



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

FITOQUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA DE COMPUESTOS Y EXTRACTOS  
ORGÁNICOS DE LAS HOJAS DE *Laelia anceps* Lindl. (Orchidaceae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :  
MARÍA JOSEFINA JIMAREZ MONTIEL

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
ASESOR INTERNO: DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

MÉXICO D. F.

JUNIO 2009



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.

# AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Gracias a los sinodales: M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, M. en C. Ma. De Jesús Sánchez Colín, Biol. Juan Romero Arredondo. Por sus observaciones realizadas a mi trabajo.

A Teresa Ramírez Apan y Antonio Nieto, por la realización de las pruebas biológicas.

A los realizadores de las pruebas de IR, RMN, y EM.

Al Dr. Mariano Martinez, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y compartir sus conocimientos conmigo.

A la Dra. Hortensia Rosas, por su gran enseñanza y paciencia, pero sobretodo por ser una buena amiga. y una gran mujer a la que admiro, quiero y respeto.

Al Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec.  
A la directora del Bosque de Chapultepec la Ing. Rosa Gómez  
Al director del Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec el Biol. Martín Aguilar y a la encargada de la colección de Orquídeas vivas del Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec, la Biol. Fabiola Hurtado.

# GRACIAS.

A mi mamá y a mi papá por el apoyo económico, pero sobretodo por haberme dado esta segunda oportunidad con su cariño incondicional durante toda la carrera y por apoyarme en todos mis proyectos tanto académicos como de vida.

A mi hermano, mi cuñada y mis sobrinas que los quiero mucho.

A mi abuelo y mi tía Ofelia que también me apoyaron.

Al tío Juan por el apoyo de transporte escolar que me brindó durante casi toda la carrera, también por su paciencia y comprensión.

A mis amigas: Angélica, Ara, Giovanna, Ruperto, Liliana y al club de las Poríferas, por su cariño, apoyo, comprensión, paciencia y por los momentos divertidos y no tan divertidos, que hemos pasado juntos.

A mis compañeros de laboratorio; Denisse, Juan Carlos alias “el extranjero”, Natalia, Mario, Adriana, Rodrigo, etc. Por los momentos divertidos de las largas jornadas de trabajo, por su apoyo y comprensión.

A todos mis maestros de la FES Zaragoza, pero en especial a la Dra. Bertha Peña por ser un gran apoyo moral durante la carrera y ser una gran amiga “La quiero mucho.”, también al Dr. Gómez Márquez por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo durante la estancia corta.

A dios por haberme dado TANTO

---

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
COX-1	Cicloxigenasa I
COX-2	Cicloxigenasa 2
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Espectrometría de masas
EDTA	Etilen-diamin-treta acético
HTLV-1	Virus linfotrópico humano tipo 1
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana
I $\kappa$ B	Inhibidor de $\kappa$ B
IR	Infrarrojo
K-562	Leucemia mieloblastica crónica
L-NAME	Nitro -L - Arginina Ester
MS	Metabolito secundario
NF-k B	Factor nuclear k B
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
S.A.	Sin actividad
SNC	Sistema Nervioso
SFB	Suero fetal bovino
SV	Virus del simio
SRB	Sulforodamina B
TNF	Factor de necrosis tumoral
TCA	Tricloroacético
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecailforbol
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
1.- RESUMEN	4
2.- INTRODUCCIÓN	6
3.-MEDICINA TRADICIONAL	7
4.-METABOLITOS SECUNDARIOS	8
4.1.- FLAVONOIDES	10
5.- CÁNCER	12
5.1.- EL CÁNCER EN MÉXICO	12
5.2.- FACTORES DE RIESGO	13
5.3.- BIOLOGÍA DEL CÁNCER (DEFINICIÓN)	14
6.-INFLAMACIÓN	15
6.1.-TIPOS DE INFLAMACIÓN	15
6.2.-INFLAMACIÓN AGUDA	16
6.3.- INFLAMACIÓN CRÓNICA	16
6.4.- RELACIÓN CÁNCER – INFLAMACIÓN	17
7.- COMPUESTOS ANTICANCEROSOS DE ORIGEN VEGETAL	19
8.- ORQUIDACEAE	
8.1.-ETNOBOTÁNICA	20
8.2.- FARMACOLOGÍA	21
8.3.- QUÍMICA	23
9.- JUSTIFICACIÓN	26
10.- <i>Laelia anceps</i> Lindl	27
10.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	27
10.2.- CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	27
10.3.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	28
11.- HIPÓTESIS	29
12.- OBJETIVOS	29

13.- MATERIAL Y MÉTODOS	30
13.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	30
13.2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO	30
13.3.- ANÁLISIS CROMATOGRÀFICO	30
13.4.- FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	31
13.5.- FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO PROVENIENTE DEL LA PARTICIÓN DEL EXTRACTO DE METANOL	32
13.5.- EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	33
13.5.1.- CITOTOXICIDAD	33
13.5.2.- ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	36
14.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
14.1.- RENDIMIENTO DE EXTRACTOS	37
14.2.-ANÁLISIS QUÍMICO	38
14.3.- RENDIMIENTO 5-hidroxi, 3, 7,4'-trimetoxi flavonol	38
14.4.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS	40
14.5.- CITOTOXICIDAD	40
14.6.- ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	42
14.7.- ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE 5-hidroxi, 3, 7,4'-trimetoxiflavonol	42
15.- CONCLUSIONES	43
16.- BIBLIOGRAFÍA CITADA	44
17.- ANEXOS	54





---

---

## 1.-RESUMEN

Actualmente en la clínica se tienen varios fármacos anticancerosos, la naturaleza de este tipo de padecimientos hace de su erradicación un problema muy complejo. Adicionalmente, las células cancerosas, a la larga desarrollan resistencia a los diferentes fármacos. Por lo anterior, existe una continua demanda de nuevos fármacos anticancerosos con menos efectos tóxicos y con mayor selectividad. Una aproximación para la obtención de nuevos compuestos, para el tratamiento del cáncer e inflamación, es a partir de los metabolitos secundarios de origen vegetal.

En este contexto y como parte de la búsqueda sistemática de metabolitos secundarios de origen vegetal con potenciales propiedades anticancerosas y antiinflamatorias, en este trabajo se dan a conocer los resultados de la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los extractos y de metabolitos secundarios de las hojas de *Laelia anceps* Lindl (Orchidaceae). Las propiedades citotóxicas de los extractos de *L. anceps*, fueron evaluadas mediante el ensayo de sulforrodamina B, en 6 líneas celulares de cáncer humano. Los extractos más activos resultaron ser, el extracto de acetato de etilo con porcentajes de inhibición entre 77.3 y 100, la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico mostró una inhibición del 93.19 % en la línea celular de cáncer de mama. La actividad anti-inflamatoria se evaluó mediante el método de inducción de edema en oreja de ratón por TPA donde el extracto de acetato de etilo inhibió el edema en 67.93 %.

La separación cromatográfica de los extractos activos permitió el aislamiento del compuesto 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol, el cual mostró un valor de inhibición de crecimiento del 93.64 % para la línea de cáncer de mama. Valor similar de inhibición al de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico, por lo que es posible que la presencia de dicho compuesto sea el responsable de la actividad de este extracto.

## 2.-INTRODUCCIÓN

Desde su aparición hace 150 000 años (Audesirk et al., 2003), el hombre ha mantenido una estrecha relación con las plantas. Así a través del tiempo, y por un proceso de ensayo y error, la humanidad seleccionó las mejores especies para sus necesidades básicas como son alimentación y procuración de salud. También ha utilizado las plantas para la elaboración de herramientas de caza, construcción, vestido, ornamentación y como parte importante de sus cultos religiosos (Rojas, 2003).

Los conocimientos adquiridos por el hombre a través del tiempo de las diversas especies útiles o perjudiciales, fueron transmitidos a sus descendientes, principalmente, de manera oral o mediante su representación gráfica a través de la escritura, dibujos y pinturas, asignándoles al mismo tiempo nombre y describiendo su manera de emplearlas para fines terapéuticos (Guerra, 1982).

En México el conocimiento y uso de las plantas medicinales es muy amplio, no solo por la riqueza étnica con la que se cuenta, sino también por la gran diversidad vegetal y animal, consecuencia de diversos factores físicos. La ubicación geográfica del país, el relieve accidentado que a la vez genera una gran diversidad tanto de suelos como de climas y tipos de vegetación (Challenger, 1998). Por lo anterior nuestro país ha llegado a ser considerado uno de los doce países megadiversos del mundo (Benítez y Bellot, 2009).

Actualmente, en México crecen alrededor de 30 000 especies de plantas de las cuales aproximadamente 4 000 poseen propiedades medicinales (CONABIO, 2008). Los conocimientos para la identificación de plantas medicinales, así como su preparación y aplicación para fines terapéuticos, constituyen una gama de prácticas culturales que han sido desarrolladas y transmitidas de generación en generación por

los antiguos mexicanos hasta nuestros días. De esta manera, son ellos los que poseen el conocimiento para la clasificación y utilización de las llamadas plantas medicinales (Departamento de Apoyo a Jóvenes Indígenas y Migrantes, 2004).

### 3.-MEDICINA TRADICIONAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como las practicas, enfoques, conocimientos y diversas creencias sanitarias, que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y minerales, así como terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (OMS, 2005). La práctica de la medicina tradicional, representa una fuente accesible de procuración de salud y quizás la única, para los sectores más pobres en varios países de los llamados en desarrollo. En México la práctica de la herbolaria constituye no solo una vía de procuración de salud sino también un rasgo cultural (OMS, 2005).

Actualmente en Centro y Sudamérica se estima que más del 50% de la población utiliza o consume productos derivados de la medicina tradicional combinados con algún tratamiento alópata (OMS, 2005).

El uso de la medicina herbolaria, por su fácil acceso y por supuesta inocuidad, es una de las terapias, más ampliamente utilizada por los sectores pobres de los países en desarrollo. Por otro lado, la utilización de algunas especies vegetales con fines de mantener y procurar la salud por las sociedades de países desarrollados se engloba en el término medicina alternativa. Este uso masivo, a nivel internacional, de las plantas medicinales está sustentado por un sin número de estudios que avalan sus propiedades terapéuticas (Dwight et al., 2007; Andrade-Cetto et al., 2005). De tal forma que, alrededor de un 25% de los

fármacos modernos son elaborados a partir de plantas con antecedentes medicinales (Bagozzi, 2003).

