



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DE ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE *STRUTHANTHUS INTERRUPTUS*
(KUNTH) (LORANTHACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS ISAAC MORALES CARBALLO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Apellido Paterno
Apellido Materno
Nombres
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del Tutor

Grado
Nombre
Apellido Paterno
Apellido Materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre
Apellido Paterno
Apellido Materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre
Apellido Paterno
Apellido Materno

5. Datos del Sinodal 3

Grado
Nombre
Apellido Paterno
Apellido Materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre
Apellido Paterno
...Apellido Materno

7. Datos del trabajo escrito.

Título
Número de páginas
Año

1. Datos del Alumno

Morales
Carballo
Carlos
Isaac
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302146659

2. Datos del Tutor

Dra.
Patricia
Guevara
Fefer

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Eva
Aguirre
Hernández

5. Datos del sinodal 3

Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Beatriz
Zúñiga
Ruíz

7. Datos del trabajo escrito

Estudio Fitoquímico y de Actividad Biológica de
Struthanthus interruptus (kunth) (Loranthaceae)
43 p
2011

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Como tributo a todos estos años de enseñanza, con todo mi respeto y admiración, por la alegría y orgullo que me has hecho sentir desde que me arropaste en tus filas hace nueve años, gracias por otorgarme el regalo más valioso que uno puede recibir, la oportunidad de superarme y el orgullo de pertenecer a la máxima casa de estudios en nuestro país.

Gracias

A todos aquellos profesores que durante mi formación profesional aportaron algo a mi persona, por ello muchas gracias.

Quiero agradecer a la **Dra. Patricia Guevara Fefer** por la dirección del presente trabajo de tesis y su gran apoyo durante esta etapa tan importante de mi formación profesional.

A la **Dra. Josefina Herrera Santoyo**, por los valiosos comentarios que ayudaron a enriquecer el presente trabajo, por su paciencia y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de fitoquímica.

A la **Dra. Eva Aguirre Hernández**, por el gran apoyo en el trabajo de laboratorio y sus acertados comentarios que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

A la **Q.A. Verónica Muñoz Ocotero** por su paciencia y valiosas observaciones en el trabajo de laboratorio.

A la **M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz** por su valioso apoyo en el trabajo de laboratorio y sus comentarios que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

A la **Biol. Gisela Esperanza Duran Rodriguez**, por su valioso apoyo y consejo en mi estancia en el laboratorio que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo **a mis padres**, ya que gracias a su valioso esfuerzo, trabajo, guía, paciencia y apoyo jamás hubiera logrado alcanzar esta meta.

A mis **hermanas** que siempre han sido una valiosa guía en mi vida y fuente de admiración, gracias por todos sus consejos y su cariño que me ayudaron a esforzarme a lograr esta meta.

A mi **hermano Guillermo**, donde quiera que estés espero te sientas orgulloso de mi. Gracias por ser parte de mi vida y haberme regalado unos años en la infancia tan divertidos y memorables.

A **mis tíos** (amigos de mis padres), **Carlos Moreno, Manolo, Socorro, Conny, Toño, Roberto, Eduardo, Macaria** que siempre me han apoyado y me han brindado su cariño. Por supuesto a mis primos también (Los hijos de los amigos de mis padres) **Agustín, Hector y Pamela**, con quienes crecí y me brindaron su valiosa amistad. Gracias a todos por ser parte de mi vida y mi gran familia.

A mi tío **Miguel y tía Paula**, por su valioso apoyo que me brindaron para la realización del presente trabajo, sus valiosos comentarios y sobre todo por el cariño que me han mostrado.

A mis abuelos (**los cuatro**), de verdad pocas personas pueden decir esto a mi edad, pero me hace muy feliz contar con todos ustedes, por su apoyo, sabios consejos y su sincero cariño hacia a mí que me motiva siempre seguir adelante. **Amalia, Gaudencio, Eufrosina y Ángel**.

A mi tío Gaudencio quien siempre me alentó a continuar mis estudios y superarme como persona. Gracias

A mis amigos de la secundaria: **Paty, Bastarrachea, Juan Carlos, Coque y Analilia**, en verdad es un orgullo tener tan valiosos amigos. Recordar con ustedes viejas y divertidas vivencias es siempre un placer. Gracias a todos

A mis amigos de la preparatoria: **León, Erika y Daniel** con quienes pase excelentes momentos en su compañía, y con quienes me la sigo pasando genial cuando nos reunimos, gracias por sus divertidos comentarios y excelentes vivencias. Viva la prepa 6!!!!

A mis amigos de la Universidad: Por orden de aparición sin más ni menos la banda buitrona (**Erik, Oscar y Cristian**) de verdad los estimo mucho amigos, vayas vivencias que pasamos juntos, muchas gracias por su apoyo, sus comentarios, consejo, pero sobre todo su sincera amistad y que buenas retas. Las “niñas” (**Ana, Dulce; Diana, Ivette y Vere**), son y siempre serán mis mejores amigas, gracias por todos sus consejos, sus divertidas palabras, sus comentarios y todo el cariño que me han brindado, lo logramos **Beto!!!!**

A mis compañeros del taller de ritmos: **Vania** ni modo más que maestra eres amiga, de verdad eres mi teacher favorita, gracias por los regaños que tanto me divierten (ahora), y por los sabios y valiosos consejos, **Erik** por las retas de magia al igual que **Javier**, en verdad los estimo mucho la pasamos chévere mientras estuvimos todos ahí, **Marcela** por tus elocuentes, divertidos y numerosos comentarios, a todos ustedes gracias.

A **Alejandra Barrios** por todo ese divertido tiempo que atesoro tanto de convivencia contigo, de verdad te admiro mucho, por tu frescura, inteligencia, elocuencia, dedicación y sobre todo por la buena vibra que siempre tuviste conmigo, te quiero mucho, gracias **Ale**.

A mi hermanita **Ivette**, tenias que tener mención especial, simple y sencillamente porque te quiero mucho y te admiro por esa fortaleza y ganas de vivir la vida, a pesar de las dificultades que has pasado. Dedico también este trabajo a tu papi por haberme brindado la oportunidad de tener una hermana más. Gracias

Banda Papalote: Que decir de todos ustedes caramba. Muy fácil, que son geniales todos. Muchas gracias por los divertidos momentos de enseñanza que pase en su compañía en el Museo, hicieron de la estancia toda una experiencia muy divertida. Gracias “Jefas” (**Estela y Lidia**) de verdad que su titulo de no es de a gratis, aprendí mucho de ustedes por su profesionalismo y dedicación.

Banda Pertenezco: **Chucho, Roberto, Kenia, Nickte-ha, “Lupillo”, “Kryspin”, “Reina del Sur”, “Reina Fungi”, “Goido”** y demás personalidades me enseñaron a disfrutar mi trabajo gracias a todos chicos.

Banda Temporal: **Ricardo, Richard, Dulce, Ivette, Alejandra, Kary, Cinthia, Marco, Adan, Mayra, y todos los demás compañeros**, gracias por enseñarme a trabajar en equipo y apasionarme tanto por un tema, los admiro a todos por su dedicación, esfuerzo y los buenos momentos que pasamos juntos en la temporal.

A mis compañeros de laboratorio **Enrique** y **Jose**, muchas gracias por todos sus comentarios y observaciones durante mi estancia en el laboratorio, así como sus valiosos comentarios y apoyo en el trabajo de laboratorio.

Finalmente y no por ello menos importante al contrario, **Gisela** de verdad me apoyaste mucho para la realización del presente trabajo por ello muchísimas gracias, te ganaste toda mi admiración por tu dedicación, perseverancia y constancia. Valoro mucho cada comentario que hiciste que ayudo a enriquecer mi formación y el presente trabajo. Gracias por brindarme tu confianza, amistad y por el apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

“Enseñar no es una función vital, porque no tiene el fin en sí misma; la función vital es aprender” “Los grandes conocimientos generan grandes dudas”

Aristóteles.

“La ignorancia afirma o niega rotundamente; La ciencia duda. “

Francois Marie Arouet Voltaire

“La duda es la madre del descubrimiento”

Ambrose Bierce

“Solo a los angeles les es dado pisar en la línea sin temor a caer”

Raúl Renán

Resumen

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en México está en las 10 primeras causas de muerte. Esto ha motivado la búsqueda de fuentes alternativas para su tratamiento como el uso de plantas medicinales, las cuales son un recurso accesible para la población. En el presente trabajo se reporta la actividad biológica del “muérdago” *Struthanthus interruptus* en dos modelos biológicos utilizados para la detección de compuestos químicos con potencial actividad citotóxica. *Struthanthus interruptus* es un representante americano de la familia Loranthaceae, la cual es reconocida por el uso medicinal de varias de sus especies. Se validó la actividad citotóxica de *Struthanthus interruptus* con el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* y en seis líneas celulares de carcinoma humano (colon, mama, leucemia, glía de sistema nervioso, próstata y pulmón) donde se observó que extractos de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) generaron porcentajes de mortandad mayores al 50% en *Artemia salina* y porcentajes de inhibición de crecimiento en líneas celulares cancerosas superiores al 50%, por lo cual *Struthanthus interruptus* es una planta con potencial actividad antitumoral. También se realizaron pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios y análisis químico de cromatografía en capa fina (CCF), en estas pruebas se detectó la presencia de terpenoides y flavonoides principalmente y en los extractos más polares (metanólicos) se detectó presencia de glucósidos y alcaloides.

Contenido

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
	2.1. Descripción botánica del género <i>Struthanthus</i>	3
	2.2. Ubicación taxonómica del género <i>Struthanthus</i>	4
	2.3. Importancia ecológica y distribución en México.	5
	2.4. Interacción planta parasita-hospedero y su importancia ecológica.	7
	2.5. Usos terapéuticos de la familia Loranthaceae	10
	2.6. Farmacología y compuestos químicos encontrados en “muérdagos”.....	11
	2.7. Breve epidemiología descriptiva del cáncer en México y la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral en plantas.....	13
III.	OBJETIVOS	17
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	18
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	5.1. Recolecta y preparación del material vegetal del material vegetal.....	20
	5.2. Obtención de Extractos.....	20
	5.3. Detección de grupos de metabolitos secundarios.....	20
	5.4. Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	21
	Pruebas Biológicas.....	22
	5.5. Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia Salina</i>	22
	5.6. Bioensayos de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer.	23
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
	6.1 .Determinación de la presencia de grupos de metabolitos secundarios.	24
	6.2 Análisis por Cromatografía en Placa Fina.....	25
	6.3 Bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	28
	6.4 Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano.....	32
VII.	Conclusiones	35
VIII.	Referencias Bibliográficas	36

I. INTRODUCCIÓN

Algunas de las especies vegetales conocidas comúnmente como “muérdagos” han sido utilizadas popularmente en México para tratar diversas afecciones entre las que figura el cáncer (Gerson *et al.* 2006).

