.E. (2015). Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 171. 280–286.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews* 23, 519–534.
- Rivero-Cruz, J.F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*. 119. 99–103.
- Saini S, Arora S, Majid S, Shahryari V, Chen Y, Deng G, Yamamura S, Ueno K, Dahiya R. (2011). Curcumin modulates microRNA-203-mediated regulation of the Src-Akt axis in bladder cancer. *Cancer Prevention Research (Phila)*. 4:1698-1709.
- Sanchez-Marroquin, A., Garcia, L., Mendez, M. (1958). Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 1, 225–232.
- Sandabe U.K, Onyeyili P.A, Chibuzo G.A (2005). Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*; 104: 283-5.
- Sasaki, Y., Hosokawa, T., Nagai, M., Nagumo, S., (2007). In vitro study for inhibition of NO production about constituents of *Sappan lignum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 193–196.
- Sati S.C., Sati N, Rawat U, Sati OP. (2010). Medicinal plants as a source of antioxidants. *Journal of Research Phytochemistry*, 4:213–224.
- Ślusarczyk S, Hajnos M, Skalicka-Woźniak K, Matkowski (2009). Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry*. 113:134–138.
- Teixeira S, Siquet C, Alves C, Boal I, Marques M, Borges F, Lima JLF, Reis S. (2005). Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radical Biology and Medicine*, 39:1099–1108.

- Thorn, C., Oshiro, C., Marsh, S., Hernández, T., McLeod, H., Klein, T., Altman, R. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics* 21, 440–446.
- Torres-Moreno, H., et al. (2015). Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products* 77 (2015) 895–900.
- Torres I.B. y Quintana I.J. 2004. Análisis comparativo sobre el empleo de plantas medicinales en la medicina tradicional de Cuba e Islas Canarias. *Rev. Cubana Plantas Medicinales* 9:9-14.
- Ueda J, Tezuka Y, Banskota AH, Tran Q, Harimaya y, Saiki I, et al. Antiproliferative activity of vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25:753-60.
- Velázquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Domínguez Z, Robles R, Robles-Zepeda R, Lugo E, Goycoolea FM, Velázquez EF, Astiazaran H, Hernández J: Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal Applied Microbiology* 2007, 103:1747–1756.
- Venéreo Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. Vol. 31, No.2, pp. 126-133.
- Villarreal I.E.C., García L.E., López P.A., Palma L.D.J., Lagunes E.L.C., Ortiz G.C.F. y Oranday C.A. 2014. Plantas útiles en la medicina tradicional de Malpasito-huimanguillo, Tabasco, México. *Polibotánica* 37:1405-2768.
- World Health Organization, Prevalence data of cancer worldwide. Available at: [/http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/index.html),(accessed september 6, 2016).
- Yanping Z, Yanhua L, Dongzhi W: Antioxidant activity of a Flavonoid-Rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52:5032–5039.
- Yuang, I. 2007. Antioxidant from edible seaweed. *ACS Symposium Series* 956:268-301.
- Zapata-Estrella, et al (2014). Bioactive Metabolites from *Cnidioscolus souzae* and *Acmella pilosa*. *Natural Products Communications*, Vol. 9 (9):1319- 1321.