Indiscutiblemente que los efectos terapéuticos de las llamadas plantas medicinales son el resultado de su composición química. Una parte importante de las sustancias sintetizadas por las especies vegetales, la constituyen los metabolitos secundarios tales como fenoles, alcaloides, terpenos, triterpenos, poliacetilenos, pigmentos, glucósidos, glucosinalatos etc. En el presente, uno de los principales objetivos en el área de productos naturales es la búsqueda de los metabolitos secundarios biológicamente activos de algunas plantas con antecedentes etnomedicinales (Haslam, 2002).

#### 4.- METABOLITOS SECUNDARIOS (MS).

De acuerdo con Vanhaelen y colaboradores (Vanhaelen et al., 1991) los metabolitos secundarios (MS) se definían como, sustancias químicas sintetizadas por los diferentes grupos de plantas, los cuales no participaban directamente en actividades bioquímicas primarias o vitales para la planta. Sin embargo, ahora se sabe que estos metabolitos desempeñan roles importantes en la ecología vegetal, por ejemplo algunos compuestos fenólicos y terpenoides, funcionan como insecticidas o repelentes de organismos herbívoros, así como hormonas de insectos, fitoalexinas, agentes alelopáticos, reguladores del crecimiento vegetal, también poseen actividad fungicida o afectan en varios modos a organismos patógenos como los nematodos (Cy et al., 1985)

Los MS se caracterizan principalmente por la heterogeneidad de su estructura química y su distribución restringida, también se ha considerado la síntesis de MS en función de la especialización celular (Anaya., 2003).

Inicialmente se creía que los MS se limitaba solo a plantas superiores, pero en base a estudios posteriores se pudo comprobar la presencia de MS en algunos microorganismos y animales (Anaya., 2003).

Debido a que la síntesis de los MS es el resultado de expresiones genéticas generadas por los diferentes requerimientos de las especies que la sintetizan, se postuló, que debía haber una relación entre los MS y la filogenia vegetal. Esta relación dio origen a la quimiotaxonomía, que es un intento por correlacionar los diferentes tipos de MS con taxa bien definidos. Por ejemplo, existe una correlación muy marcada entre los alcaloides aporfinicos y la familia Annoceae, o la síntesis de lactonas sesquiterpénicas entre especies de la familia de las Compuestas, o la producción de cumarinas y flavonas por especies de la familia Rutaceae. Sin embargo, también a través de diversos estudios, se ha demostrado que no hay una relación entre la síntesis de MS y la filogenia vegetal<sup>15</sup> como en el caso de los flavonoides que se encuentran ampliamente distribuidos entre las especies superiores, pertenecientes entre otras familias a la Rutaceae, Polygonaceae, Compositaceae y Umbelliferae (Kuklinski, 2003).

Durante mucho tiempo, como se ha mencionado anteriormente, los metabolitos secundarios fueron considerados como materiales de desecho, sin embargo, recientemente se han considerado componentes indispensables en la estrategia de supervivencia de las especies vegetales. Adicionalmente, al progreso en la ecología química, el campo emergente de la evolución molecular ha proporcionado evidencia crucial que postula que el proceso evolutivo del metabolismo secundario, se debe a que algunas de las enzimas del metabolismo primario fueron duplicadas, reclutadas y diversificadas para cumplir nuevas funciones como respuesta a la presión de la selección natural (Hartmann, 2007).

De tal forma que en la ecología química se ha postulado la relación entre la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en diversos

grupos de plantas y su relación con el entorno, así como algunos aspectos coevolutivos, como la relación presa depredador o la misma competencia. Por ejemplo, algunas plantas superiores producen algunos MS que limitan o inhiben, tanto la germinación de las semillas como crecimiento de miembros de su misma especie o también de otras especies. (Kuklinski, 2003; Waizel, 2006).

Además de la importancia ecológica que tienen los MS, el hombre ha utilizado estos compuestos como coadyuvantes en los tratamientos de diversas enfermedades como por ejemplo: el ácido acetilsalicílico que es utilizado principalmente para el tratamiento de dolores de cabeza, fiebre y desinflamación, este es sintetizado a partir del ácido salicílico obtenido de la corteza del sauce (*Salix alba*) y que recientes estudios han demostrado su eficacia como coadyuvante en el tratamiento de ciertos tumores de colon (Larson et al., 2006) o el taxol extraído del *Taxus baccata*, que actualmente es uno de los fármacos anticanceroso más utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (<http://www.cancer.gov/search>, (septiembre 2008))

En recientes estudios se han logrado aislar compuestos de naturaleza polifenólica como las flavonas que de manera natural se encuentran en frutas y vegetales. En estudios clínicos y epidemiológicos se han evidenciado su rol potencial de reducir el riesgo de desordenes cardiovasculares, coronarios, neurodegenerativos, osteoporosis y cáncer de pulmón. Una de las posibles explicaciones acerca de estos efectos benéficos es por su actividad antioxidante (Lampiña et al., 2008)

### 4.1.-FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios derivados de los fenoles de tipo diaril-propano unidos la mayoría a una cadena de azúcar;

están constituidos con dos anillos aromáticos (bencenicos) unidos entres sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad del carbono 3 y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y por lo tanto, son polifenólicas (Kuklinski, 2003).

La presencia de grupos hidroxilos, es frecuente en posiciones 3,5,7,3',4', pueden estar libres o esterificados por metanol o unidos a azúcares, constituyendo, la mayoría O-heterosidos, también pueden encontrarse como C-heterosidos, donde esta enlazado un azúcar al carbono 6 o 8.

Son producto de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, protección frente a la radiación ultravioleta, defensa de patógenos y posiblemente en la regulación hormonal. Son particularmente abundantes en las plantas vasculares, como las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbrelliferae, Lamiaceae, entre otras (Aguso y Toro, 1999).

Los flavonoides presentan actividad sobre la pared de los capilares, particularmente sobre el tejido perivascular o periangio, disminuyendo su permeabilidad y fragilidad, aumentando su resistencia.

La acción antiinflamatoria que poseen se relaciona en parte con su interacción con diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico. Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria y en los cuales pueden intervenir los flavonoides son:

- Acción vitamina P (antiescorbútico)
- Antihemorrágico
- Antiarrítmicos
- Antihepatotóxicos

- Antibacterianos, antivíricos y antifúngicos
- Diurético
- Inhibición de la liberación de histamina.
- Inhibición de la migración celular.
- Acción antioxidante.
- Efecto protector vascular.
- Efecto antitumoral.
- Gastroprotector.

La mayoría de los flavonoides se comportan *in vitro* como inhibidores enzimáticos, lo que explica el mecanismo de acción (Kuklinski, 2003).

## 5.-CÁNCER

### 5.1.-EL CÁNCER EN MÉXICO

El cáncer en el ámbito mundial es la segunda causa de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas (OMS, 2008). En México se informó que en el 2005, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte. En este año, 63 128 personas fallecieron por este padecimiento, siendo el 12.7% del total de las defunciones. En los hombres representó 11.3% del total de fallecimientos y 14.5%, en las mujeres (OMS, 2008).

En los varones las tres principales causas de muerte por tumores malignos son: de tráquea, bronquios y pulmón (15.6%), próstata (15.5%) y estómago (9.1%). En las mujeres, 13.3% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al del cuello del útero (cérvico-uterino) y 13.1% más al de mama; asimismo, el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 7.9% de las muertes (INEGI., 2008).



## 5.2.-FACTORES DE RIESGO.

El origen del cáncer es multifactorial, de tal forma que ciertos factores ambientales o exógenos (Cuadro 1) actúan en conjunto con factores endógenos (Cuadro 2), provocando modificaciones en el genoma. Estas anomalías se acumulan hasta que la célula adquiere el fenotipo tumoral que alcanza su máxima expresión cuando los tumores invaden localmente, se diseminan a distancia y adquieren resistencia al tratamiento (Mohar y Frias, 2003)

Factores exógenos:

Cuadro 1. Factores exógenos relacionados con el desarrollo de algunas displasias (Mohar y Frias, 2003; Delgado, 2006)

Agentes químicos		Agentes físicos		Agentes biológicos	
Agente	Localización de la displasia	Agente	Localización de la displasia	Agente	Localización de la displasia
Tabaco	Vías respiratorias	Radiación ionizante	Leucemia Tiroides Mama Cerebro Pulmón	Virus Epstein-Barr	Nasofaringe Linfomas (Hodgkin y Burkitt)
	Hígado Páncreas Leucemia mieloide Cáncer de uréter, Pelvis Riñón			Retrovirus HTLV-1	Leucemia
Alcohol	Esófago	Radiofrecuencia y microondas	Linfomas Cerebro	Virus de papiloma SV 40	Mesotelio
	Laringe Hígado				
Aminas aromáticas	Vejiga	Luz solar	Piel Melanoma	Virus hepatitis B y C	Hígado
Cromo y níquel Arsénico	Pulmón			Virus papiloma humano JVC, BKV, SV40	Cervix Region anogenital Esofago Piel
	Pulmón Piel				
Disolventes orgánicos (benceno, tricloroetileno, tetracloroetileno y tetracloruro de carbono)	Hígado			Virus HIV-1 Virus herpes tipo 8	Sarcoma Sarcoma ( Kaposi )
	Tracto biliar Linfomas				
Asbesto y sílice	Pulmón Mesotelioma			Virus HIV-1 Schistosoma haematobium	Sarcoma Vejiga
				Opisthorchis viverrini	Vías biliares
Insecticidas , herbicidas y fungicidas	Leucemia Mieloma múltiple Próstata Cerebro Páncreas Mama			Schistosoma haematobium	Vejiga
				Opisthorchis viverrini	Vías biliares
				Helicobacter pylori	Estomago

Factores edogenos :

Cuadro 2. Factores endógenos relacionados con el desarrollo de cáncer (Mohar y Frias, 2003; Delgado, 2006).

Factor
Genes codificadores de enzimas
Genes supresores de tumores
Predisposición familiar
Susceptibilidad individual

### 5.3.-BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es un proceso en el que las células sufren cambios y adquiere capacidades diferentes a las células normales, produciéndose un crecimiento anormal, hasta convertirse en masas de tejidos. Un rasgo común a todas las formas de cáncer es la inoperancia de los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular. Además de diseminarse localmente, las células cancerosas pueden ser llevadas por la linfa o la sangre a sitios distantes, donde inician nuevos focos de crecimiento canceroso. Este modo de diseminación se llama metástasis, de tal forma que el sitio de origen es llamado tumor primario y los sitios de diseminación son llamados tumores secundarios (Parham, 2006).