Una estrategia para la obtención de nuevos medicamentos, es por medio de la búsqueda de compuestos de origen natural. Aproximadamente el 60% de los compuestos utilizados actualmente para el tratamiento del cáncer, se han aislado a partir de productos naturales (Gordaliza, 2007). A pesar de un aumento en la investigación de plantas a nivel mundial, se estima que únicamente el 10% de las cerca de 250000 especies de plantas superiores se han investigado química y farmacológicamente (Crag y Newman, 1999).

En nuestro país existen plantas que son utilizadas empíricamente en la etnobotánica tradicional para el tratamiento del cáncer como *Cladocolea grahamii* sobre la cual existen reportes científicos que confirman su actividad citotóxica frente a líneas celulares provenientes de carcinomas humanos y otros desórdenes tales como: tumores de piel, diabetes y problemas dermatológicos (Waizel *et al.* 1994), otros reportes en nuestro país informan que *Struthanthus venetus* es una planta potencialmente útil en la terapia cardiovascular, también se ha descrito un efecto hipoglucémico y de relajación muscular (Álvarez, 2003).

Los “muérdagos” como se les conoce a estas plantas, son de importancia económica debido al impacto negativo sobre arboles de valor comercial. En nuestro país el género *Struthanthus* es el segundo mejor representado y su presencia se debe principalmente a la prevalencia de condiciones de disturbio (Calderón y Rzedowski, 1990).

Por otro lado, a pesar de la importancia económica y medicinal del género *Struthanthus* en México, no existe información científica sobre su composición química y propiedades

medicinales de algunas de sus especies. Es por ello, que con el propósito de investigar experimentalmente la posible acción antitumoral y contribuir al estudio de *Struthanthus interruptus*, en el presente trabajo se determinó el perfil de grupos de compuestos químicos en extractos de polaridad creciente obtenidos de diferentes órganos de la especie.

Se realizaron dos tipos diferentes de bioensayo de citotoxicidad. El primero se realizó en *Artemia salina*, y el segundo en líneas celulares de carcinomas humanos. Ambos bioensayos son considerados como una herramienta útil y preliminar para la detección de compuestos con potencial actividad antitumoral.

II. ANTECEDENTES

2.1. Descripción botánica del género *Struthanthus*.

Son plantas parásitas arbustivas por lo general aéreas, foliadas, con tallos cilíndricos o cuadrangulares, con frutos en forma de baya con coloraciones anaranjadas, rojiza o azul. Poseen una capa viscosa para adherirse al hospedero, las semillas presentan un endospermo copioso. El embrión es de color verde brillante, el cual está especialmente adaptado para la polinización y la dispersión por aves (Kuijt, 1968, 1969). Presentan flores con cálculo, el cual es de tamaño generalmente grande y vistoso. Tiene menos de 1 cm de largo y es de coloración verde claro, las hojas son de menos de 5 cm de largo y 2 cm de ancho. La inflorescencia es indeterminada, dioica y se produce en forma de espiga o racimos de tríadas apareadas (Figura 1).

El género *Struthanthus* pertenece a la familia Loranthaceae y está constituido por especies comúnmente conocidas como “muérdagos”. La palabra muérdago proviene del latín *mordicus* que en español significa mordedor.

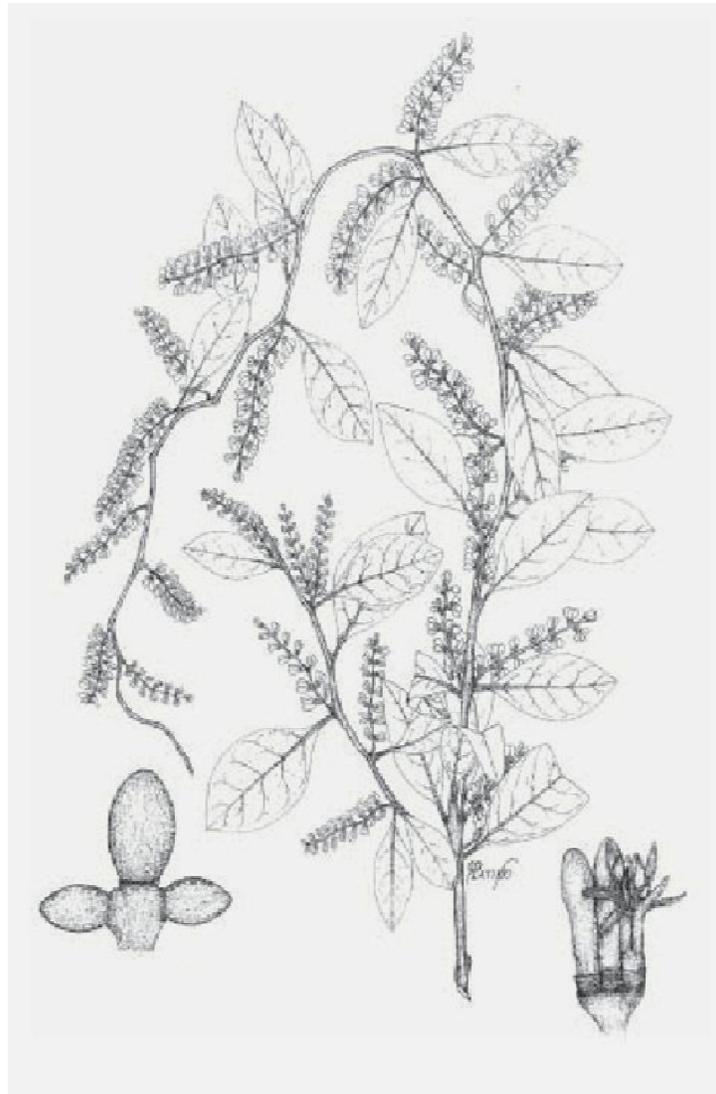


Figura 1. *Struthanthus interruptus* tomado de Chazaro 2005.

2.2. Ubicación taxonómica del género *Struthanthus*.

Los “muérdagos” son plantas con flores incluidas dentro del Orden Santalales. Todos los miembros de este Orden Santalales son hemiparásitos siendo especialmente los “muérdagos” aquellos que parasitan las partes aéreas de las plantas (Nickrent, 2002). A los “muérdagos” se les agrupa en dos familias botánicas que son: Loranthaceae y Viscaceae (Calder 1983).

La familia Loranthaceae cuenta con aproximadamente 900 especies repartidas en 76 géneros de distribución tropical (Barlow, 1983).

Los “muérdagos” del género *Struthanthus*, son enredaderas de varios metros de longitud.

Algunas de las especies descritas para México del género *Struthanthus* son las siguientes:

1. *Struthanthus condensatus*
2. *S. crassipes*
3. *S. deppeanus*
4. *S. filipes*
5. *S. hartwegii*
6. *S. interruptus*
7. *S. loniceroides*
8. *S. marginatus*
9. *S. microphyllus*
10. *S. orbicularis*
11. *S. querciola*
12. *S. palmeri*
13. *S. tacanensis*
14. *S. venetus*

2.3. Importancia ecológica y distribución en México.

Las familias Loranthaceae y Viscaceae, constituyen el grupo más común de plantas parásitas de la flora de todo el mundo.

Los “muérdagos” son perjudiciales agentes patógenos de los árboles, y en muchas partes del mundo son serias plagas forestales (Hawksworth, 1983., Knutson, 1983). Estas plantas están ampliamente distribuidas en todo el continente americano. Tienen una amplia gama de hospederos como coníferas y otras plantas leñosas (Calder, 1983).

Los “muérdagos” del género *Struthanthus* son conocidos comúnmente como “mata palo” o “tripa de pollo”, incluyen entre 50 y 60 especies desde México hasta Argentina (Kuijt, 1975., Cházaro y Oliva 1988). La familia Loranthaceae se localiza en varias regiones de México, siendo el género más representado *Struthanthus*, seguido en importancia por el género *Psittacanthus* (Cuadro 1), (Calderón y Rzedowski, 1990).

Cuadro 1. Distribución de plantas parasitas de importancia económica de la familia Loranthaceae, y principales plantas hospederas del “muérdago” en México.

Genero	Distribución	Coníferas hospederas
<i>Struthanthus</i>	Chiapas, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Sonora, Puebla, Veracruz.	<i>Pinus, Taxodium</i>
<i>Psittacanthus</i>	Michoacán, Veracruz, Tlaxcala, Morelos, Oaxaca, Guerrero, Querétaro	<i>Abies, Pinus</i>
<i>Cladocolea</i>	Jalisco, Michoacán, Distrito Federal.	<i>Pinus</i>

En México de acuerdo al censo realizado en 1991 y 1992 por la Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), los “muérdagos” son la tercera causa de daño forestal. En conjunto estas plantas generan pérdidas por más de dos millones de metros cúbicos de madera, sin considerar la muerte del arbolado y la predisposición a otros agentes patógenos, como insectos y hongos (Vázquez y Cibrián, 1996).

Cházaro *et al* (1993) y otros especialistas afirman que en México existe un gran desconocimiento respecto de la biología, fisiología y otros aspectos de los muérdagos, así como de las medidas silvícolas para su control.

Estas plantas a pesar de estar presentes en todos los estados de la República Mexicana y de ser considerados el problema patológico más importante en los bosques de nuestro país (SARH, 1991-1992), aun no cuentan con una evaluación detallada de su distribución, área total dañada y pérdidas ocasionadas por las principales familias y sus géneros (Rivas, 2009).

En el Valle de México los “muérdagos” generan afectaciones en bosques de pino-encino, y son abundantes en árboles de los géneros: *Quercus*, *Alnus*, *Arbutus*, *Juniperus*, *Pinus* y otras plantas leñosas.

En bosques mesófilos de montaña se les localiza principalmente en zonas con condiciones de disturbio (Calderón y Rzedowski, 1990). Las especies del género *Struthanthus* que infectan coníferas se muestran en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Distribución geográfica del género *Struthanthus* en México y su ocurrencia en plantas coníferas hospederas.

Especie de Muérdago	Distribución	Hospederos
<i>Struthanthus deppeanus</i>	Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz	<i>Pinus patula</i>
<i>Struthanthus interruptus</i>	Michoacán, Morelos	<i>Pinus lawsonii</i>
<i>Struthanthus palmeri</i>	Sonora	<i>Taxodium distichum</i> , var. <i>mexicanum</i>
<i>Struthanthus. Quericola</i>	D.F	<i>Pinus sp</i>

2.4. Interacción planta parasita-hospedero y su importancia ecológica.

Las primeras plantas parásitas eran fotosintéticamente competentes por lo que se les considera parásitas facultativas, subsecuentemente la fotosíntesis se perdió en varios linajes (Cook *et al* 1972).

Govier y Harper (1965), indican que existe una transferencia de compuestos orgánicos del hospedero a la planta que lo parasita, ya que se demostró que la planta semiparásita *Striga asiática* pudo crecer hasta la madurez y producir semillas viables tomando los compuestos orgánicos necesarios para sobrevivir de su hospedero, ya que fue aislada en completa oscuridad.

