



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN ANTITUMORAL Y TOXICOLÓGICA
DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Schinus molle* L. EN UN
MODELO MURINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BÍOLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL CALVO JIMÉNEZ



MÉXICO, D. F.

2013

El jurado designado por la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobó la tesis que presentó:

MIGUEL CALVO JIMENEZ

El día 23 de Agosto del 2012

Jurado:

PRESIDENTE **Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN** _____

VOCAL **DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO** _____

SECRETARIO **M. en C. ANGEL GARCIA SANCHEZ** _____

SUPLENTE **Q.F.B. PABLO JUAREZ DE LOS SANTOS** _____

SUPLENTE **DR. ARTURO VALLE MENDIOLA** _____

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI,
IMSS, EN LA UIM FARMACOLOGÍA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, 2do PISO, CORCE.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a mis tutores el Dr. Fernando Calzada Bermejo y al Dr. Arturo Valle Mendiola por la dirección de esta tesis, su dedicación, paciencia y esfuerzo para el éxito de este trabajo.

Q.F.B. Patricia Vidal Millán por sus comentarios, por esas horas de enseñanza que me brindo, por esos regaños y exigencias, por las sugerencias y por todo el apoyo. Gracias por creer en mí.

M. en C. Ángel García Sánchez por el tiempo que me otorgo para la realización de este trabajo, por los conocimientos que compartió hacia mi persona, por esos momentos que se tomaba para que me apurara, me esforzara con este trabajo y sobre todo por esa amistad que me otorgo.

Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos de igual forma por los conocimientos que dejo en mi, por los momentos gratos que me dejo durante ese periodo de enseñanza y por la revisión de esta tesis.

Agradezco al IMSS por el financiamiento de mi trabajo con titulo del protocolo: Evaluación citotóxica de plantas medicinales mexicanas como un parámetro para determinar su potencial como agentes antitumorales.

NUMERO DE REGISTRO COMITÉ LOCAL: R-2010-3603-12

NUMERO DE FINANCIAMIENTO FIS: FIS/IMSS/PROT/MD/11/1005

Al M.V.Z. Jaime Herrera, jefe del bioterio del CMN SXXI y al y M.V.Z. Enrique Formenti por habernos apoyado con los murinos de la cepa CD-1 que utilizamos durante el presente trabajo y por la atención tan amable que tuvieron ambos hacia mi persona.

Dr. Emiliano Tesoro Cruz por habernos proporcionado los murino de la cepa Nu-Nu, ya que sin este apoyo el trabajo no se hubiera llevado al nivel obtenido.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible la terminación de este trabajo de tesis y que no los mencione, gracias a todos.

DEDICATORIAS

A mis padres, Ofelia Guadalupe Jiménez Hernández y Esaú Calvo Rodríguez y a mi Padrino Jesús Tapia Puebla por el apoyo incondicional para alcanzar todas mis metas. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanos, a mi familia y a mis amigos porque estamos y seguiremos juntos.

INDICE

Lista de abreviaturas.....	ix
Lista de esquemas.....	xi
Lista de figuras.....	xi
Lista de graficas.....	xii
Lista de tablas.....	xii
Resumen.....	xiii
I INTRODUCCION.....	1
II ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACION.....	16
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
V OBJETIVO GENERAL.....	17
V.1 Objetivos particulares.....	17
VI HIPOTESIS.....	17
VII MATERIAL Y METODOS.....	18
VII.1 Preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L.....	18
VII.2 Análisis cromatográfico.....	19
VII.2.1 Cromatografía en capa fina.....	19
VII.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	19
VIII.3 Partición ácido base	20
VII.4 Identificación de flavonoides de la fracción butanólica-1.....	21

VII.5 Identificación de flavonoides de las fracciones butanólica 2 y AcOEt.....	21
VII. 6 Evaluación biológica.....	21
VII.6.1 Animales de laboratorio.....	21
VII. 6.2 Línea celular.....	21
VII. 6.3 Estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.....	22
VII 6.4 Determinación de efecto antitumoral en un modelo murino de los productos obtenidos de <i>Schinus molle</i>	22
VII. 7 Análisis Estadístico.....	23
VIII RESULTADOS.....	24
VIII. 1 Obtención de los productos del extracto EtOH de las hojas de la especie de <i>Schinus molle</i> L.....	24
VIII.2 Efecto antitumoral del extracto EtOH, de las fracciones obtenidas y de los principios activos rutina y quercetina.....	25
VIII.3. Estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.....	26
IX ANALISIS DE RESULTADOS	29
IX .1 Efecto antitumoral del extracto EtOH, de las fracciones obtenidas y de los principios activos rutina y quercetina.....	29
IX .2 Estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.....	30
X CONCLUSIONES.....	31
XI BIBLIOGRAFIA.....	32

Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
HCl-10%	Acido clorhidrico al 10%
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico concentrado
H ₂ SO ₄ -10%	Acido sulfúrico al 10%
H ₂ O	Agua
ATCC	American Type Culture Colletion
Na ₂ CO ₃ -10%	Bicarbonato de sódio al 10%
CHCl ₃	Cloroformo
<i>et al.</i> ,	Colaboradores
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DMSO	Dimetil sulfoxido
CO ₂	Dióxido de carbono
D.F.	Distrito Federal
LD ₅₀	Dosis letal 50
EtOH	Etanol
f-AcOEt	Fracción de acetato de etilo
f-AcR	Fraccion acuosa residual
f-BuOH-1	Fracción butanólica uno
f-BuOH-2	Fracción butanólica dos
f-CHCl ₃	Fracción clorofórmica
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Hora

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LH	Linfomas Hodgkin
LNH	Linfoma no Hodgkin
L	Litros
MeOH	Metanol
m	Metros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
μL	Microlitro
mg	Miligramos
mg/kg	Miligramos por cada kilogramo
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
OMS	Organización mundial de la salud
%	Por ciento
SNC	Sistema nervioso central
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
UV	Ultravioleta

Lista de esquemas

Esquema 1. Preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L.....	18
Esquema 2. Fraccionamiento ácido/base del extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L.....	20

Lista de figuras

Figura 1. Poblaciones que utilizan la medicina tradicional como cuidados sanitarios primarios y poblaciones que han utilizado la medicina tradicional al menos una vez.....	1
Figura 2. Estructura de compuestos de origen natural, sintético y semisintéticos utilizados en el tratamiento del cáncer.....	3
Figura 3. Fármacos antitumorales de origen natural usados en la terapéutica.....	7
Figura 4. Corte histológico de un linfoma Hodgkin, donde se observan las células Reed-Sternberg.....	8
Figura 5. Histología de un linfoma no Hodgkin.....	8
Figura 6. <i>Schinus molle</i> L. a: árbol; b: hojas; c: flor; d: frutos.....	10
Figura 7. Monoterpenos aislados en <i>Schinus molle</i> L.....	12
Figura 8. Sesquiterpenos aislados en <i>Schinus molle</i> L.....	13
Figura 9. Flavonoides aislados en <i>Schinus molle</i> L.....	15
Figura 10. Esterol aislado en <i>Schinus molle</i> L.....	15

Lista de graficas

Grafica 1. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones hembra CD-1.....	25
Grafica 2. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones macho CD-1.....	25
Grafica 3. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones (Nu-Nu) macho.....	26
Grafica 4. Porcentajes de inhibición de los extractos de <i>S. molle</i> en ratones machos y hembras de la cepa CD-1.....	26
Grafica 5. Porcentajes de inhibición de los extractos de <i>S. molle</i> en ratones machos de la cepa CD-1 y ratones machos Nu-Nu	27
Grafica 6. Promedio de los pesos de los órganos del estudio de toxicidad aguda en ratones hembra CD-1.....	27
Grafica 7. Promedio de los pesos de los órganos del estudio de toxicidad aguda en ratones machos CD-1.....	28

Lista de tablas

Tabla 1. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	19
--	----

Resumen

Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de la especie *Schinus molle* L. Como técnicas de fraccionamiento, separación e identificación se emplearon: la cromatografía en capa fina preparativa, la cromatografía líquida de alta resolución y un reparto ácido-base entre disolventes inmiscibles

Lo anterior permitió la detección de tres flavonoides que fueron identificados como quercetina, rutina y quercitrina. La identificación de estos compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina comparativa y mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando muestras de referencias disponibles en el laboratorio.

La evaluación de la actividad antitumoral se llevó a cabo empleando la línea celular U-937 en un modelo murino; los productos a evaluar se administraron a la dosis de 100mg/kg (extracto EtOH, quercetina, rutina, f-CHCl₃, f-AcOEt, f-BuOH-1 y f-BuOH-2). De los siete productos evaluados se observó que el efecto antitumoral varía entre géneros y cepas. En ratones machos de la cepa CD-1 el producto con mayor actividad fue la f-AcOEt, en ratones hembras de la cepa CD-1 el producto con mayor actividad fue la quercetina y en los ratones machos de la cepa Nu-Nu, el producto con mayor actividad fue el extracto EtOH. La evaluación de estas fracciones, principios activos y del extracto mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de los ganglios comparado con el blanco. Por lo cual se puede concluir que *S. molle* L. contiene sustancias que inhiben la proliferación del linfoma en el modelo murino causados por la línea celular U-937.