Dentro de los mecanismos celulares de regulación alterados en el cáncer se encuentran algunos relacionados con la proliferación celular, en los cuales intervienen una gran variedad, de proteínas activadoras o desactivadoras de algunos mecanismos reguladores del crecimiento celular, apoptosis y desarrollo, como por ejemplo; el factor nuclear NF-

κB regulador en la inmunidad adaptativa e innata. Durante el proceso de inflamación este factor es activado mediante una gran variedad de estímulos endógenos o exógenos incluyendo, algunos patógenos, señales de stress, citocinas proinflamatorias como es el factor de necrosis tumoral (TNF) y algunas interleucinas. La activación del NF-κB es mediante la fosforilación y posterior proteólisis de IκB, la proteína inhibidora, que lo retiene en el citoplasma y no permite su translocación al núcleo. Una vez fosforilado IκB, permite que la forma libre de NF-κB se transloque al núcleo, donde activa la transcripción de aquellos genes que responden a NF-κB, los cuales están implicados en la inflamación, tales como la expresión de citocinas, cicloxigenasa, moléculas de adhesión y la inhibición de la apoptosis. La señal de activación concluye por la nueva síntesis de la subunidad inhibidora IκB, de tal forma que la propia expresión génica de IκB se encuentra bajo el control de NF-κB, por consiguiente cuando es alterado el gen que sintetiza para IκB, este no se expresa en el citoplasma, dando como resultado una sobreexpresión de el factor nuclear NF-κB que por consecuencia proporciona a las células la característica de resistencia a la apoptosis (Qitang y Verma, 2002).

## 6.-INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso complejo sostenido de corta o larga duración, es considerada como la reacción del organismo frente a la invasión por parte de un agente infeccioso, a un estímulo antigénico o incluso a lesiones físicas. Esta consiste en la acumulación local de líquido acompañado de un edema, enrojecimiento y dolor, producidos por cambios inducidos en los capilares sanguíneos locales que conducen a un aumento de su diámetro, a una reducción de la velocidad del flujo sanguíneo y un incremento de la permeabilidad de la pared vascular (Roitt et al., 2001).

El aumento del aporte de sangre a la región causa el enrojecimiento local y el calor asociados con la inflamación. El aumento de la permeabilidad vascular permite el desplazamiento de líquido, proteínas plasmáticas y leucocitos desde los capilares hacia el tejido conectivo inmediato, lo que causa el edema y el dolor (Roitt et al., 2001).

### 6.1.-TIPOS DE INFLAMACIÓN

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (Roitt et al., 2001).

### 6.2.-INFLAMACIÓN AGUDA

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

1. Cambios en el flujo y calibre vascular, que hacen que aumente el flujo sanguíneo.
2. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio.
3. Paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es el cúmulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperhemia por dilatación de arteriolas y vénulas y apertura de los vasos de pequeño calibre. Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la

presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta, y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio (Roitt et al., 2001).

### 6.3.-INFLAMACIÓN CRÓNICA

Si la inflamación dura semanas o meses se considera crónica, y tiene dos características importantes:

1. El infiltrado celular está compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas
2. La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, que la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas: a) progresión de una inflamación aguda; b) episodios recurrentes de inflamación aguda y c) inflamación crónica desde el comienzo asociada frecuentemente a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc.).

Microscópicamente la inflamación crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos y sus derivados (células epitelioides y gigantes), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos (Roitt et al., 2001).

### 6.4.-RELACIÓN CÁNCER- INFLAMACIÓN

En 1863 Virchow propuso que el origen del cáncer se daba en sitios de inflamación crónica, su hipótesis en parte se basó en que algunas clases de irritantes, junto con una lesión de tejido y el proceso de inflamación, generan la proliferación celular. Aunque está claro ahora que, no solamente la proliferación de células causa el cáncer (Coussens y Werb, 2002).

El rol de la inflamación en el desarrollo y progresión del cáncer, es usualmente considerado desde la perspectiva de una inflamación

persistente (crónica), en el contexto de una infección crónica o el daño a un tejido, donde se pueden promover la transformación celular a través del daño al ADN o de factores proinflamatorios que producen células tumorales (Lawrence, 2007).

El ambiente en el que se encuentran las células inflamatorias es un factor que promueve la proliferación, supervivencia y migración celular a partir de los mediadores inflamatorios. En el proceso inflamatorio los granulocitos y los linfocitos sintetizan productos potencialmente genotóxicos o mutagénico: como el peróxido de hidrógeno radicales oxígeno; óxido nítrico y malondialdehído.<sup>33</sup> Los radicales oxígeno derivados del peróxido de hidrógeno y los radicales nitrógeno derivados del óxido nítrico pueden actuar directamente, causando daño al ADN, induciendo mutaciones en los oncogenes o indirectamente en la modulación de los genes de transcripción y suprimiendo la reparación genómica. Estos cambios inducen la transformación de células normales en cancerosas, vía la activación de oncogenes, la pérdida de activación de los anti-oncogenes o afectando el crecimiento de células transformadas, induciendo la no diferenciación, la proliferación y la resistencia a la apoptosis (Fitzpatrick, 2001).

Durante el desarrollo de ciertos tumores se encuentran involucradas diversas sustancias entre ellas las prostaglandinas que en condiciones normales son las encargadas de controlar la presión arterial, la contracción de músculos lisos en intestino y la permeabilidad capilar. Sin embargo, en algunos cánceres se ha observado una sobreexpresión de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, lo que implica una producción anómala de prostaglandinas que mantienen y acentúan un microambiente inflamatorio, favoreciendo la síntesis de compuestos que inhiben la apoptosis o que favorecen los procesos de angiogénesis (Johnsen et al., 2004).

Dentro del proceso de inflamación la COX-1 pero principalmente la COX-2 es clave para la conversión del ácido araquidónico a

prostaglandinas y tromboxanos. La COX-1 es una enzima constitutiva y se produce en muchos tejidos como el tracto gastrointestinal y los riñones mientras que la COX-2 es inducida y se expresa durante el proceso de inflamación en el sitio del daño (Potter y Ulrico., 2006; Farooqui et al., 2007). En especial la sobreexpresión de la COX-2 ha sido implicada en una variedad de tumores y en algunos estudios preclínicos se ha observado que la administración de inhibidores selectivos de la COX-2 como el celecoxib, previenen la angiogénesis, el crecimiento tumoral y metástasis en tumores de mama.<sup>37</sup> Debido a que la aspirina no solo inhibe la COX-2 sino también inhibe la actividad de la COX-1, se ha utilizado como coadyuvante en el tratamiento de ciertos tumores de colon (Agusti-Escasan y Vallano-Ferraz, 2006).

### 7.-COMPUESTOS ANTICANCEROSOS DE ORIGEN VEGETAL

En la clínica se tienen excelentes fármacos anticancerosos de origen natural como los alcaloides vincristina y vinblastina aislados de *Catharanthus roseus* o el paclitaxel, un diterpeno aislado de *Taxus brevifolia* entre otros (Cragg y Newman, 2005). Desafortunadamente todos los fármacos anticancerosos ya sean de origen natural o sintético, producen efectos colaterales, siendo en ocasiones bastante severos para el paciente. Adicionalmente las células cancerosas, a la larga, desarrollan resistencia a los diferentes fármacos. Lo que demanda una continua búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos con menos efectos tóxicos y con mayor selectividad (Flores-Rosete y Martínez-Vazquez, 2008). Es por ello que tomando en cuenta la gran diversidad vegetal y el conocimiento empírico dentro de la medicina tradicional, la investigación en productos naturales se ha enfocado, entre otros objetivos, en la búsqueda de los MS con actividad antiinflamatoria y anticancerígena (Kovacs et al., 2008). Las especies de la familia Orchidaceae han sido poco estudiadas tanto desde el punto de vista químico como de sus propiedades de actividad biológica, sin embargo,

algunas especies han demostrado poseer actividad antitumoral, citotóxica, anti-inflamatoria relajante, antialérgica y espasmolítica (Kovacs et al., 2008). Tomando en cuenta lo anterior, las especies de esta familia constituyen un campo de investigación ideal para la búsqueda de MS con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas.

## 8.-ORCHIDACEAE

### 8.1.-DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La familia Orchidaceae, comprende aproximadamente de 25 000 a 30 000 especies y quizá 60 000 híbridos y variedades producidas por horticultores (Cano y Marroquin., 1994) Son hierbas perennes, terrestres en regiones templadas; epifitas en regiones tropicales; ocasionalmente saprofitas. Plantas a menudo micorrizicas, a veces trepadoras. Las orquídeas terrestres suelen ser tuberosas o rizomatosas; las epifitas producen pseudobulbos consistentes de uno o más entrenudos engrosados. Tallos foliosos o escapos. Hojas simples, usualmente alternas y disticas, a veces reducidas a escamas. Inflorescencias racimosas paniculadas, espigadas o flores solitarias. Las flores por lo común son bisexuales, zigomorfas, vistosas y coloreadas o pequeñas e inconspicuas, cáliz de tres sépalos, verdes o de color. Corola de dos pétalos laterales y un pétalo medio llamado lábalo que a menudo es más grande y difiere en forma de los pétalos laterales. Androceo de 1 ó 2 estambres, unidos al estilo en una estructura única, la columna. Una antera y el polen en polinios cerosos. Gineceo constituido por un pistilo compuesto de 3 carpelos, con un lóculo y placentación parietal, o rara vez 3 lóculos, placentación axilar, ovario infero (Cano y Marroquin, 1994; Samuel y Jones, 1987).



## 8.2.-ETNOBOTÁNICA

En México los miembros de esta familia son llamadas orquídeas o lirios. En la época precolombina el uso principal, fue para preparar mucílago o pegamento, también se registro el uso medicinal, donde se indica que la raíz de las plantas de donde se extrae el mucilago, eran utilizadas para el tratamiento de la disentería (Hagsater et al., 2005).