La transferencia de compuestos orgánicos entre hospedero y parásito es importante, ya que indica que el hospedero contribuye significativamente en la producción de diferentes grupos de compuestos orgánicos en la planta parásita. Esta información sugiere que el parasitismo está involucrado en la economía hormonal de la planta parásita y su hospedero (Govier *et al.* 1967).

Las plantas hemiparásitas son fotosintéticamente activas, al menos durante un periodo en su ciclo de vida, obtienen agua y otros nutrientes del hospedero por vía del haustorio. Dichas plantas hemiparásitas se dividen a su vez en dos subtipos, lo cual depende del grado de dependencia de su hospedero:

1. **Plantas hemiparásitas facultativas** no requieren de un hospedero para completar su ciclo de vida, se pueden desarrollar hasta la floración y dar semillas viables sin la necesidad de un hospedero (Weber 1981., Mann y Musselman, 1980).
2. **Plantas hemiparásitas obligadas** representan un avance más en un proceso continuo de parasitismo. A diferencia de las hemiparásitas facultativas, las hemiparásitas obligadas deben adjuntarse a una planta hospedera para poder completar su ciclo de vida. Este tipo de parasitismo se divide en los siguientes subtipos.

- a) **Hemiparásitismo obligado primitivo:** incluye a tres familias, Loranthaceae, Viscaceae y Misodendraceae. Estas plantas se conectan al hospedero a través del xilema y a pesar de ser fotosintéticamente capaces no pueden sobrevivir sin el hospedero.
- b) **Hemiparásitismo obligado avanzado:** estas plantas logran conectarse no sólo al xilema, sino también pueden obtener nutrientes a través de conexiones con el floema del hospedero. La pérdida de la función fotosintética ocurre al menos en cierto grado, o durante alguna etapa del ciclo de vida.

Las plantas parásitas por lo tanto, toman y adquieren de su hospedero el agua necesaria para subsistir, así como carbono y nutrientes a través del tejido vascular de las raíces del huésped o brotes.

Las plantas parásitas tienen graves efectos sobre sus hospederos. Por ejemplo, la presencia de la planta hemiparásita *Striga hermonthica* en la raíz del sorgo reduce la biomasa de su hospedero, por más de 30 veces su biomasa original cuando no es parasitada (Parker *et al.* 1984).

Este impacto desproporcionado de plantas parásitas a sus portadores se debe principalmente a cambios en la fisiología del huésped inducidos por el parásito. Las plantas parásitas alteran la morfología y la fisiología de sus anfitriones, estimulando la producción de hormonas de crecimiento o por infusión directa de estas hormonas en el hospedero a través del haustorio (Livingston *et al.* 1984).

El ejemplo mejor estudiado de estos efectos fisiológicos en los hospederos proviene de estudios en el “muérdago” enano (*Arceuthobium spp.*). Este “muérdago” puede constituir menos del uno por ciento de la biomasa de un árbol de coníferas maduro, sin embargo,

aumenta significativamente el uso de agua en el árbol, disminuyendo el potencial hídrico de las hojas lo que debilita al hospedero (Sala *et al.* 2001).

El hemiparásitismo tiene un impacto importante en el crecimiento, alometría y reproducción, y afecta a la estructura de la comunidad, la zonificación de la vegetación y la dinámica de la población (Pennings y Callaway, 2002).

2.5. Usos terapéuticos de la familia Loranthaceae

Algunas especies pertenecientes a la familia Loranthaceae son reconocidas en la medicina popular por tener propiedades terapéuticas. En Europa, el “muérdago europeo” (*Viscum album*); tiene uso terapéutico en el tratamiento de la epilepsia, la infertilidad y la debilidad. También posee efectos sobre el sistema cardiovascular y la presión arterial (Youngken, 1951).

En Nueva Zelanda los “muérdagos” suelen ser utilizados como cardiotónicos y en forma de cataplasmas para tratar la “picazón” (Brooker *et al.* 1981).

Filipov, (1994), ha encontrado que los “muérdagos” tienen uso como remedio para el dolor de cabeza, diuréticos y anticonceptivos

En el Sudeste Asiático los “muérdagos” se utilizan en forma de tónicos contra la malaria, y contra el cáncer (Lohezic *et al.* 2002).

En América los “muérdagos” son un remedio efectivo contra el cáncer (Ríos *et al.* 2001; Ríos y Aguilar, 2004). Especies americanas del género *Struthanthus*, suelen utilizarse en forma de macerados contra la neumonía (Correa, 1969; Schultes y Raffauf, 1999).

En México algunas especies de la familia Loranthaceae como *Cladocolea grahamii*, se utilizan tradicionalmente para el tratamiento de problemas urológicos, diabetes, dermatológicos, tumores en la piel y como antiséptico (Waizel *et al.* 1994; Frei *et al.* 1998).

Las hojas de *Struthanthus venetus* son utilizadas en medicina tradicional mexicana como una opción para aliviar la tos y controlar la presión sanguínea, también se ha descrito un efecto hipoglucémico (Marte *et al.* 2009).

2.6. Farmacología y compuestos químicos encontrados en “muérdagos”.

El “muérdago” europeo (*Viscum álbium*) fue utilizado por Rudolf Steiner hace más de 80 años como una terapia alternativa para el tratamiento del cáncer. En la actualidad a los extractos de *Viscum álbium* se les atribuyen propiedades de inmunomodulación y actividad antitumoral (Portalupi, 1987). De esta especie han sido identificados derivados metilados de quercetina, methoxichalconas, glucósidos cardiotónicos (viscoflavina) lectinas, esteroides, viscotoxinas, alcaloides (viscalbina) y polisacáridos (Wagner, 1993).

Estudios químicos y farmacológicos en *Viscum álbium* han demostrado que tiene propiedades citotóxicas e inductoras de la apoptosis (Gabiús *et al.* 1992, 1994; Bussing *et al.* 1996; Hostanska *et al.* 1996,1997).

El extracto orgánico de *Viscum album* inhibe la proliferación de linfocitos murinos activados por mitógenos, así como los linfocitos de la leucemia murina (LB) y las células tumorales del pecho (MMT) (Fernández *et al.* 1998).

Experimentos en animales que desarrollaron tumoraciones, mostraron una reducción de crecimiento del tumor y / o aumento de la supervivencia al inocular directamente en el tumor extractos de *Viscum album* (Kienle *et al.* 2003). Por lo tanto se puede concluir que la inyección del extracto de forma intratumoral es efectiva (Alonso, 2004).

Recientes investigaciones reportan que extractos orgánicos obtenidos a partir de *Viscum album* pueden: Inducir la apoptosis en células tumorales en cultivo, estimular a las células inmunocompetentes y proteger el ADN de células mononucleares.

Phoradendron liga posee propiedades inmunomoduladoras similares a las encontradas en su pariente europeo (*Viscum album*), y se han aislado lectinas con actividad citotóxica como la ligatoxina B, y flavonoides tales como C-glycosiflavonas.

En *Cladocolea grahamii* se ha reportado que en extractos hexánicos y metanólicos de hojas e inflorescencias, tienen actividad citotóxica en líneas celulares de carcinomas de ovario, leucemia murina y cáncer cervicouterino (Waizel *et al.* 1994).

En *Ligaria cuneifolia* (“muérdago argentino”) se han encontrado flavonoides con actividad antiproliferativa y proapoptotica en líneas celulares de carcinomas murinos (Cerdá, *et al.* 2005)

Se ha comprobado que la administración de extractos acuosos de *Struthanthus venetus* obtenidos a partir de hojas secas, generan una disminución de la presión sanguínea en ratas (García, 2006).

Debido a la gran diversidad de compuestos químicos encontrados en algunas especies de “muérdago” tales como: *Viscum album*, la interpretación clínica de componentes farmacológicamente relevantes es difícil, sino se realiza un estudio fitoquímico que involucre un fraccionamiento o purificación de los compuestos (Ernst *et al.* 2003; Horneber *et al.* 2008; Kienle *et al.* 2003, 2007; Kleijnen *et al.* 2010).

2.7. Breve epidemiología descriptiva del cáncer en México y la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral en plantas.

El cáncer en el mundo afecta aproximadamente a 8 millones de personas. En México desde el año de 1990. Los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en la población general y la primera causa en mujeres por arriba de los 25 años de edad, según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), (Mohar *et al.* 1997).

Para el año 2003 en nuestro país se registraron 110.094 nuevos casos de cáncer detectados por el (RHNM). Las defunciones reportadas para ese año por el RHNM se muestran en el Cuadro 3 y 4.

Cuadro 3. Mortalidad reportada por el (RHNM) de cáncer en hombres para el año 2003.

TIPO DE TUMOR	NÚMERO DE DEFUNCIONES
Bronquios y pulmón	4,563
Próstata	4,231
Estómago	2,757
Hígado y vías biliares intrahepáticas	2,108
Páncreas	1,396
Colon	1,077
Leucemia linfoide	895
Encéfalo	880
Laringe	754
Riñón	774

Cuadro 4. Mortalidad reportada por el (RHNM) de cáncer en mujeres para el año 2003

TIPO DE TUMOR	NÚMERO DE DEFUNCIONES
Cuello del útero	4,330
Mama	3,861
Estómago	2,376
Bronquios y Pulmón	2,146
Hígado y vías biliares intrahepáticas	2,369
Páncreas	1,557
Ovario	1,334
Colon	1,108
Vesícula biliar	693
Leucemia linfoide	669

De acuerdo con el programa de prevención y control del cáncer de la secretaria de salud (SSA) diariamente mueren al día en nuestro país alrededor de 10 mujeres únicamente por cáncer de mama. De igual forma el Sistema Único de Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), aporta los casos semanalmente notificados en el país. En el (SUIVE) entre el año 2000 y 2006 se registraron 33, 671 casos de cáncer de mama, lo cual genera una importante pérdida en años de vida en este sector de la población, además de ser una carga económica considerable para muchas familias mexicanas (Cabrera *et al.* 2008).

Los tratamientos convencionales que se utilizan hoy en día contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia tienen la desventaja de ser caros y causar muchos efectos secundarios como son: vómito, alopecia, diarrea, estreñimiento, mielosupresión, anomalías neurológicas, cardíacas, pulmonares y complicaciones renales. Todos estos efectos

secundarios reducen la calidad de vida del paciente, lo que dificulta su correcta observación y medicación. Estos factores muchas veces conducen a la inmunodepresión del paciente, lo que a su vez facilita la progresión del cáncer y las complicaciones asociadas a ello. Además, muchos de estos tratamientos tienen muy limitada actividad contra el cáncer (Mans *et al.* 2000).

Por lo tanto existe la necesidad de descubrir nuevas alternativas de medicamentos contra el cáncer, que sean más potentes, selectivos y menos tóxicos que los que están actualmente en uso.