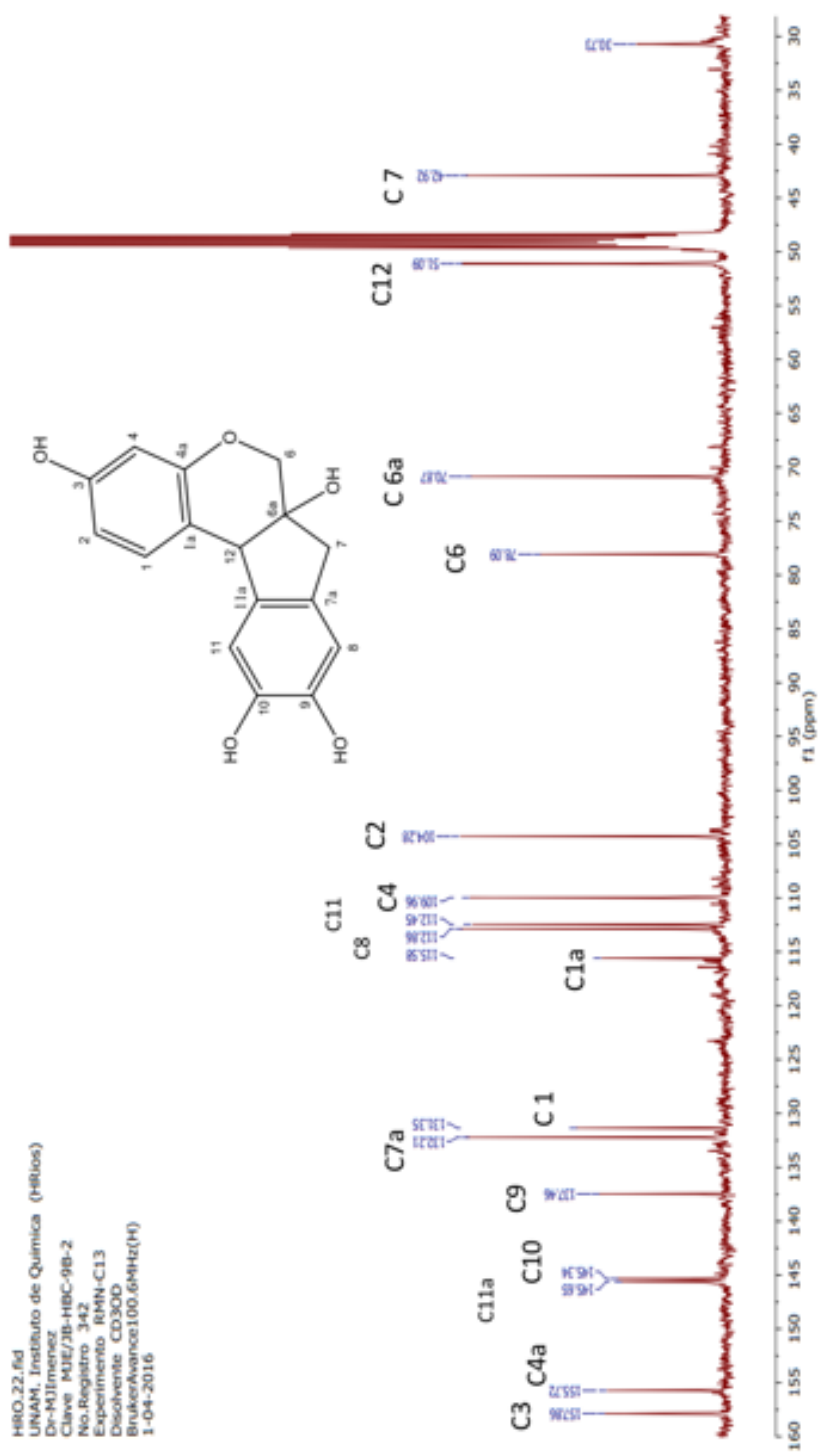
ZENBIO. (2010). ABTS Antioxidant Assay Kit Cat# AOX-1. Zen-Bio Inc. Instruction Manual ZMB0034.03:1-11.