Entre las orquídeas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la disentería están las especies del género *Isochilus* conocidas en México como sanguinarias. También las especies *Arpophyllum spicatum*, *Epidendrum anisatum*, *Bletia campanulata* y *B. coccinea* son señaladas para el mismo mal. Con las especies *Catasetum integerrimum*, *Cyrtopodium macrobulbon*, *Bletia purpurea* y *Prosthechea citrina* se preparan cataplasmas para el tratamiento de algunas heridas. Algunas de las especies de *Malaxis* se utilizan para aliviar dolores de estomago. Las flores de *Calanthe calanthoides* se usan para detener el sangrado nasal, de la misma manera que la savia de *Rhyncholaelia digbyana* detiene las hemorragias en las heridas. *Trichocentrum cebolleta*, antes *Oncidium cebolleta* esta especie contiene alcaloides en sus hojas sustituye al peyote entre los raramuri y puede ser alucinógeno. De *Laelia autumnalis* se utilizan las flores en infusión para aliviar la tos (Hagsater et al., 2005).

## 8.3.- FARMACOLOGÍA

Los compuestos; 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno, fibriol-A, nudol, gimnopusina y eriantridina, aislados de *Maxillaria densa* presentaron efecto relajante dependiente de la concentración, en el ileum de rata. Estos compuestos inhibieron las contracciones espontáneas inducidas con histamina, cloruro del bario y L-NAME, con una potencialidad comparable a la de la papaverina (Estrada et al., 2004).

Del extracto hidro-alcohólico de *Dendrobium chrysotoxum* se aislaron: 1,4,5-trihidroxi-7-metoxi-9-fluorenona, dendroflorina y dencrisana. Los cuales fueron evaluados in vitro en las líneas celulares K562, HL-60 de leucemia humana, A549 de adenocarcinoma de pulmón, BEL-7402 de hematoma humano y SGC-7901 de carcinoma de estomago, usando cisplatino como control positivo. Los tres compuestos mostraron una mayor actividad en BEL-7402 con los valores de  $CI_{50}$  de 1.49, 0.97 y 1.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (Chen et al., 2008).

De *Scaphyglottis livida* fueron aislados cinco compuestos aromáticos 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibenzil (1), batatasin III (2), coelonin (3), 3,7-dihidroxi-2,4-dimethoxyfenantreno (4), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (5). Todos los compuestos indujeron una inhibición, dependiente de la concentración, en las contracciones espontáneas de ileum de rata, con valores comparables a la papaverina (Estrada et al., 1999).

Estudios previos de *Oncidium pachyphyllum* conocida en el Estado de Morelos como oreja de burro, demostraron efectos vaso relajantes de los extractos de diclorometano y metanol de la raíz, pseudobulbos y hojas. Para el extracto de diclorometano de raíz y pseudobuldo, se reporta un efecto vaso relajante de  $83,41 \pm 4,05 \%$  y de  $97,58 \pm 1,37 \%$  con una concentración de  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , para el extracto metanólico de raíz de  $78,61 \pm 5,62 \%$  y de  $84,36 \pm 1,25\%$  con la misma concentración (Alemán et al., 2007).

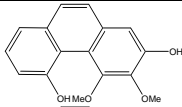
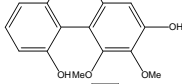
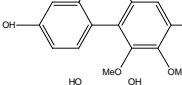
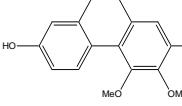
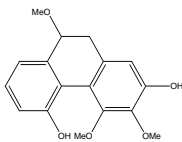
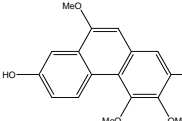
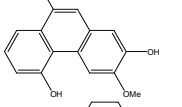
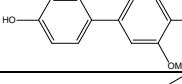
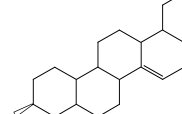
La fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *Anoectochilus formosanus* indujo a la apoptosis en la línea celular MC-7 de carcinoma de mama (Lie-Fen et al., 2004)

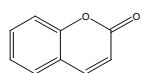
Se ha informado que el extracto metanólico de *Laelia autumnalis* indujo la relajación en los anillos aórticos precontractados en un porcentaje de 85% con una  $CI_{50}$  de  $54.11 \pm 4.17 \mu\text{g}/\text{mL}$  y un valor máximo de 80 % de

inhibición dependiente de la concentración en anillos del endotelio del duodeno. También demostró tener efectos antihipertensivos en ratas espontáneamente hipertensas disminuyendo la presión arterial y el ritmo cardiaco significativamente (Vergara-Galicia et al., 2008).

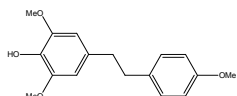
#### 8.4.-QUÍMICA.

De los estudios fitoquímicos de algunas de las especies de la familia Orchidaceae se ha logrado aislar compuestos de naturaleza fenolica como los fenantrenos (Cuadro 3).

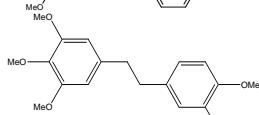
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE	CITA	
Maxillaria densa		2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno	Estrada et al., 1999	
		9,10-dihidro-2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno	Estrada et al., 1999	
		2,7-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno	Estrada et al., 1999	
		eriantridina (9,10-dihidro-2,7-dihidroxi-3,4dimethoxyfenantreno)	Estrada et al., 1999;Valencia-Islas et al., 2002;Estrada et al.,2004	
		gimnopusina (2,5-dihidroxi-3,4,9-trimethoxyfenantreno)	Estrada et al., 1999;Valencia-Islas et al., 2002;Estrada et al.,2004	
		2,7-dihidroxi-3,4,9-trimethoxyfenantreno	Estrada et al., 1999	
		fimbriol-A	Estrada et al., 2004	
		Nudol	Estrada et al., 2004	
	Dendrobium aurantiacum var. Denneanum		Taraxerol	Yang et al., 2006



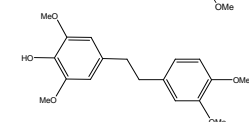
Comarina



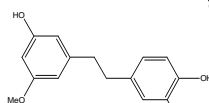
Moscatilina



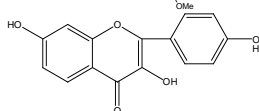
Crisotobibencil



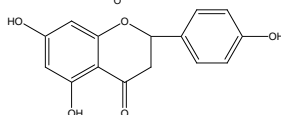
Crisotoxina



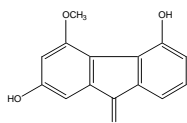
Gigantol



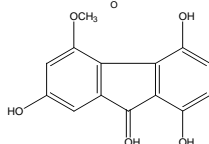
Kaempferol



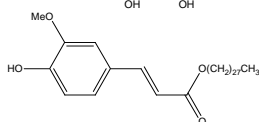
Naringenina



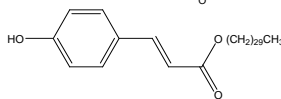
Dengibsina



Dendroflorina

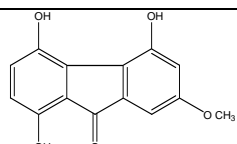


n-octacocil ferulati



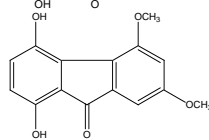
Defuscina

Dendrobium  
chrysotoxum

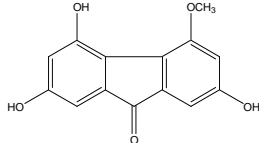


1,4,5-trihidroxi-7-metoxi-  
9H-fluoren-9-ona

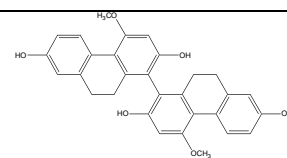
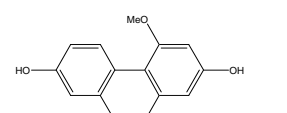
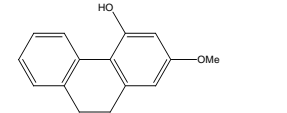
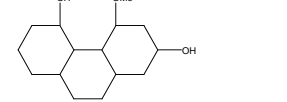
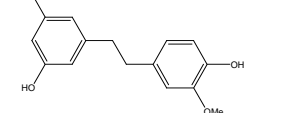
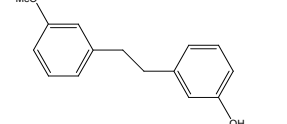
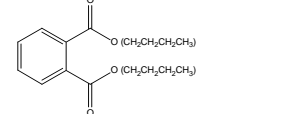
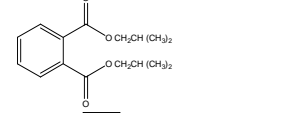
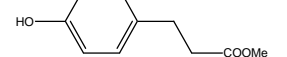
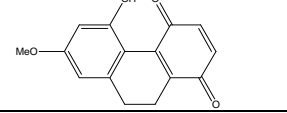
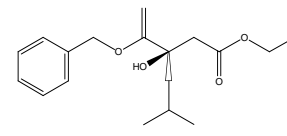
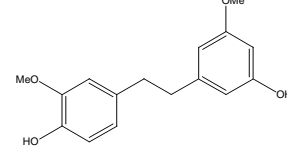
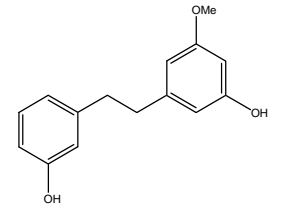
Chen et al., 2008



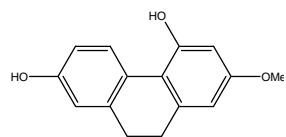
Dendroflorina



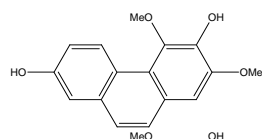
Dencrisana

Dendrobium aphyllum		Flavandrina	Chen et al 2008
		Coelonina	
		Lusianthridina	
		Moscatina	
		Gigantol	
		Batatasin III	
		Dibutil ptalate	
		Diisobutil ptalate	
		p-hidroxifenilpropionic metil ester	
Dendrobium cariniferum		Dendronona	Chen et al., 2008
Habenaria repens		Habenariol	Wilson et al., 1999
Scaphyglottis livida		3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibencil	Estrada et al 1999
		Batatasin III	

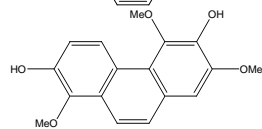
Scaphyglottis  
livida and  
Nidema boothii



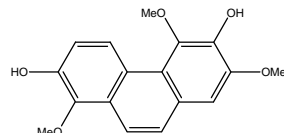
Coelonina



3,7-dihidroxi-2,4-  
dimethoxyphenanthrene

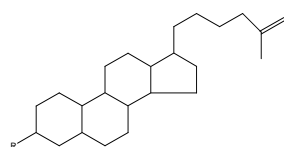


3,7-dihydroxy-2,4,8-  
trimetoxifenantreno



Nidemina

Estrada et al 2002



9,19-ciclanosta-24,24-  
dimethyl-25-en-3beta-yl  
trans-p-hidroxicinamato

R= trans-p-hidroxicinamalo

Cuadro 3. Compuestos aislados de algunas especies de Orchidaceae.