Más del 50% de los medicamentos utilizados actualmente contra el cáncer se han aislado de productos naturales, principalmente de plantas. Los compuestos aislados incluyen: alcaloides, diterpenos y lignanos. Actualmente hay compuestos que se están probando en fase I, II o III como son el flavopiridol aislado del árbol de la india *Dysoxylum binectariferum*, y otro compuesto aislado de la planta de origen chino *Indigofera tinctoria*, ambos compuestos aislados han demostrado tener actividad antitumoral, con menor grado de toxicidad que los fármacos convencionales (Saklani y Kutty, 2008).

Las proyecciones iniciales de plantas con posible actividad antitumoral se llevan a cabo a través de bioensayos con líneas celulares establecidas, en donde se pueden llevar a cabo mediciones de los efectos de los extractos o de compuestos aislados. Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI), se considera citotóxicamente activo un extracto o un compuesto aislado cuando genere una dosis letal efectiva (ED50) a una dosis de $\leq 30\text{g/mL}$ para el extracto y $\leq 4\text{g/mL}$ para un compuesto aislado (Suffness y Pezzuto, 1990).

Los modelos de detección de actividad citotóxica suministran información preliminar importante acerca de plantas o compuestos aislados con potencial actividad neoplásica. Los bioensayos de citotoxicidad no generan falsos positivos, ya que únicamente consideran extractos de plantas o compuestos que afectan la viabilidad celular.

En la mayoría de los estudios sobre el efecto citotóxico de extractos de plantas y sus compuestos aislados en nuestro país, han utilizado bioensayos de cultivos primarios de tumores humanos o de animales y líneas celulares de carcinoma humano resistentes a medicamentos (Johansson *et al.* 2003; Wickramaratne *et al.* 1995).

Las principales estrategias de selección de plantas con potencial farmacológico contra el cáncer incluyen la selección aleatoria, quimiotaxonómica y de uso medicinal. Es importante conocer el medio de preparación al hacer una selección basada en el uso medicinal ya que esto puede sugerir un método de extracción más adecuado para la planta (Lautié *et al.* 2008).

III. OBJETIVOS

Objetivo general: Contribuir al estudio químico y de actividad biológica de *Struthanthus interruptus* especie hemiparásita que afecta a especies del arbolado urbano en México.

Objetivos particulares:

- Determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en extractos orgánicos de *Struthanthus interruptus*.
- Obtener un perfil cromatográfico de los extractos obtenidos de *Struthanthus interruptus*.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos por medio de dos modelos biológicos: *Artemia salina* y líneas celulares de carcinoma humano.

IV. JUSTIFICACIÓN

Struthanthus interruptus es considerada una especie hemiparásita invasiva que afecta bosques de selva baja caducifolia, bosques de pino encino y arbolado urbano en diversas regiones de América. Por otro lado se conocen usos medicinales de especies de la misma familia. Por lo tanto se planteó un estudio fitoquímico y de actividad biológica en *Struthanthus interruptus* con la finalidad de conocer su composición química y su efecto en dos modelos biológicos, que generen información para mejorar el conocimiento y aprovechamiento de esta especie.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

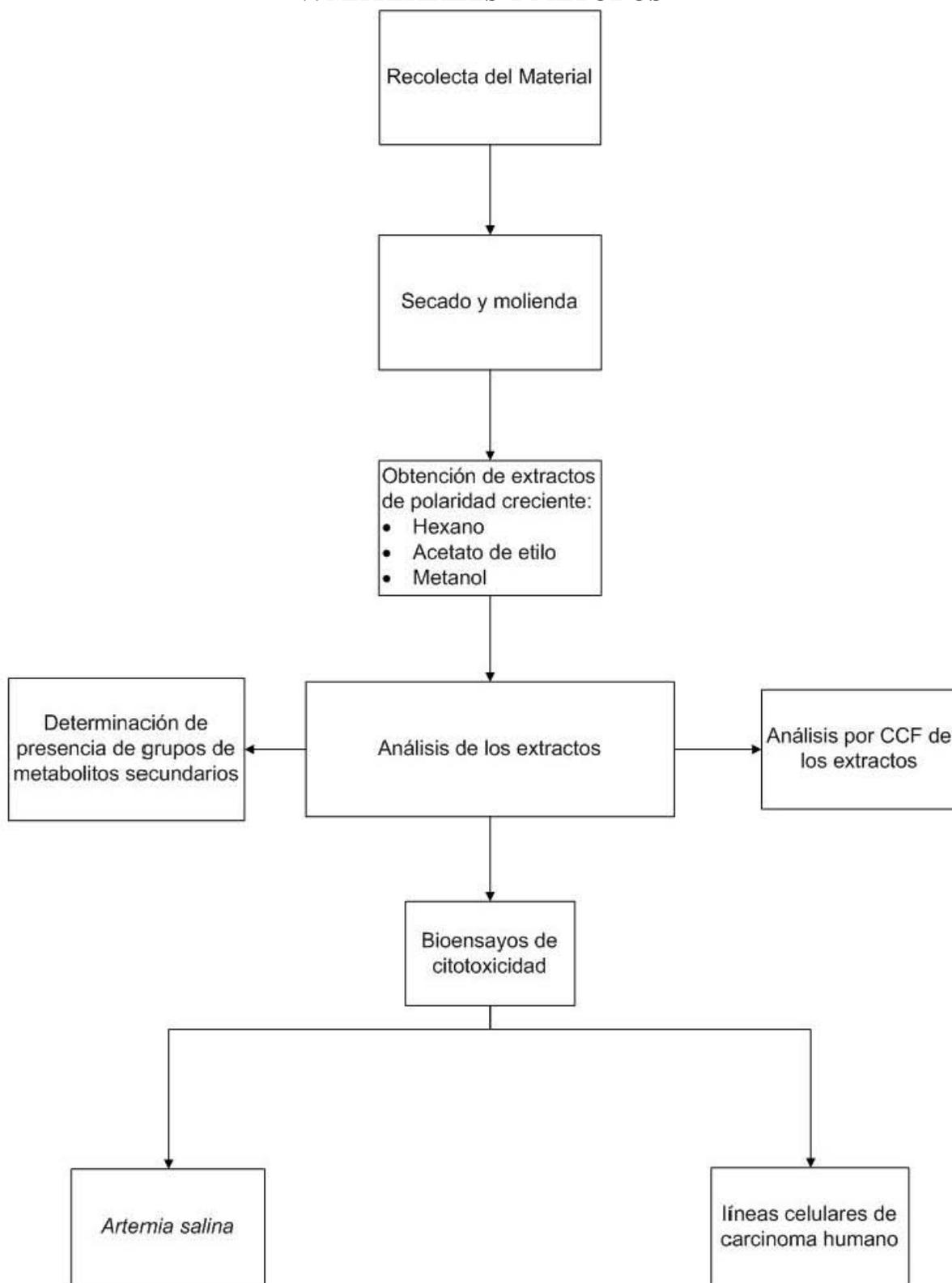


Figura 2. Diagrama metodológico

5.1. Recolecta y preparación del material vegetal del material vegetal.

El material vegetal fue recolectado de la localidad de Yecapixtla en el Estado de Morelos durante el mes de Marzo del año 2009. El material fue identificado por la Biol. María Teresa Cantoral Herrera encargada del Centro de Manejo Fitosanitario para las Areas Verdes Urbanas del D.F (CEMFAV)

El material proporcionado por la Biol. Maria Teresa Cantoral Herrera fué separado y pulverizado para su extracción.

5.2. Obtención de Extractos.

Para cada uno de los órganos de la planta se realizó una extracción por maceración en frío con disolventes de polaridad creciente: (hexano, acetato de etilo y metanol). Para ello se pesaron 250 g de tallo y hoja y 100 g para fruto, los macerados obtenidos de cada parte se filtraron y el extracto se destilo en un rotavapor.

5.3. Detección de grupos de metabolitos secundarios.

Estas pruebas se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Domínguez, (1973). Para cada prueba se utilizaron 5 mg/mL.

- Terpenos y esteroides: reactivo de *Lieberman-Burchard*

Los extractos se redisolvieron en cloroformo y se agregó 1 ml de reactivo Lieberman-Burchard a cada muestra. Se consideró positivo si se presentan tonalidades en colores rojo, vino y verdes.

- Flavonoides: Reactivo de *Shinoda*

Los extractos fueron disueltos en metanol y a éstos se les agregó un trozo de magnesio metálico y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se consideró positivo con variaciones de color en tonos naranjas, verdes o rosas.

- Alcaloides: reactivo de *Dragendorff*

Los extractos metanólicos se redisolviéron en metanol. A las muestras se les adicionó una gota de ácido clorhídrico concentrado y dos gotas del reactivo de *Dragendorff*. La prueba se consideró positiva si se formó un precipitado de color naranja-marrón.

- Alcaloides: reactivo *Ácido Silicotúngstico*

Los extractos metanólicos se redisolviéron en metanol y se les adicionó una gota de ácido clorhídrico y 2 gotas de ácido silicotúngstico. La prueba se considera positiva si se formó un precipitado de color amarillo.

- Glucósidos: reactivo de *Mölich*

Los extractos fueron redisolviéron en metanol, posteriormente se les agregaron dos gotas de solución alcohólica al 5% de α -naftol, y 1 mL de H_2SO_4 concentrado deslizando por las paredes del tubo de ensaye formándose un anillo de color morado en caso de la presencia de este grupo de compuestos.

5.4. Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Para obtener el perfil cromatográfico de cada uno los extractos se utilizaron placas de elución. Se utilizaron dos reveladores: el reactivo de anisaldehído (compuesto que evidencia la presencia de terpenoides) para los extractos hexánicos, acetato de etilo y el

reactivo de RPN (2-aminoetiléster di difenilbórico) para los extractos metanólicos (Anexos).

Pruebas Biológicas

5.5. Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia Salina*.

El bioensayo con *Artemia salina* se ha considerado como una herramienta útil en la detección preliminar de toxicidad. También se ha sugerido como una herramienta útil para la detección de actividad farmacológica en extractos de plantas. Este bioensayo fue descrito por (Meyer *et al.* 1982).

Para la realización de esta prueba se llevó a cabo la preparación de los extractos de cada uno de los órganos a una concentración de 10, 100 y 1000 ppm.

Se preparó solución salina y se agregaron quistes de *Artemia salina*. Los quistes se mantuvieron en incubación a una temperatura de 25 °C con oxigenación constante durante 24-48 h.

Para cada extracto se probaron tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) y su respectivo control. Cada tratamiento contenía 1 mL de extracto, y se realizó por quintuplicado. A cada tratamiento se le adicionó 10 mL de solución salina. Posteriormente se colocaron 10 individuos recién eclosionados a cada tubo. Transcurridas 24-48 h se contabilizó el número de artemias sobrevivientes en cada tubo.