XII. ANEXOS

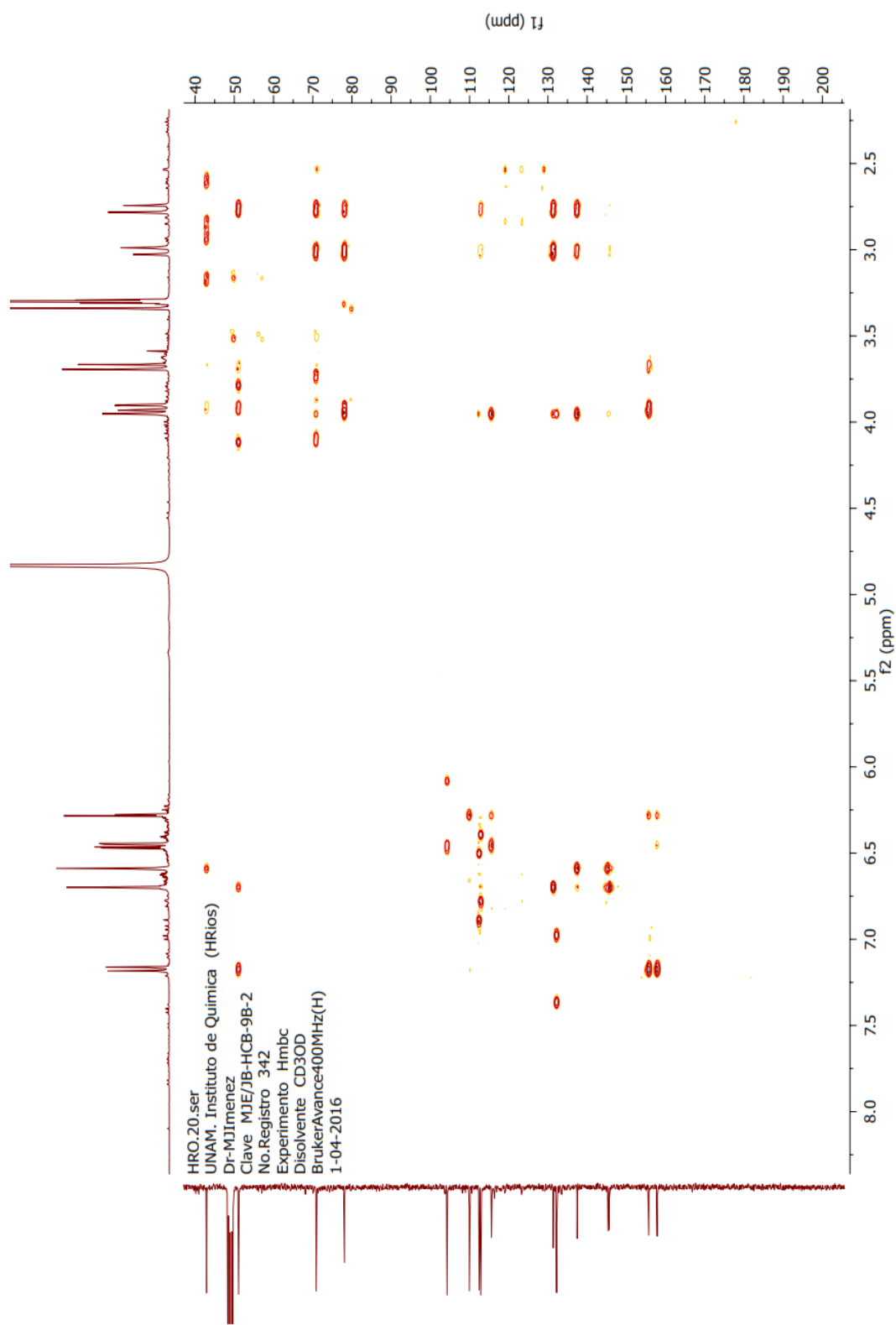
Anexo 1 Espectro de ^1H a 400 MHz



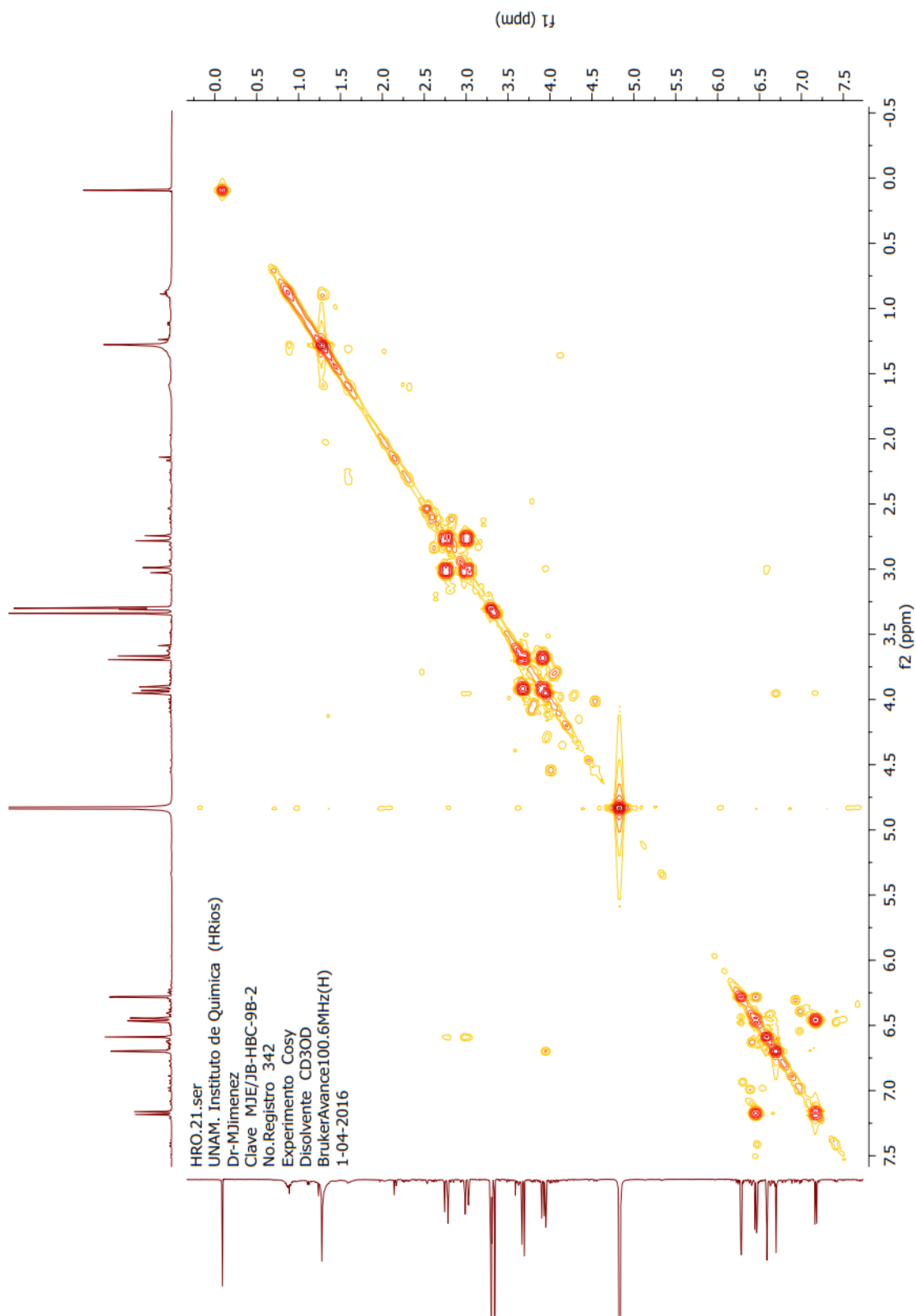
Anexo 2 Espectro de ^{13}C a 400 MHz.



Anexo 3 Espectro del experimento HMBC a 400 MHz



Anexo 4 Espectro del experimento COSY a 400 MHz



Anexo 5 Espectrometría de masas