## 9. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la búsqueda de nuevos compuestos químicos, de origen vegetal, para el tratamiento del cáncer e inflamación, se ha enfocado en las diversas categorías de metabolitos secundarios, provenientes de una gran variedad de grupos de plantas. No obstante que las especies de Orchidaceae han sido poco estudiadas, tanto desde el punto químico como de actividad biológica, algunas especies han demostrado poseer actividad antitumoral, citotóxica, anti-inflamatoria, relajante, antialérgica y espasmolítica (Kovacs et al., 2008), por lo anterior, en este proyecto se propuso la determinación de la actividad citotóxica y anti-inflamatoria de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las hojas de *Laelia anceps* Lindl.

10.- *Laelia anceps* Lindl.

10.1.-TAXONOMÍA

Reino: Plantae

Division: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

Genero: *Laelia*

Especie: *Laelia anceps* Lindl., 1831. (Soto-Arenas., 1993)



**Figura 1.** *Laelia anceps*

10.2.-CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Laelia anceps* Lindl.

*Laelia anceps* (Fig. 1) es conocida también con los nombres comunes de Huichila y Tzicxochitl en Puebla, Lipà-nish-nopf-ni en lengua chontal en Oaxaca, flor de San Miguel y calaveritas en el Valle de México (Martínez, 1979).



Planta herbácea epífita, ocasionalmente litofítica, con rizoma alargado de unos 4 cm, los seudobulbos elipsoide-ovoide, alargados, comprimidos con doble filo, de hasta 11 cm de largo y 3.5 a 5 cm de ancho. La inflorescencia de 40 a 60 cm. De largo, cubierta con bráctea de doble filo con 1 o 3 flores en la parte Terminal. Las flores grandes y vistosas de 6 a 12 cm. de diámetro generalmente rosado-lila, el lóbulo medio del labelo púrpura oscuro. En el centro del labelo se distingue el callo amarillo con 3 bordes y en la garganta rayas bifurcadas en diferentes tonos de rojo. Florece de octubre hasta enero. En días muy soleados las flores despiden una agradable fragancia. La duración de las flores es de 10 a 15 días o más (Halbingern, 1993)

### 10.3.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se distribuye en las sierras de la vertiente del Golfo, en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Guatemala y Honduras y en la vertiente del Pacífico, en Guerrero y Jalisco. Principalmente en bosques de encino entre los 1200 y 1600 m (Fig. 2) (Halbingern, 1993).



Fig. 2. Mapa de la distribución de *Laelia anceps* en México, el sombreado morado

## 11.-HIPÓTESIS

De algunas especies de Orchidaceae se han aislado metabolitos secundarios con actividad citotóxica, entonces es factible suponer que *Laelia anceps*, dada la relación filogenética, sintetice metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

## 12.- OBJETIVO GENERAL

Determinación de las actividades citotóxicas y antiinflamatorias de extractos orgánicos y metabolitos secundarios mayoritarios provenientes de las hojas de *Laelia anceps*.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener los extractos orgánicos (hexano, acetato de etilo y metanol) de las hojas de *Laelia anceps*.
- Evaluar la actividad citotóxica y la actividad anti-inflamatoria de los extractos orgánicos.
- Aislar los compuestos mediante el fraccionamiento de los extractos orgánicos por cromatografía en columna y mezcla de disolventes en polaridad ascendente.
- Purificación e identificación de los compuestos obtenidos por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR, Espectrometría de masas).
- Evaluar la actividad citotóxica y la actividad anti-inflamatoria de los compuestos puros.

## 13.- MATERIALES Y MÉTODO.

El presente trabajo se dividió en dos fases. La primera consistió en el estudio fitoquímico de las hojas de *Laelia anceps*, donde se incluye la obtención de los extractos orgánicos, el fraccionamiento de mismos y el aislamiento e identificación del compuesto obtenido. En la segunda fase se evaluó la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los extractos orgánicos.

La primera etapa del trabajo se realizó en el laboratorio de Productos Naturales 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Mariano Martínez Vázquez y la Dra. Hortensia Rosas Acevedo y la evaluación de la actividad citotóxica y antiinflamatoria se efectuó en el laboratorio de pruebas biológicas del mismo Instituto.

### 13.1.-MATERIAL BIOLÓGICO.

El material vegetal fue donado por el Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec. Este fue trasladado a las instalaciones del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, para su procesamiento fitoquímico. También se depositó un ejemplar completo de la especie en el Herbario Nacional MEXU.

### 13.2.-ESTUDIO FITOQUÍMICO

Se deshidrataron 500 g de hojas a temperatura ambiente las cuales se molieron con un molino de mano, obteniéndose un total de 330.90 g. El material vegetal (hojas de *Laelia anceps*), se colocó en un matraz de vidrio de 2000 mL y se maceró con hexano a temperatura ambiente durante 48 h. La eliminación del disolvente se llevó a cabo mediante destilación a presión reducida en un rotavapor (Büchi B-480). De la

misma forma se macero con acetato de etilo y metanol. Con el fin de extraer de manera preferencial los compuestos de polaridad media. Al extracto metanólico se le efectuó una partición con acetato de etilo.

### 13.3.- ANÁLISIS CROMATOGRÀFICO.

Para la separación y purificación por cromatografía en columna a presión reducida, se utilizaron como fase estacionaria gel de sílice (MN-Kieselgel G Macherey-Nagel) en columnas de vidrio de diferentes capacidades de acuerdo a la cantidad de muestra a analizar, y como fase móvil se utilizaron disolventes en polaridad ascendente, como hexano, acetato de etilo, metanol, así como mezclas en diferentes proporciones.

Para el análisis cromatográfico de los extractos así como de algunas fracciones de los mismos, se utilizo la cromatografía en capa fina donde se utilizaron, placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (silical gel 60/UV250, Alugram) y se utilizo como revelador luz UV y sulfato cérico al 1% en acido sulfúrico 2N.

### 13.4.-FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.

El fraccionamiento del extracto de acetato de etilo se llevo a cabo colocando 4.10 g. de extracto adsorbido en gel de sílice en una proporción de 1:1. Esta mezcla se colocó en la parte superior de una columna cromatográfica de vidrio empacada con gel de sílice en una proporción de 3:1. Como fase móvil se emplearon mezclas de disolventes con polaridad creciente, iniciando con hexano, prosiguiendo con mezclas de hexano y acetato de etilo y terminando con metanol. El volumen por fracción fue de 250 mL.

### 13.5.- FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO DEL EXTRACTO DE METANÓLICO.

La cromatografía del extracto de acetato de etilo proveniente del la partición del extracto de metanol, se llevo a cabo adsorbiendo 2.40 g. del extracto de acetato de etilo en gel de sílice en una proporción de 1:1. Posteriormente, esta mezcla se coloco en una columna cromatográfica de vidrio con gel de sílice en una proporción de 3:1 con respecto al extracto adsorbido con gel de sílice. Como fase móvil se emplearon disolventes de diferente polaridad como son, hexano, acetato de etilo y metanol, se aumento la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo-metanol, con un volumen por fracción de 250 mL.

### 13.6.-EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.

#### 13.6.1.-ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

La evaluación de los extractos y de los compuestos se llevo a cabo en seis líneas celulares de cáncer humano: cáncer de colón (HCT-15), cáncer de mama (MCF-72), sistema nervioso central SNC (U251) leucemia mieloblastica crónica (K-562), pulmón (SKUL-1) y cáncer de próstata (PC-3), provenientes del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos de Norteamérica. La citotoxicidad de los extractos y de los compuestos fue determinada en microcultivos, midiendo la viabilidad y crecimiento celular indirectamente por el método de la sulforrodamina B de acuerdo a los procedimientos validados por el NCI 59, 60.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2  $\mu$ M glutamina. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera

de 5% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37 °C y un ambiente saturado de humedad.

Una vez estabilizados los cultivos, las células adheridas a las paredes del frasco de cultivo fueron removidas, con 2 ó 3 mL de solución tripsina-EDTA (Etilen-diamin-treta acético) al 0.05% con ayuda de una pipeta. Posteriormente se inactivo la tripsina adicionando 10 mL de medio RPMI-1640 adicionado con 5% de SFB, las células fueron disociadas con pipeteo suave. La densidad y viabilidad de las líneas celulares fue contabilizada en un hematocitómetro y evaluada por exclusión con azul de tripano. Después del conteo de células se procedio a hacer una dilución para obtener una densidad adecuada como se indica en el Cuadro 4. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos.

Cuadro 4. Líneas celulares, tiempo de duplicación y numero de células a sembrar en cada pozo

Línea celular	Tejido de origen	Tiempo de duplicación (h)	Células / pozo (100 µL)
U251	Sistema nervioso central	25.4	7 500
PC-3	Próstata	28.7	7 500
HCT-15	Colon	18.1	10 000
K-562	Leucemia	19.0	5 000
MCF-7	Mama	25.6	5 000
SKUL-1	Pulmón	24.0	7 500

Una vez hecho lo anterior todas las líneas celulares fueron incubadas por un periodo de 24 h a 37 °C, y se estabilizaron antes de la aplicación de los extractos y los compuestos.

Los extractos fueron evaluados a una concentración de 50 µg/mL, y los compuestos a 50 µM/mL ambos fueron solubilizados en dimetilsulfoxido (DMSO, 40 µM), en diluciones de 0.1 a 0.05% dependiendo de la solubilización de los extractos y compuestos. Inmediatamente después de la preparación de las soluciones se agregaron 100 µL de disolución a los pozos. Dado que los compuestos y extractos a evaluar no fueron filtrados o esterilizados la contaminación bacteriana fue controlada con la adición de gentamicina. Se utilizó como control positivo doxorubicina. Posteriormente los cultivos con tratamiento y el control se incubaron por un período de 48 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. El crecimiento y viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de Sulforodamina B (SRB).

Posteriormente a la incubación por 48 h de los cultivos celulares, estos fueron fijados *in situ* adicionando 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) frío (50% p/v) y estos se incubaron por 60 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante por decantación y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada. Posteriormente se adicionó a los pozos 100 µL de solución SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%) durante 10 min, el exceso de SRB se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1%. Finalmente, el botón celular teñido se solubilizó con buffer Tris y la densidad óptica (DO) fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. (Lector de ELISA BIO-TEK. ELx 808). La densidad óptica es proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto o extracto prueba (Monks et al., 1991; Houghton et al., 2007). La citotoxicidad es reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó de acuerdo a la siguiente expresión. % Inhibición del crecimiento =  $100 - (DOr \text{ (muestra)} / DOr \text{ (vehículo)}) * 100$ .