5.6. Bioensayos de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer.

Estas pruebas se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de Ciudad Universitaria de la UNAM. El bioensayo de actividad citotóxica está basado en el protocolo descrito por (Skehan *et al.* 1990). La citotoxicidad de los extractos de prueba utilizados en las líneas celulares en el bioensayo de microcultivo, se determinó usando la tintura de unión proteínica Sulforamida B (SRB), que sirve para medir la viabilidad y crecimiento celular (Monks *et al.* 1991)

En este protocolo se mantienen las líneas celulares en cultivo durante 24 h a una temperatura de 37 °C y 95% de humedad. Posteriormente se transfieren 100 µl de células en suspensión por pozo a 96 placas de microtitulación para permitir adhesión celular. 48 h después se lleva a cabo la fijación celular *in situ* a través de un lavado con ácido tricloroacético (TCA) durante 60 min a 4 °C. Posteriormente se lava con agua y se deja secar durante 24 h, para después teñir con la sulforamida B durante 30 minutos. Se hacen 4 lavados consecutivos con ácido acético al 1% y se dejan secar 24 h, para posteriormente solubilizar las células con TRIS (hidroximetil-aminoetano) y leer la densidad óptica en un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 515 nm.

Las líneas celulares utilizadas de cáncer fueron: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU-1= pulmón.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 .Determinación de la presencia de grupos de metabolitos secundarios.

En los resultados acerca de la determinación de grupos de metabolitos secundarios mostrados en el (Cuadro 5), se observó la presencia de terpenos-esteroides en los extractos hexánicos y de acetato de etilo de los tres órganos de la planta, resultados similares se encontraron en relación a la presencia de flavonoides, los cuales se detectaron en los extractos de acetato de etilo, (excepto tallo).

En relación a la presencia de alcaloides este grupo se detectó ligeramente positivo en el extracto metanólico de tallo.

La presencia de glucósidos fue detectada en los extractos metanólicos de tallo y hoja, resultando negativa la prueba en el extracto metanólico de fruto y en los extractos hexánicos y de acetato de etilo.

Tomando en cuenta el hábito de esta especie y su importancia ecológica, es importante considerar el papel que los compuestos detectados (terpenoides, flavonoides, alcaloides y glucósidos) pudieran estar jugando desde el punto de vista fisiológico de la planta.

Se sabe que los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y algunos de ellos son sintetizados en las plantas junto con otras estructuras como mecanismos de defensa que sirven como protección química contra herbívoros, microbios y hongos. También son de importancia ecológica ya que algunos son sintetizados como atrayentes para la polinización, para el establecimiento de la simbiosis con otros organismos. Inclusive

son sintetizados en situaciones de estrés abiótico como son: la competencia por el espacio del suelo, la luz y nutrientes (Croteau *et al.* 2000).

Por otro lado es fundamental reflexionar que la no detección de un determinado grupo de metabolitos en estas pruebas, no implica necesariamente su ausencia, por lo que el papel que juega el estado de desarrollo del órgano estudiado es significativo.

Cuadro 5. Resultados de la prueba de detección de metabolitos secundarios.

Nota: Los signos + indican la intensidad de la reacción, representado del siguiente modo: +ligeramente positivo, ++ medianamente positivo, +++ fuertemente positivo.- Ausencia de reacción.

	<i>Struthanthus interruptus</i>								
	Tallo			Hoja			Fruto		
	He	AcoEt	Me	He	AcoEt	Me	He	AcoEt	Me
Terpenos	++++	+++	-	++++	+++	-	+++	+++	-
Flavonoides	-	++	-	-	+++	++++	-	++++	+++
Alcaloides	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Glucósidos	-	-	++++	-	-	+++	-	-	-

6.2 Análisis por Cromatografía en Placa Fina.

Los resultados acerca del perfil cromatográfico de los extractos hexánicos y de acetato de etilo se muestran en la (Figura 3) una semejanza en el patrón de compuestos detectados de tipo terpénico en los distintos órganos de la planta. Sin embargo se puede observar diferencias en la intensidad de las manchas en cada uno de los extractos. Los extractos de fruto presentan una mayor intensidad en las manchas.

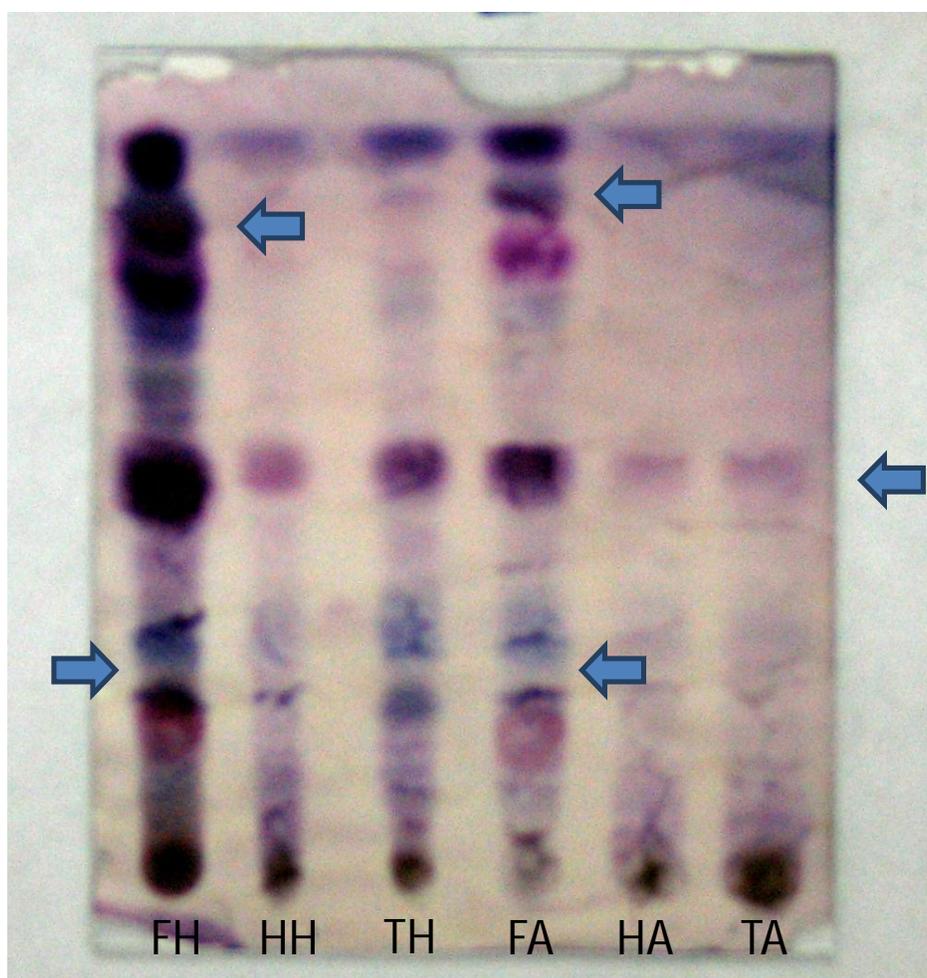


Figura 3. CCF con muestras de los extractos de Hexano y Acetato de etilo de los órganos fruto, hoja y tallo. Eluyente Hexano-Acetato de etilo 8:2; revelador anisaldehído. Colores en tonos violáceos se consideran positivos para presencia de terpenoides.

Los resultados mostrados en la Figura 4 del perfil cromatográfico de los extractos metanólicos, mostraron similitudes en el patrón de flavonoides entre los tres órganos, esto se observó una vez revelada la placa con el Revelador de Productos Naturales-RPN, sin embargo, se detectó una diferencia en la intensidad de las manchas.

Los resultados obtenidos de las pruebas de detección de metabolitos secundarios (Cuadro 5), muestran que en el extracto metanólico de hoja se detectó la presencia de glucósidos y flavonoides, lo cual coincide con la aparición del estándar de rutina en ese mismo extracto en el análisis de CCF.

Lo anterior puede ser atribuido, que al tratarse de diferentes órganos la concentración de dichos compuestos varié en cada uno, por lo cual es importante un estudio sistemático de dichos compuestos y un fraccionamiento posterior de los extractos.

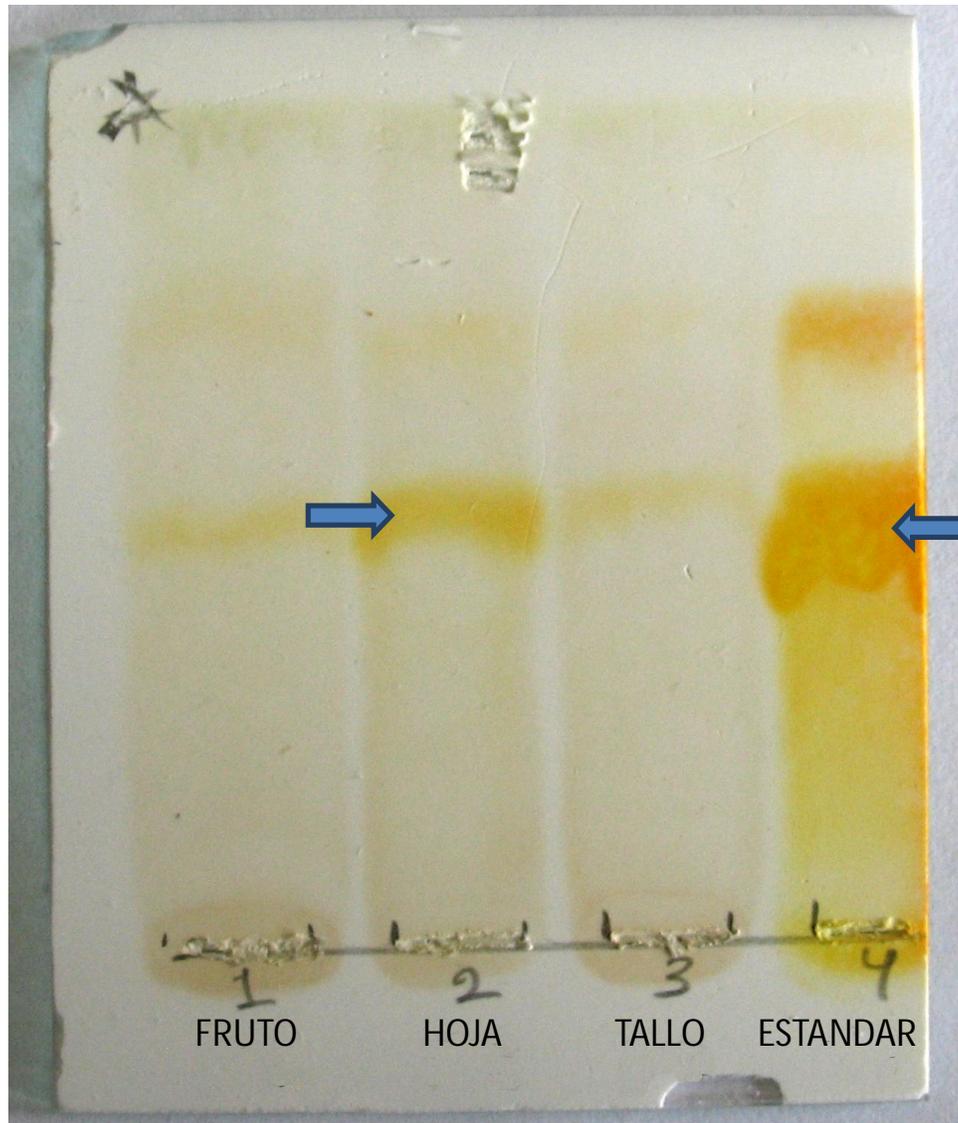


Figura 4. CCF con las muestras de extractos metanólicos de fruto, hoja y tallo, anexando un estándar de rutina. Se eluyó con fase móvil de Acetato de etilo-Ácido fórmico-Ácido acético glacial-Agua en el siguiente orden: 12.5, 1.3, 1.3, 2.5. La placa fue revelada con el reactivo RPN para identificar flavonoides y fijada con Polietilenglicol. Colores en tonos amarillos-naranjas se consideran positivos para presencia de flavonoides.