### 13.6.2.-ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA (Ensayo de TPA).

La determinación cuantitativa de la actividad antiinflamatoria de los extractos se realizó mediante el método de inducción de edema en oreja de ratón por el 13-acetato de 12-O-tetradecailforbol (TPA).

Se emplearon un promedio de 6 ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25 g) los cuales se pesaron y se separaron en tres grupos de dos, un grupo control y 2 grupos tratados.

Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal.

A los grupos control y tratados se les aplicó tópicamente 10  $\mu$ L de una solución etanólica de TPA (250  $\mu$ g/mL) en la oreja derecha, y 10  $\mu$ L de etanol en la oreja izquierda aplicando para ambos casos 5  $\mu$ L en cada cara de la oreja con ayuda de una micropipeta Hamilton, 10 minutos después de la aplicación de TPA, a los grupos tratados se aplicaron 20  $\mu$ L de los extractos en ambas caras de la oreja derecha a las dosis de 1.0 mg/oreja disueltos en disolventes afines a los extractos y compuestos (diclorometano, acetato de etilo y metanol). En la oreja izquierda solo se aplicó 20  $\mu$ L del vehículo. Se dejaron 4 h de post-aplicación y eventualmente cada grupo de animales fue sacrificado por dislocación cervical tomando biopsias de cada oreja con un sacabocados de 7 mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas fueron depositadas en tubos de eppendorff previamente pesados. Se obtuvieron las diferencias de pesos entre la oreja control y la tratada de cada animal. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación (Merlos et al., 1991):

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[ \frac{\text{peso de la oreja tratada}}{\text{peso de la oreja control}} \times 100 \right]$$

## 14.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento cromatográfico de los extractos con mayor actividad biológica permitió el aislamiento del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol, obtenida tanto del extracto de acetato de etilo así como de la fracción de acetato de etilo proveniente de la partición del extracto metanólico. La elucidación estructural de la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol se llevo a cabo por el análisis y comparación de los datos espectrales de este metabolito secundario con aquellos de la literatura.

### 14.1.- RENDIMIENTO DE EXTRACTOS

El rendimiento de los extractos obtenidos por maceración sucesiva con disolventes de diferente polaridad, se cuantifico como un porcentaje a partir de 330.90 g de material vegetal (hojas de *L. anceps*) extraído (Cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimiento del material vegetal de extractos orgánicos.

Disolvente	Peso en seco del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	8.28	2.5
Acetato de etilo	5.43	1.6
Metanol	16.07	4.8
Fracción de AcOEt obtenido a partir de la partición de del extracto metanólico	2.40	0.7

### 14.2. -ANÁLISIS QUÍMICO

Los extractos con mayores actividades biológicas fueron el extracto de acetato de etilo y la fracción de acetato de etilo proveniente de la

partición del extracto metanólico. Con el fin de aislar los metabolitos secundarios, posibles responsables de las actividades biológicas, se decidió realizar el análisis cromatográfico de dichos extractos.

CUADRO 6. EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Fracciones	Disolvente
1-5	Hexano
6-19	(9:1) Hex-AcOEt
20-42	(8:2) Hex-AcOEt
43-58	(7:3) Hex-AcOEt
59-71	(6:4) Hex- AcOEt
72-85	(1:1) Hex- AcOEt
86-102	(4:6) Hex- AcOEt
103-119	(3:7) Hex- AcOEt
115-119	(2:8) Hex- AcOEt
120-123	(1:9) Hex- AcOEt
124-127	AcOEt
128-133	(1:1) AcOEt- Metanol
134-150	Metanol

CUADRO7. FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO DEL EXTRACTO METANOLICO

Fracciones	Disolvente
1-10	Hexano
11-14	9.5:0.5 Hex- AcOEt
15-27	9:1 Hex- AcOEt
38-35	8:2 Hex- AcOEt
36-43	7:3 Hex- AcOEt
44-47	6:4 Hex- AcOEt
48-58	1:1 Hex- AcOEt
59-63	6:4 Hex- AcOEt
64-72	8:2 Hex- AcOEt
79-83	Acetato
84-86	9:1 AcOEt- Metanol
87-88	8:2 AcOEt- Metanol
89-112	Metanol

Del fraccionamiento del extracto de acetato de etilo se obtuvieron un total de 150 fracciones (Cuadro 6) y de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico se obtuvo un total de 112 fracciones (Cuadro 7).

No obstante que en estudios previos a ciertas especies de la familia Orchidaceae como *Maxillaria densa* y algunas especies de los géneros como *Dendrobium*, *Blettia*, *Coelogyna*, *Cymbidium*, *Epidendrum* y *Eria* (Kovacs, 2008) muestran una presencia casi constante de compuestos de naturaleza fenólica como los fenantrenos, en el análisis químico de los extractos orgánicos de las hojas de *Laelia anceps* no se aislaron. Sin embargo se logró aislar la flavona 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol.

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo en una proporción 9:1 de la columna cromatográfica del extracto de acetato de etilo se obtuvieron 16.8 mg de un precipitado amorfo color amarillo. El análisis de la cromatografía en capa fina, eluida con hexano-acetato 7:3, reveló que se trataba de una mezcla binaria. La separación de esta mezcla se hizo mediante cristalizaciones sucesivas. Se obtuvieron 5 mg del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol con un punto de fusión de 135-140 °C. La determinación de la actividad citotóxica de este flavonol, se llevó a cabo con 2 mg. Los 3 mg restantes se utilizaron para la caracterización del compuesto.

El análisis así como la comparación de los datos espectroscópicos de este compuesto con aquellos informados en la literatura aislada en la especie *Cheilanthes farinosa* Kaulf (Miyazawa et al., 2000; Brahmachari et al., 2008), permitieron su identificación como el 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol (Figura 5). Las constantes físicas del compuesto se muestran a continuación.

Infrarrojo (IR)  $\text{cm}^{-1}$ , (Película): 2 960.02, 1 728.42, 1 581.01, 1462.91 Y 1 283.86 (Espectro 1).

Resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) 300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ : grupos metoxilo en núcleos aromáticos 3.898 (3H,s), 3.874(3H,s) y 3.866(3H,s). Protones en anillos 8.091( 2H, dd, J 1.95, 9.03 Hz , H-2' y H-6') y 7.039 (2H, dd, J 1.95, 9.03 Hz, H-3' y H-5'), ( Espectro 2).

De la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto metanólico, se aislaron 2 mg del mismo flavonol, a partir de la fracción eludida con hexano- acetato de etilo en una proporción 9:1.

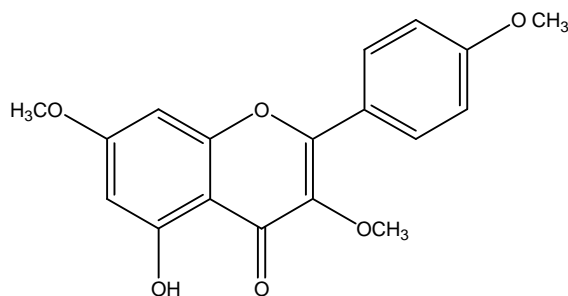


Fig. Estructura química de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol.

En el presente se trabajo se informa por primera vez el aislamiento del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxi flavonol para la especie *Laelia anceps*.

#### 14.2.1.- RENDIMIENTO DE 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol

El rendimiento del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol aislado en el extracto de acetato de etilo y en la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto metanólico se cuantifico a partir de la cantidad de los extractos analizados (Cuadro 11).

Cuadro 11. Tabla de rendimiento del compuesto con respecto a los extractos.

Extracto	Rendimiento de 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol (%)
Acetato de etilo	0.9
Fracción de acetato de etilo del extracto metanólico	0.83

### 14.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS.

#### 14.3.1.- CITOTOXICIDAD

La actividad citotóxica de los extractos orgánicos se determinó en las líneas de cáncer humano, U251, P-C3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1 a la concentración de 50 mg/mL. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los extractos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de los extractos orgánicos de *Laelia anceps*.

Línea celular / Extracto	Inhibición del crecimiento celular (%)					
	U251	P-C3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Hexánico	13.8	S.A	8.4	S.A.	S.A.	4.0
AcOEt	100	87.1	87.78	85.14	77.34	90.85
Metanólico	S.A	9.29	19	2.57	6.46	11.68
Partición AcOEt del extracto metanólico	5.34	19.58	30.73	49.48	93.19	S.A.

U251= glia de sistema nervioso central, PC-3=próstata, K562= leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKUL = pulmón. S.A. = Sin actividad.

El extracto hexánico, mostró, en general muy baja actividad citotóxica, el valor más alto fue para la línea de cáncer de sistema nervioso central

con 13.8% de inhibición de crecimiento, para el resto de las líneas celulares la actividad fue mas baja o fue inactivo.

El extracto de acetato de etilo mostró ser el más activo, las líneas más susceptibles a este extracto fueron: la del sistema nervioso central con un 100% de inhibición de crecimiento y la del cáncer de pulmón con un 90.85% de actividad. Para el resto de las líneas celulares se observa una actividad del 77 al 87%. El análisis cromatográfico de este extracto permitió el aislamiento de un flavonol con propiedades citotóxicas, por lo que es probable que la actividad de este extracto se deba en parte a la presencia de este metabolito secundario.

Por otro lado, el extracto metanólico mostró valores de actividad muy baja en todas las líneas celulares, teniendo el valor mas alto en la línea de cáncer de pulmón con un 11.68% de inhibición. Sin embargo la fracción de acetato de etilo proveniente de la partición de éste extracto, mostró un efecto de inhibición de crecimiento del 93.19% para la línea de cáncer de mama y valores de 49.84 y 30.73%, para las líneas de cáncer de colon y leucemia respectivamente.

#### 14.3.2.-ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Los valores de actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos, en el modelo del TPA (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición de edema en orejas de ratón.

Extracto	Inhibición de edema (%)
Hexánico	51.13
Acetato de etilo	67.92
Metanol	44.59

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar (n=3).

El extracto que presento mayor actividad fue el de acetato de etilo con un 67.92%, este extracto también fue el más activo en la actividad citotóxica.

### 14.3.3.- ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxi flavonol.

La actividad citotóxica del compuesto se evaluó mediante el ensayo de la sulforroamina B.

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular del compuesto aislado del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxi flavonol.

Línea celular	Inhibición del crecimiento celular (50µM) (%)
U251	49.68
P-C3	50.18
K562	46.42
HCT 15	59.56
MCF7	93.64
SKUL	S.A.

U251=glia de sistema nervioso central, PC-3=próstata, K562= leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKUL = pulmón. S.A.= Sin actividad.

Como se observa (Cuadro 12) para el 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxi flavonol, el valor mas alto se presenta en la línea celular de cáncer de mama (MCF7) con un 93.64% de inhibición, este valor es muy similar al que exhibe la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico en la misma línea (93.19%), con lo cual podemos suponer que dicha actividad del extracto se puede atribuir a la presencia del compuesto.

En cuanto a la actividad del extracto de acetato de etilo con respecto a la actividad del compuesto en la línea celular (MCF7), esta no es muy



similar pero también se considera alta (77.34%), por lo tanto también se podría atribuir su actividad a la presencia de dicho compuesto.

## 15.- CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados se puede concluir que:

Los extractos orgánicos de las hojas de *Laelia anceps* poseen actividad citotóxica variable, siendo más activo el extracto de acetato de etilo con valores por arriba del 70% de inhibición en cuatro de las líneas celulares (P-C3, K562, HCT-15, MCF-7), teniendo los valores más altos para las líneas de sistema nervioso central (100%) y cáncer de pulmón (90.85%). Por otro lado la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico mostró una mayor actividad para la línea de cáncer de mama con 93.07% de inhibición

En cuanto a la actividad antiinflamatoria esta mostró valores medios para los tres extractos, teniendo el extracto de acetato de etilo el valor más alto el más alto.

Del el análisis químico, se logro aislar el compuesto 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol, reportado en la literatura con actividad antimutagenica (Miyazawa et al., 2000) y antimicobacterial (Brahmachari et al., 2008), siendo este el primer estudio de actividad citotóxica que se realiza a dicho compuesto y reportado por primera vez para esta especie y para la familia, mostrando selectividad para la línea de cáncer de mama con un valor del 93.64% siendo este muy similar al de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico con lo cual se puede atribuir la actividad de dicho extracto a la presencia del compuesto.

## 16.-BIBLIOGRAFÍA

- Aguso, G. y Toro, S. 1999, Flavonoides, Capitulo 14 en Farmacognosia general, Villar del., A. (Editor), Editorial Síntesis, Madrid p.208-215.
- Agusti-Escasan A., A. Vallano-Ferraz., 2006. Gastric protection and treatment with low-dose aspirin. Medicina Clínica; 12 (6): 232- 235.
- Alemán S., L. Riviera, E. Castillo, M. Villalobos, G. Vergara, S.Estrada. 2007. Determinación del efecto vasorrelajante de los extractos diclorometanico y metanolico de la especie *Ocidium pachyphyllum* (Orchidaceae). Revista Latinoamericana de Química; 35: 141.
- Anaya M. L. 2003. Ecología química. Plaza y Valdez. México pp. 34-43.
- Andrade-Cetto A., Michael H. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology: 99 ; 325-348
- Audesirk, T., Audesirk, G. y Byers, B. 2003. Biología, la vida en la tierra. Pearson Educación, México, pp. 338-345.
- Bagozzi D.2003. Traditional medicine. World Health. Organition Fact sheet; 134. En línea [www.who.com](http://www.who.com) (Septiembre 2008).
- Benitez, H. y M., Bellot. 2009. En línea, [www.ine.gob.mx./publicaciones/libros/395/benitez\\_bellot.html](http://www.ine.gob.mx./publicaciones/libros/395/benitez_bellot.html). (Marzo 2008)
- Brahmachari, G., A. Gangopadhyay, S.Jash y L.Chandra. 2008. 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol from *Cheilanthes farinosa* Kaulf. (Cheliantaceae).Journal Indian Chemistry Society, 18, 546-547.

- Cano G., Marroquin, J. 1994. Taxonomía de las plantas superiores. Trillas México.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. UNAM, Méx. pp. 268-294.
- Chen Y., J. Li, L. Wang, Y. Liu. 2008. Aromatic Compounds from *Dendrobium aphyllum*. Biochemical Systematics and Ecology; 36: 458-460.
- Chen Y., Y. Li, Chen Q., Y. Zhang, L. Wang, Y. Liu. 2008.1, 4, 5-Trihydroxy-7-methoxy-9H-fluoren-9-one, a new cytotoxic compound from *Dendrobium chrysotoxum*. Food Chemistry; 108: 973-976.
- Chen Y., Y. Liu, J. Jiang, Y. Zhang, B. Yin. 2008. Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. Food Chemistry; 10: 1016.
- Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 1997, Situación actual sobre la gestión, manejo y conservación de la diversidad biológica de México, Primer reporte nacional a la conferencia de las partes del convenio sobre diversidad biológica. En línea, [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx), (marzo 2008.)
- Coussens L.M., Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. Nature 420: 860-867.
- Cragg G. M., Y. Newman, D. J., Plants as source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 100(1-2): 72-79.
- Cy, N R., M.I. Singk, L.L. Ach11ureddy, H.N. Nigg, S. Nagy. 1985. Isolation and partial charactenzation of phytotoxic compounds from lantana (*Iraniana cámara L*) Journal of Chem. Ecol: 11 (8 ); 979-988.

Departamento de Apoyo a Jóvenes Indígenas y Migrantes, 2004, Medicina tradicional: Patrimonio cultural indígena. Instituto Mexicano de la juventud. En línea <http://www.imjuventud.gob.mx>, (marzo 2008)

Delgado M., S. Palma 2006. Epidemiología del cáncer, en Avances en oncológica básica y aplicada. Granada p.19-39.

Dwight D., Min C., Uma O. and Vineet R. 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Natural Products Report: 24; 1225-1244.

En línea <http://www.cancer.gov/search>, septiembre 2008

Estrada S. J. J. López-Guerrero, R. Villalobos-Molin and R. Mata. 2004. Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*. Fitoterapia; 75: 690-695.

Estrada S, A. Rojas, Y. Mathison, A. Israel, R. Mata. 1999. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3, 4'-dihydroxy-5, 5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. Planta Medica; 65(2):109-14.

Estrada S, L. Acevedo, M. Rodriguez, R. Toscano, R. Mata. 2002. New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. Natural Product Letters; 16(2):81-86.

Estrada S., R. Toscano, R. Mata. 1999. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. Journal Natural Product 62, 1175-1178.

Farooqui M., Y. Li, T. Rogers, T. Poonawala, R. Griffin, C. Song, K. Gupta. 2007. COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-

induced promotion of angiogenesis, tumour growth, metastasis and mortality, without compromising analgesia. British Journal of Cancer: 97; 1523 - 1531.

Fitzpatrick F. A. 2001. Inflammation, carcinogenesis and cancer. International Immunopharmacology; 1: 1651- 1667.

Flores-Rosete G., M. Martínez-Vázquez. 2008. Anti-inflammatory and Cytotoxic cycloartanes from Guayule (*Parthenium argentatum*). Natural Product Communications: 33; 413-422.

Guerra, F. 1982. Historia de la medicina. Ediciones Norma, Madrid, pp. 10-20.

Hågsater E., Soto M., Salazar G., Jiménez R., Lopez M., Lopez M., Dressler R. 2005. Las orquídeas de México. Chinoín pp. 39-71.

Halbinger, F. 1993 Laelias de México. Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. Mexico pag.9-24.

Hartmann T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry : 68; 2831-2846.

Haslam E. 2002. Plant secondary metabolism. Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons, en línea [www.els.net](http://www.els.net). (Septiembre) 2008

High-Flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of National Cancer Institute; 33: 757.

- Houghton P., R. Fang, I. Techatanawat, G. Steventon, P. Hylands, C.C. Lee. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plants extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods, 42; 377-387.
- Johnsen J., M. Lindskog, F. Ponthan, I. Pettersen, L. Elfman, A. Sveinbjornsson, P. Kogner. 2004. Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. Cancer Research: 64; 7210-7215
- Kovacs A., A. Vasas, J. Omán. 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity; Phytochemistry; 69:1084-1110.
- Kuklinski C. 2003. Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancia medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. Barcelona, pp. 51-53.
- Lampila, P., M. Lieshout, B. Gremmen, L. Lahteenmaki.2008. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. Food Research International. 42; 122-129
- Lawrence T. 2007. Inflammation and cancer: a failure of resolution? Pharmacological sciences; 28: 4: 162-165.
- Larson S.C., E. Giovannucci and A. Wolk. 2006. Long-term aspirin and colorectal cancer risk: a cohort study in Sweden. British Journal of Cancer: 95; 1277-1279.
- L. Qiutang and I. M.Verma. 2002. NF-kB regulation in the immune system. Nature Reviews: 2; 725- 746.

- Lie-Fen S., C. Chih-Huai, L. Chiu-Ping, W. Sheng-Yang, K. Pei-Ling, S. Jane, C. Allen, T. Chi-Meng, Y. Ning-Sun. 2004. Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by phytochemicals from *Anoectochilus formosanus*. Journal Biomedic Sciences; 11:928-939.
- Martínez M. 1979. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 271, 1174.
- Méric JB, S. Rottey, K. Olausson, JC. Soria, D. Khayat, O. Rixe, JP. Spano. 2006. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 59:51-64.
- Merlos, M., L. A. Gomez, M. Giral, M. L. Vencat, R. J. Garcia, J. From. 1991. Effects of PPF- antagonist in Mouse ear edema induced by several inflammatory agents. British Journal of Pharmacology; 104: 990-994.
- Miyazawa M., Y. Okuno, S. Nakamura, H. Kosaka. 2000. Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. Journal of Agric. Food Chemistry, 48; 642-647.
- Mohar Betancourt A., M. Frías Mendivil. 2003 Epidemiología del cáncer, Capitulo 2, en Manual de oncológica, procedimientos medicoquirurgicos 2ª Edición. Herrera Gómez A., M. Granados García (Editores). MC. Graw Hill, México p.9-25.
- Monks, A., D. Scudiero, P. Skehan, R. Schoemaker, K. Paul, D. Vistiea, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, Vaigro- Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, 1991. Feasibility of a High-Flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultered human tumor cell lines. Journal of National Cancer Institute; 33: 757.