6.3 Bioensayo de toxicidad con *Artemia salina*.

Extractos de fruto

Para los extractos de fruto la mayor actividad se detectó en el extracto hexánico a una concentración de 1000 ppm con un porcentaje de 100% de mortandad.

Los extractos de acetato de etilo y metanol tuvieron una baja actividad citotóxica, ya que se registró más del 50% de supervivencia. (Figura 5).

En el extracto hexánico se detectó la presencia de terpenoides (Cuadro 5), y en el análisis de CCF fue el extracto con mayor intensidad en las manchas (Figura 3), lo cual permite sugerir que posiblemente la presencia de terpenoides le confiere propiedades citotóxicas frente a *Artemia salina*.

En los extractos de acetato de etilo y metanol el porcentaje de mortandad fue menor al 50%. En estos extractos se detectó la presencia de flavonoides y terpenoides (cuadro 5), aparentemente la presencia conjunta de estos grupos de metabolitos afecta de manera negativa la actividad citotóxica de extracto.

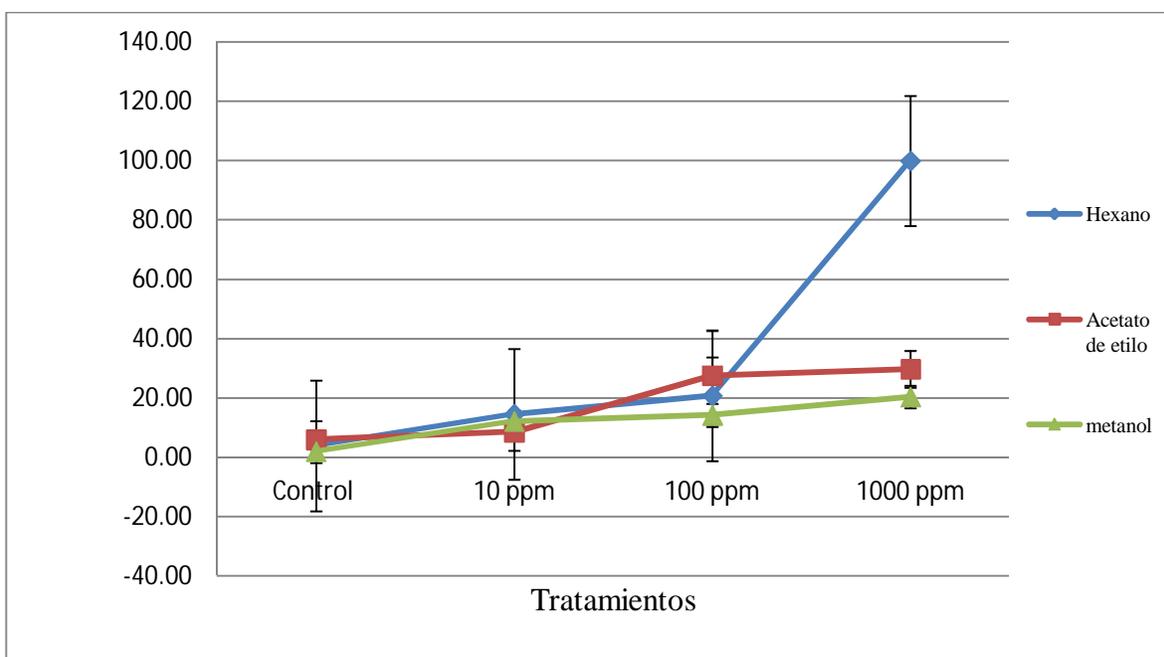


Figura 5. Se muestra gráfico de porcentaje de mortandad de *Artemia salina* en bioensayo de citotoxicidad con extractos de fruto a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm.

Extractos de hoja

Para los extractos de hoja la mayor actividad se detectó con el extracto de acetato de etilo a una concentración de 1000 ppm con un porcentaje de mortandad del 100%. Seguido del extracto metanólico con un 98% de mortandad, y 94% para el extracto hexánico (Figura 6).

Es posible sugerir que la actividad citotóxica de los extractos de hoja se deba principalmente a la presencia de flavonoides, ya que fue el grupo de metabolitos que se detectó en el análisis de CCF en el extracto metanólico (Figura 4) y en el extracto de acetato de etilo se detectaron por el ensayo colorimétrico (Cuadro 5). El extracto hexánico registro menor actividad y en este no se detectó la presencia de flavonoides únicamente de terpenoides (Cuadro 5), además de que en el análisis de CCF, la intensidad de las manchas con el revelador anisaldehído fue mucho menor a la detectada en los extractos de fruto, lo cual podría explicar la variación de actividad entre estos dos extractos.

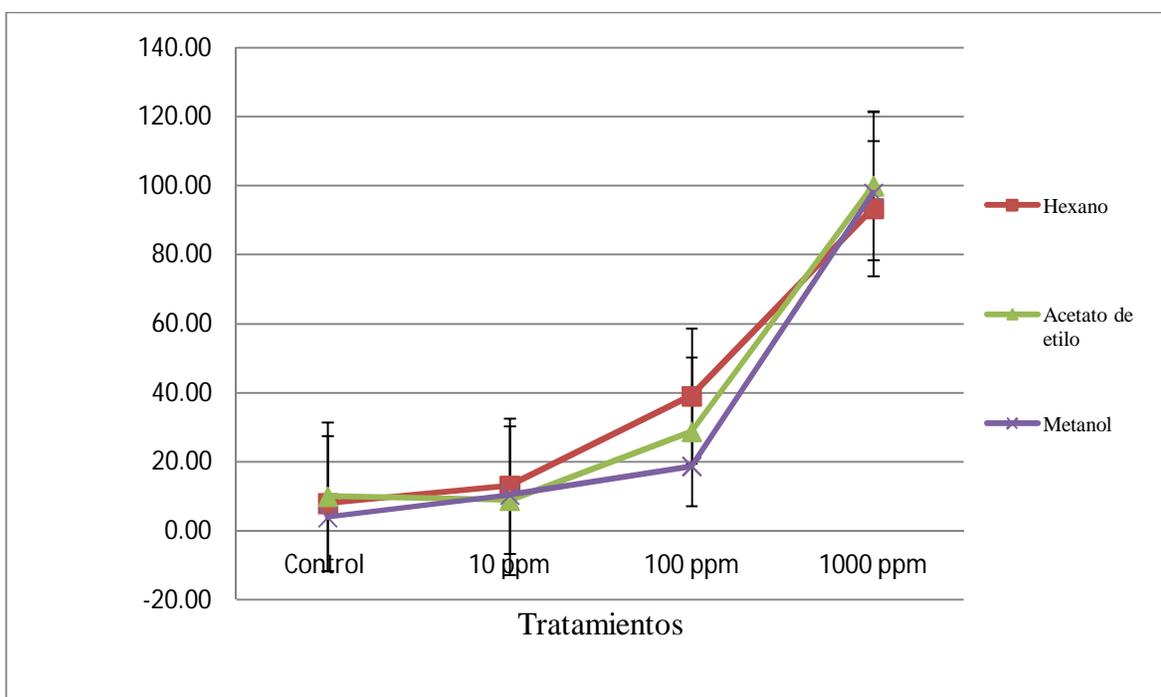


Figura 6. Se muestra gráfico de porcentaje de mortandad de *Artemia salina* en bioensayo de citotoxicidad con extractos de hoja a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm.

Extractos de tallo

Para los extractos de tallo la mayor actividad se detectó con el extracto de hexánico a una concentración de 1000 ppm con un porcentaje de mortandad del 100%, seguido del extracto de acetato de etilo con un 98% de mortandad, y el extracto metanólico con 53.19% de mortandad.

Los resultados obtenidos de las pruebas de detección de metabolitos secundarios (Cuadro 5) mostraron que los extractos de tallo tienen una composición diferente entre sí. En el extracto hexánico se detectaron terpenoides, mientras que para el extracto de acetato de etilo que fue el segundo extracto más activo en el bioensayo se detectaron terpenoides y flavonoides, finalmente en el extracto metanólico se detectó la presencia de glucósidos y alcaloides, estos resultados permiten sugerir que en el órgano tallo el grupo de metabolitos secundarios que podría estar dando mayor actividad son los terpenoides, ya que fue el

metabolito detectado en común entre los extractos hexánicos y de acetato de etilo, mientras que en el extracto metanólico que fue el menos activo, probablemente los metabolitos detectados tienen menor actividad debido a una interacción sinérgica negativa entre ambos. El análisis en CCF (figura 3), muestra que el extracto hexánico tiene tonalidades más intensas en las manchas, mientras que el extracto de acetato de etilo es menos intenso en tonalidad. Esto puede sugerir que la concentración de terpenoides es mayor en el extracto hexánico, lo que permite aludir que esa diferencia de concentración le confiere mayor actividad citotóxica que el extracto de acetato de etilo.