Organización Mundial de la Salud Ginebra 2005, Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. en línea <http://www.sld.cu/galerias/pdf> (marzo 2008).

Organización Mundial de la Salud y de la Unión Internacional Contra el Cáncer. 2005. Acción mundial contra el cáncer, en línea [www.who.int/entity/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf](http://www.who.int/entity/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf). (septiembre 2008)

Parham, P. 2006, Inmunológica 2ª edición, Edit. Médica Panamericana, México pag.260-265.

Potter, J. D y C. M. Ulrich, 2006. COX-2 and gastric cancer: More on inflammation and neoplasia. Gastroenterology: 130; 2198-2200.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 2001 Inmunológica 5ª edición, Ediciones Har Court, Madrid pag 61-66.

Rojas, Garcidueñas M.2003. De la vida de las plantas y de los hombres. Fondo de Cultura Económica, México, pp. 13-24.

Samuel B., Jones, Jr. 1987. Sistemática Vegetal. 2ª edición. Fuentes impresores. México.

Soto-Arenas 1993 Clasificación intraespecífica de Laelia anceps. Orquidea. Mexico. 13(1-3) 125-144.

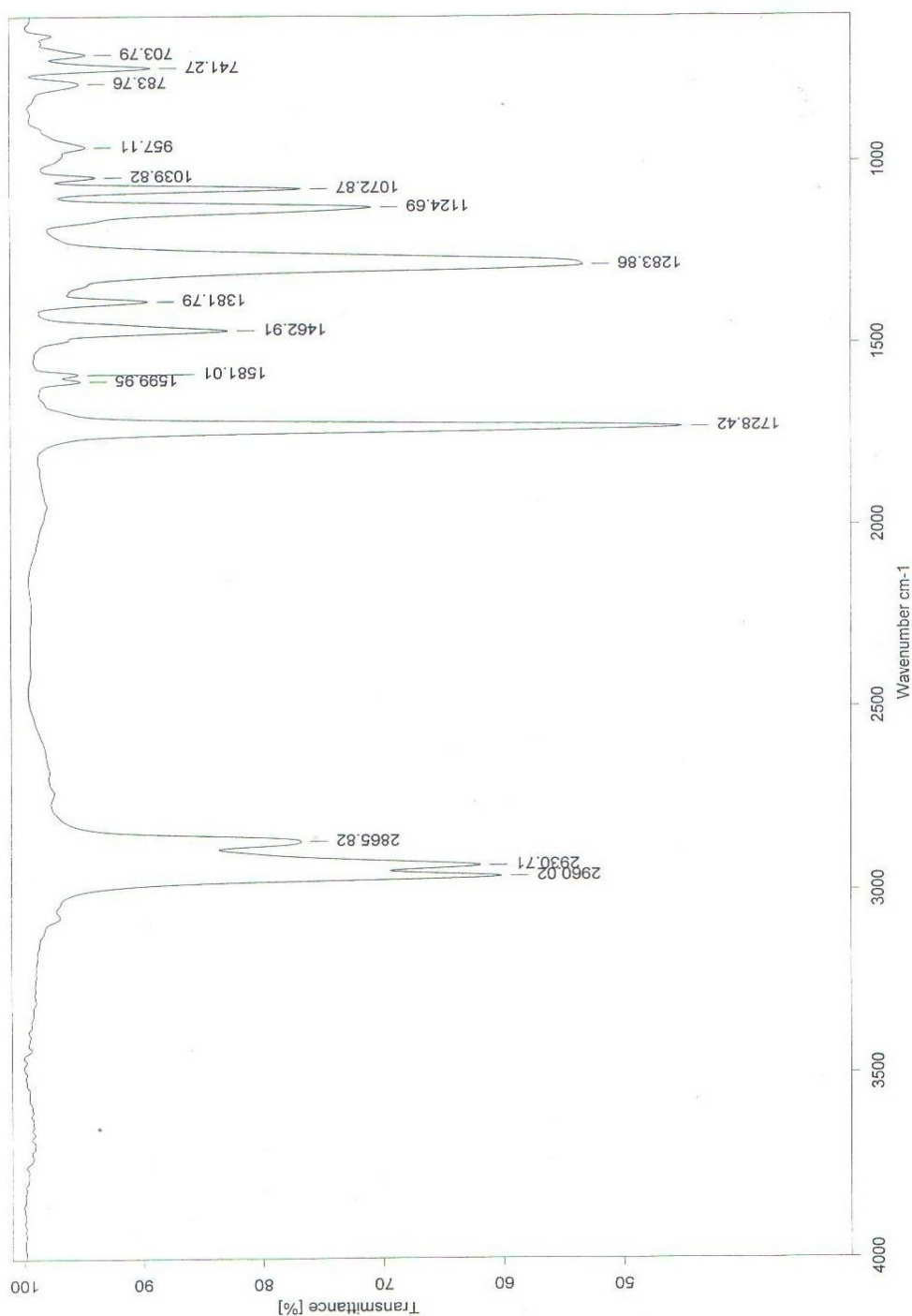
Soto.2008. Antihypertensive and vasorelaxant activities of Laelia autumnalis are mainly through calcium channel blockade. Vascular Pharmacology; 49:26-31

- Valencia-Islas N.A., R. Paul., W.T Shier., R. Mata., H.K. Abbas. 2002  
Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the  
orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna pausicostata*) frond and  
root tissues. Phytochemistry; 61 (2): 141-148.
- Vergara-Galicia J., R. Ortiz-Andrade, P. Castillo-España, M. Ibarra-  
Barajas, I. Gallardo-Ortiz, R. Villalobos-Molina, S. Estrada-.
- Vanhaelen, M., J. Lejoly, M. Hanocq, L. Molle, 1991. Cümatic and  
geographical aspects of medicinal plant constituents. In The  
medicinal plant industry. De. By R.O.B. Wijesekera. Florida, CRC  
press. p. 59-76.
- Waizel B. 2006. Introducción a la ecología vegetal. Capitulo 7 en Las  
plantas medicinales y las ciencias, una visión multidisciplinaria. 1<sup>a</sup>  
edición, Instituto Politécnico Nacional, México. p.111-200.
- Wilson D.M., W. Fenical, M. Hay, N. Lindquist, R. Bolser.1999.  
Habenariol a fresh water feeding deterrent from the aquatic orchid  
*Habenaria repens* (Orchidaceae).Phytochemistry; 50: 1333-1336

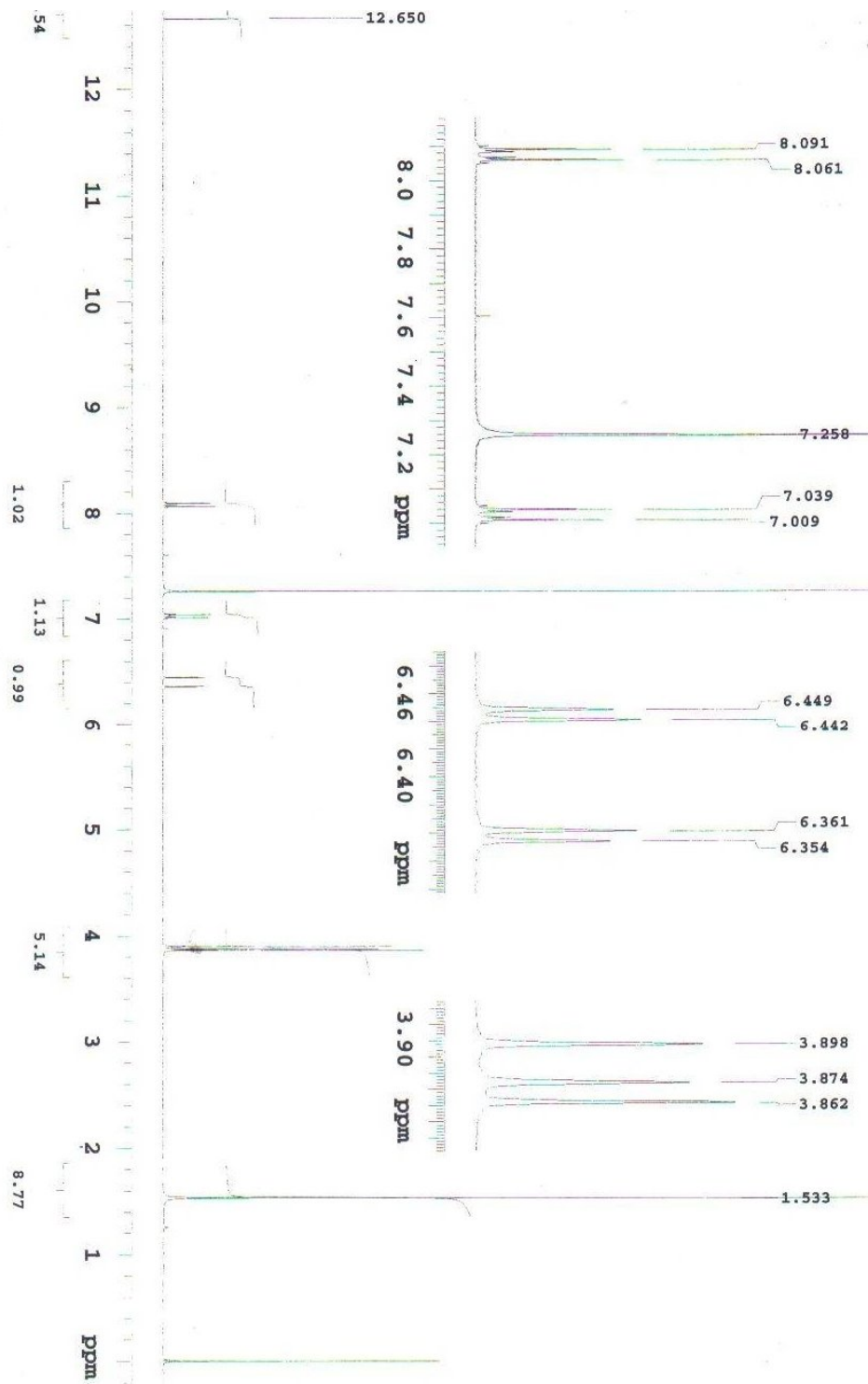
---

## 17. ANEXOS

### Espectros de IR, y RMN <sup>1</sup>H



ESPECTRO 1. Espectro de infrarrojo del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol.



ESPECTRO 2. Espectro de resonancia magnética nuclear RNM <sup>1</sup>H del 5-hidroxi, 3,7,4'-trimetoxiflavonol.