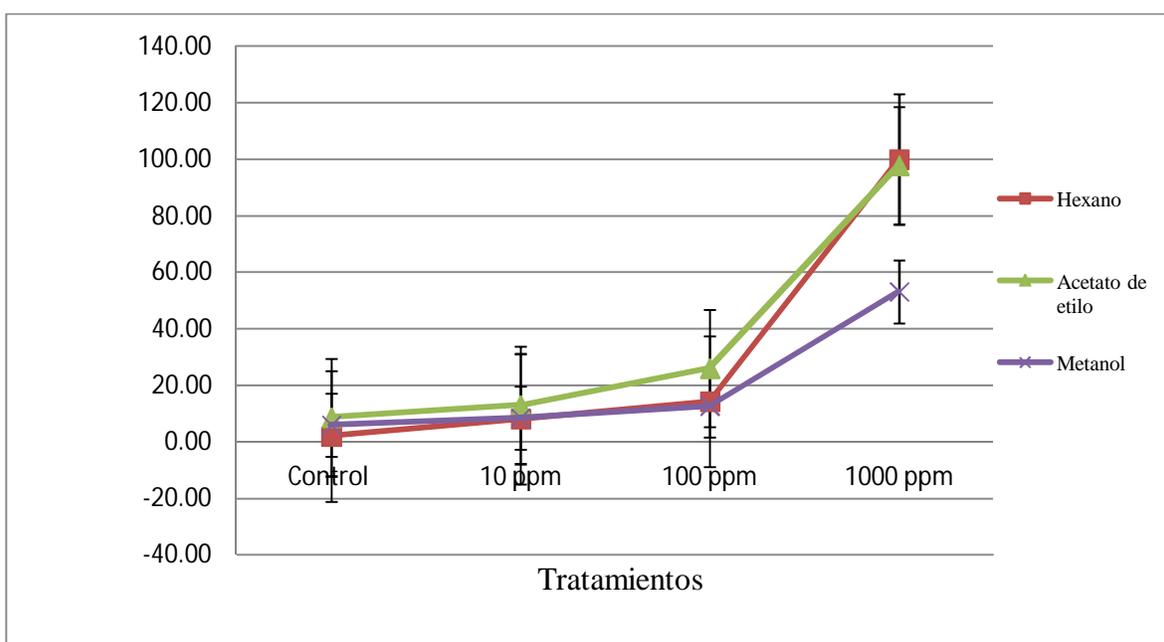


Figura 7. Se muestra gráfico de porcentaje de mortalidad para *Artemia salina* a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm en extractos de tallo obtenidos a partir de *Struthanthus interruptus* con disolventes de polaridad creciente.

Los resultados acerca de este ensayo nos indican que excepto el fruto, las partes aéreas de la especie presentan potencial actividad citotóxica.

6.4 Bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano.

Los resultados mostrados en el (Cuadro 6) indican que la mayoría de los extractos, presentan un efecto de citotoxicidad en todas las líneas celulares superior al 50% de inhibición. La actividad encontrada debe ser considerada en el contexto de los metabolitos secundarios detectados en los extractos de los diferentes órganos. Si bien existen reportes (Romero, 2002., Jidong, 2007., Marcarrini, 2010) acerca de estos metabolitos con acción citotóxica, es importante considerar un estudio sistemático y biodirigido para estos extractos.

Las diferencias observadas en los porcentajes de inhibición en las diferentes líneas celulares pueden ser debidas entre otros aspectos a la sensibilidad que presentan los diferentes líneas celulares, así como a las dosis o concentraciones utilizadas para dichas pruebas, al tipo de extracto y a los compuestos presentes en estos, aspectos que son importantes para la búsqueda de compuestos biológicamente activos.

Al comparar los resultados mostrados en el bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer (Cuadro 6) con los resultados obtenidos en el bioensayo de citotoxicidad con *Artemia salina* (Figura 5-7), se puede observar que el extracto hexánico de tallo fue el más tóxico en líneas celulares de carcinoma humano, y fue uno de los extractos más activos en el bioensayo con *Artemia salina*, siendo por lo tanto un resultado consistente para ambas pruebas, lo cual demuestra la utilidad del bioensayo de *Artemia salina* como bioensayo preliminar en la búsqueda de compuestos de origen natural con potencial citotóxico.

El segundo extracto más activo fue el de hoja de acetato de etilo, en este extracto se detectó la presencia de terpenoides y flavonoides (Cuadro 5). La presencia de terpenoides se

detectó también en el análisis de cromatografía en capa fina (Figura 3), donde se observó que tanto los extractos hexánicos como de acetato de etilo, tienen una composición similar de manchas, variando únicamente la intensidad.

Al mismo tiempo es posible sugerir que a pesar de tener una composición química similar en la presencia de grupos de metabolitos secundarios (Cuadro 5), la actividad citotóxica mostrada para cada órgano es diferente, ya que a pesar de haberse detectado los mismos grupos de metabolitos entre el extracto hexánico de tallo y fruto, la actividad citotóxica mostrada es ligeramente diferente, probablemente esa diferencia es más apreciable en el análisis de CCF (Figura 3), en donde se puede observar que entre el extracto hexánico de tallo y fruto, existe una ligera diferencia en el arreglo espacial de las manchas, pero principalmente en la intensidad de las mismas, siendo más intensas para el extracto hexánico de fruto y menos intensas en el extracto hexánico de tallo.

Los extractos metanólicos representaron los menos activos en el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (Figura 5-7) y en líneas celulares de cáncer (Cuadro 6). Cabe destacar que el extracto metanólico de hoja fue el más activo de los extractos metanólicos, lo que coincide con la presencia de flavonoides y terpenoides detectados en las pruebas de detección de metabolitos secundarios (Cuadro 5), y así mismo en el análisis por cromatografía en capa fina para la detección de flavonoides al revelar con RPN(Figura 4).

Se utilizó un estándar de rutina en los extractos metanólicos (Figura 4), se sabe que la rutina tiene actividad antioxidante, citotóxica, vasodilatadora, antiinflamatoria e inmunoestimulante (Pathak, 1999), por lo cual podría sugerirse que este flavonoide en sinergia con otros componentes en el extracto podría estar confiriéndole su actividad citotóxica en las líneas celulares de carcinoma humano.

Los resultados muestran un patrón de comportamiento en los porcentajes de inhibición de crecimiento con todos los extractos, siendo aparentemente los extractos activos poco específicos en la inhibición de las líneas celulares de cáncer. Se puede notar que tres líneas celulares de carcinoma humano son especialmente susceptibles a los extractos de *Struthanthus interruptus*. Las líneas celulares susceptibles son: cáncer de próstata, cáncer de colon y de pulmón, ya que fue en estas líneas donde se registraron porcentajes del 100% de inhibición de crecimiento celular con la mayoría de los extractos.

Cuadro 6. Se muestran los resultados del bioensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer, donde se representan los porcentajes de inhibición de crecimiento celular para los extractos obtenidos a partir de la planta *Struthanthus interruptus*.

Muestra	Glía de Sistema nervioso central	Cáncer de próstata	Leucemia	Cáncer de colon	Cáncer de seno	Cáncer de pulmón
Extracto hexánico hoja	SA	26.5	35.5	SA	18.4	37.9
Extracto hexánico de tallo	93.6	100	100	94.6	88.3	100
Extracto hexánico de fruto	70.5	100	100	71.4	72.5	100
Extracto acetato de etilo hoja	82.7	100	100	83.8	73.9	100
Extracto acetato de etilo tallo	62.1	70.2	100	62.9	50	100
Extracto acetato de etilo fruto	62.8	44.5	87.5	63.5	31.8	94
Extracto metanol hoja	63.4	74.3	100	64.3	53.7	100
Extracto metanol de tallo	16.6	3.5	41.3	16.6	2.7	44.5
Extracto metanol de fruto	47.4	32.3	26	47.8	23.7	28.2

VII. Conclusiones

- Se detecto la presencia de terpenoides en los extractos hexánicos y de acetato de etilo a través del análisis de CCF. La intensidad de las manchas fue mayor en los extractos hexánicos.
- Se detecto la presencia de rutina (glucósido del flavonoide quercetina) en el extracto metanólico de hoja a través del análisis de CCF al revelar con RPN. Este resultado es coincidente con los obtenidos en la prueba de detección de metabolitos secundarios, donde se determino la presencia de glucósidos.
- Las pruebas de presencia de metabolitos secundarios y el análisis de CCF mostraron que los extractos hexánicos y de acetato de etilo tienen una composición química similar, sin embargo su actividad biológica en los bioensayos de citotoxicidad fue muy diferente (extractos hexánicos de tallo y hoja) y (extractos de acetato de etilo).
- Los extractos metanólicos de *Struthanthus interruptus* de tallo y fruto mostraron una composición química diferente a la detectada en los extractos hexánicos y de acetato de etilo. También mostraron una menor actividad citotóxica.
- Los extractos obtenidos mostraron actividad citotóxica relevante en líneas celulares de carcinoma humano, ya que seis de los nueve extractos generaron porcentajes de inhibición por encima del 50%, por lo que *Struthanthus interruptus* es una planta con potencial uso medicinal en contra del cáncer.

VIII. Referencias Bibliográficas

- Alonso, J. 2004. **Tratado de fitofármacos y Nutraceuticos**. Editorial Corpus libros., Rosario, Argentina. pp. 789-794.
- Alvares, C., Orallo, C. 2003. **Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer**. Revista de la Oficina de Farmacia 22 (10):130-140.
- Barlow, B.A. 1983. **Biogeography of Loranthaceae and Viscaceae**. The biology of mistletoes. Australia: Academic Press: pp. 19–46.
- Brooker, S., Cambie, R., Cooper, R. 1981. **New Zealand medicinal plants**. Auckland, Heinemann Publishers. pp 169-181.
- Büssing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfüller, U., y Schweizer, K. 1996. **Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* is mediated by the mistletoe lectins**. Cancer Letters 109:33-38.
- Büssing, A. 2000. **Mistletoe. The Genus *Viscum*** Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 438pp.
- Büssing, A. 2008. **Mistletoe extracts from an anthroposophical point of view in Complementary Oncology**. Adjunctive Methods in the Treatment of Cancer: Beuth, J., Moss R. Stuttgart: Thieme Verlag: 197-2006.
- Cabrera, D., De La Rosa, B., Kuri, P. 2008. **Cáncer de mama en México: perfil epidemiológico a partir de los sistemas de información y vigilancia epidemiológica, 1998-2006**. Gaceta Mexicana de Oncología 7(5) 161-168.
- Calder, M., Bernhardt, P. 1983. **The biology of mistletoes**. Australia: Academic Press. 348pp.
- Calderón, G y Rzedowski, J. 1990. **Flora fanerogámica del valle de México, Pátzcuaro, Michoacán, México**: Instituto de Ecología.
- Cerdá, P. y Fernández, T. 2005. ***Ligaria cuneifolia* flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells**. Immunobiology 209: 737–749.
- Cházaro, B y Oliva R. 1987. **Loranthaceas del centro de Veracruz y zona limítrofe de Puebla. I**. Cactaceas y Succulentas Mexicanas 32(3):55–60.
- Cházaro, B y Oliva R. 1988. **Loranthaceas del centro de Veracruz y zona limítrofe de Puebla. IV**. Cactaceas y Succulentas Mexicanas 33: 42–48.
- Cházaro B., Oliva R., Farías F. 2005. ***Cladocolea olingatha* (loranthaceae) un nuevo registro para Veracruz, México y datos generales sobre este táxon**. Polibotánica. 20:1-15.

Cook, C., Whichard, P., Wall, M. 1972. **Germination stimulants II. The structure of strigol-a potent seed germination stimulant for witchweed (Striga lútea Lour).** Journal American Chemical Society 94: 6198-6199.

Corréa, M. 1969. **Dicionário das plantas úteis do Brasil y das exóticas cultivadas, v.4. Rio de Janeiro,** Ministério da Agricultura, IBDF.

Cragg, G., Newman, D. 1999. **Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources.** Cáncer Investigation 17: 153–163 .

Croteau, R., Kutchan, T y Lewis, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). 1250-1318 pp. En Buchanan, B., Gruissen, W y Jones, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. USA, 1367 p.

Domínguez, S. 1973. **Métodos de investigación fitoquímica.** Limusa: México.

Ernst, E., Schmidt, K., Steuer, M. 2003. **Mistletoe for cancer? A systematic review of randomised clinical trials.** *International Journal of Cancer* 107:262-267.

Fang, N y Casida, J. 1998. **Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 3380–3384.

Fernández, T., Wagner, B., Varela, R., Ricco, S., Hajos, A. 1998. **"Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)."** Journal of Ethnopharmacology 62: 25- 34.

Filipov, A. 1994. **"Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco."** Journal of Ethnopharmacology 44: 181-193.

Frei, B., Heinrich, P., Bork, D., Herrmann, B. 1998. **"Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation."** Phytomedicine 5: 177-186.

Gabius, S., Joshi, S., Kayser, K., Gabius, H. 1992. **The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier.** International. Journal. Of Oncology 1: 705–708.

Gabius, H., Gabius, S., Joshi, S., Koch, B., Schroeder, M. 1994. **From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: will there be a reason for oncological application of mistletoe?** Planta Medica 60: 2–7.

García, X., Magos, G., Marte. 2006. **Biphasic Actions of Aqueous Extract from *Struanthus Venetus*, on Guinea Pig Aortic Rings** Proceedings of the Western Pharmacology Society 49: 55-57.

Gerson, R., Serrano, A., Villalobos, A. 2006. **Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer.** Clinical and Translational Oncology 8: 200-207.

- Gordaliza, M. 2007. **Natural products as leads to anticancer drugs.** *Clinical and Translational Oncology*.9: 767–776.
- Govier, R. Harper, J. 1965. **Angiospermous hemiparasites.** *Nature* 205:722–723.
- Govier, R., Nelson, M., Pate, J. 1967. **Hemiparasitic nutrition in angiosperms. I. The transfer of organic compounds from host to *Odontites verna* (Bell.) Dum (Scrophulariaceae)** *New Phytologist* 66:285–297.
- Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J., Saller, R., 1997. **Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity.** *Anticancer Drugs*. 8: S43–S46.
- Hawksworth, F. 1983. **Mistletoes as forest parasites.** En: Calder, M.; Bernhardt, P. (Ed), **The biology of mistletoes.** Australia. Academic Press: 317–333.
- Horneber, M., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K., Rostock, M. 2008. **Mistletoe therapy in oncology.** *Cochrane Database Systematic Review*. CD003297.
- Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J. 1996–97. **A natural immunityactivating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes.** *Nature Immunology* 15: 295–311.
- Jidong, S.2007. **D-Limolene: Safety and Clinical Applications.** *Alternative Medicine Review*12(3):259-264.
- Johansson, S., Gullbo, J., Lindholm, P., Ek, B., Thunberg, E., Samuelsson, G., Larsson, R., Bohlin, L., Claeson, P. 2003. **Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 165–175.
- Khwaja, T., Varven, J., Pentecost, S., Pande, H. 1979. **Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album*, coloratum.** *Journal of Cellular and Molecular Life Sciences* 36 (5): 599-600.
- Kienle, G., Kiene, H., 2003. **Die Mistel in der Onkologie.** Fakten und konzeptionelle Grundlagen Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Kienle, G., Berrino, F., Bussing, A., Portalupi, E., Rosenzweig, S., Kiene, H. 2003. **Mistletoe in cancer a systematic review on controlled clinical trials.** *European Journal of Medical Research* 8:109-119.
- Kienle, G., Kiene, H. 2007. **Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts.** *European Journal of Medical Research* 12:103-119.
- Kleijnen, J., Knippschild, P. 1994. **Mistletoe treatment for cancer. Review of controlled trials in humans.** *Phytomedicine* 1:253-260.
- Kuijt, J. 1968. **Mutual affinities of Santalalean families.** *Brittonia*. 20(2):136–147.

- Kuijt, J. 1969. **The biology of parasitic flowering plants**. Berkeley: University of California Press. 246.
- Kuijt, J. 1975. **The identity of *Struthanthus haenkei* (*Spirostylis haenkei*) (Loranthaceae)**. Canadian Journal of Botany 53:249–255.
- Knutson, D. 1983. **Physiology of mistletoe parasitism and disease responses in the host**. En: Calder, M.; Bernhardt, P. (Ed), The biology of mistletoes. Australia. Academic Press: 295–316.
- Lautié, E., Quintero, R., Fliniaux, M., Villarreal, M., 2008. **Selection methodology with scoring system: application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans**. Journal of Ethnopharmacology 120: 402–412.
- Livingston, W., Brenner, M., Blanchette, R. 1984. **Altered concentrations of abscisic acid, indole-3-acetic acid and zeatin riboside associated with eastern dwarf mistletoe infections on black spruce**. In: Hawksworth, F., Scharpf, R., (eds). Biology of dwarf mistletoes. Proceedings of the Symposium. Fort Collins, Colorado. Gen Tech Rep RM-111. United States Department of Agriculture, Forest Service. 53–61.
- Lohézic, F., Bakhtiar, A., Bézin, C., Amoros, M., Boustie, J. 2002. **"Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants"** Fitoterapia 73: 400- 405.
- Mans, D., Rocha, A., Schwartsmann, G., 2000. **Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds**. The Oncologist Journal 5:185–198.
- Marte, L., Magos, G., García, G., Gijón, E. 2009. ***Struthanthus venetus* (injerto o matapalo) planta potencialmente útil en terapéutica cardiovascular**. Revista Digital Universitaria. 10 (9).
- Marcarini, J., Ferreira, M., Cabral R., Regina L., Hoffmann, C. 2010. **Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells**. Experimental and Toxicologic Pathology 63(5):459-65.
- Mohar, A., Frías, M., Suchil, L., Mora, T., Garza, J. 1997. **Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México**. Salud Pública 39(4):253-258.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R. 1991. **Feasibility of High-flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines**. Journal of the National Cancer Institute 83 (11): 757-766.
- Musselman, L. 1980. **The biology of *Striga*, *orobanche*, and other root-parasitic weeds**. Ann. Rev. Phytopath 18: 463-489.
- Nickrent, D. 2002. **Enciclopedia of life sciences, Introductory article**. John Wiley & Sons, USA. pp. 1-3.

- Pathak, D., Pathak, K., Singla, A. 1991. **Flavonoids as medicinal agents: recent advances**: *Fitoterapia* 57:371–89.
- Parker, C., Musselman, L., Polhill, R., Wilson, A. 1984. **Proceedings of the third international symposium on parasitic weeds, ICARDA/International Parasitic Seed Plant Research Group**, Aleppo, Syria. 7–9 May.
- Pennings, S., Callaway, R. 2002. **Parasitic plants: Parallels and contrasts with herbivores**. *Oecología* 131: 479–489.
- Portalupi, E. 1987. **Il vischio nella terapia dei tumori: valutazione critica dell'impiego dell'Iscador nella terapia antitumorale**. Arlesheim, Istituto Hiscia Ed, pp. 55–134.
- Rios, M., Salinas, D., Villarreal, M. 2001. "Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3, 4-seco-olean-18-ene-3, 28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*." *Planta Medica* 67: 443-446.
- Rios, M., Aguilar, G. 2004. "1H and 13C assignments of two new triterpenes from *Cladocolea grahami*." *Magnetic Resonance in Chemistry* 42:1066-1068.
- Rivas, T. (2009). Informe de actividades de la Asociación Mexicana de Arboricultura 2008. *Arbolama* No. 2.
- Romero, A., Paéz, A., Ferruelo, M., Luja, N., Berenguer, A. 2002. **Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells**. *British Journal of Urology International* 89:950–4.
- Sala, A., Carey, E., Callaway, R. 2001. **Dwarf mistletoe affects whole-tree water relations of Douglas-fir and western larch primarily through changes in leaf to sapwood ratios**. *Oecologia*. 126:42–52.
- Saklani, A., Kutty, S., 2008. **Plant-derived compounds in clinical trials**. *Drug Discovery Today* 13:161–171.
- Schultes, R., Raffauf, F., 1999. **The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia**. New York, Dioscorides Press. 346p.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A. 1990. **New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening**. *Journal of the National Cancer Institute* 82 (13).
- Suffness, M., Pezzuto, J. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Academic Press, London, 6:71–133 pp.
- Vázquez, C., Cibrián, T. 1996. **Guía para evaluar rodales infestados por muérdago enano *Arceuthobium* spp**. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, D. F. *Agenda Técnica* 1: 1-12.
- Waizel, J., Herrera, S., Alonso, C., Villarreal, O. 1994. **Estudios preliminares de la actividad citotóxica de muérdagos mexicanos *Cladocolea grahami*, *Phoradendron***

reichenbachianum y *Phoradendron galeotii* (Loranthaceae). Revista del Instituto Nacional de Cancerología 40: 133–137.

Wagner, M. 1993. Estudios Fitoquímicos Comparativos de los Flavonoides de Loranthaceae de la Flora Argentina. Relación con el Muérdago europeo. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant drug analysis: **A thin layer chromatography atlas**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 384 p.

Weber, H. 1981. **Untersuchungen an parasitischen Scrophulariaceen (Rhinanthoideen) in Kulture**. I. Keimung und Entwicklungsweise. Flora 171: 23-38

Wickramaratne, D., Mar, W., Chai, H., Castillo, J., Farnsworth, N., Soejarto, D., Cordell, G., Pezzuto, J., Kinghorn, A., 1995. **Cytotoxic constituents of *Bursera permollis***. Planta Medica 61:80–81.

Youngken, H. 1951. **Muérdago. Tratado de Farmacognosia**. México, Atlante.365-367.

ANEXOS

REVELADORES

Revelador Anisaldehído (Wagner y Bladt 1996)

Se prepara una solución con los siguientes componentes: Anisaldehído, ácido sulfurico y ácido acético glacial. Se mezclan con proporción: 10: 0.2: 0.1 ml. La placa se asperja y se calienta en la estufa por 5-10 minutos.

Reactivo Revelador de Productos Naturales/Polietilenglicol (RPN/PEG) (Wagner y Bladt, 1996).

Solución A. Se prepara una solución al 1% en metanol (10ml) de β -etil-amino-éster del ácido difenil borico (NP).

Solución B. Solución al 5% en metanol de polietilenglicol 4000 (8ml).

La placa se asperja primero con la solución A y posteriormente con la solución B.