La actividad observada para el extracto EtOH, la f-AcOEt y la quercetina explica en parte el uso de *S. molle* en el tratamiento del cáncer.

El extracto EtOH a dosis de 100 mg/kg y 1000 mg/kg no mostró signos de toxicidad en los órganos analizados (corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas y bazo) en ratones machos y hembras de la cepa CD-1.

INTRODUCCIÓN

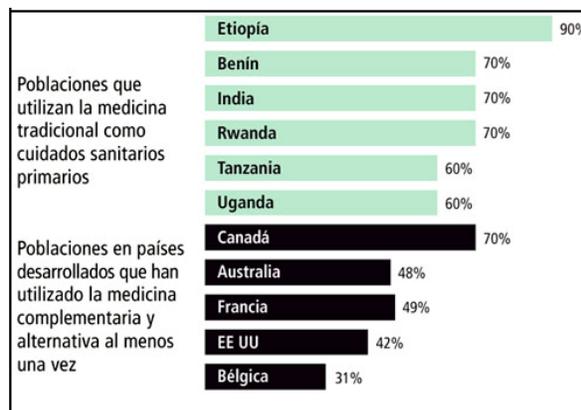
Desde tiempos remotos las plantas han sido empleadas para aliviar los males de la humanidad. El conocimiento empírico acerca de las plantas medicinales y sus efectos curativos se ha acumulado durante milenios y posteriormente pasó a ser parte integral de sistemas y tradiciones curativas de los pueblos, por ejemplo las medicinas Ayurveda en la India, la tradicional China y la Mexicana entre otras.

En décadas recientes la fitoterapia, ciencia que estudia el uso de las plantas con propósitos terapéuticos, experimentó un extraordinario resurgimiento, de tal forma que se conocen numerosos descubrimientos científicos que confirman el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y que están transformando la fitoterapia. Las investigaciones han dirigido al descubrimiento de aplicaciones insospechadas para muchas plantas y sustancias derivadas de estas.

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos en el mundo, es la suma de conocimientos, técnicas, prácticas y experiencias propias de diferentes culturas que se utilizan para mantener la salud, prevenir, diagnosticar y mejorar sus enfermedades.

Como se puede ver en la figura 1 países como Canadá, Australia, Francia, Estados Unidos y Bélgica hacen uso de sus productos obtenidos de los recursos naturales del mundo para el tratamiento de enfermedades. Hay otros países como Etiopía, Benin, India, Rwanda, Tanzania y Uganda entre otros, que usan la medicina tradicional en sus cuidados sanitarios primarios (OMS, 2006).

Figura 1. Poblaciones que utilizan la medicina tradicional en sus cuidados sanitarios primarios y poblaciones que han utilizado la medicina tradicional al menos una vez.



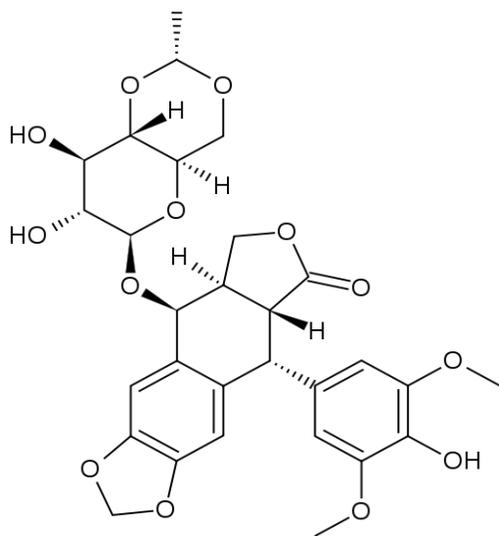
ANTECEDENTES

El cáncer engloba a una familia de enfermedades cuya característica principal es la alteración del control de la proliferación celular. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y aspecto, dando origen a una colonia de células diferentes que se reproducen rápidamente invadiendo y destruyendo los tejidos normales, estas enfermedades son una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Pérez, 2005). Existen muchos factores que pueden desencadenar los diferentes tipos de cáncer como fumar, sobrepeso, dieta baja en frutas y hortalizas, sedentarismo, consumo de alcohol, enfermedades de transmisión sexual, genéticos, radiación y exposición a ciertas sustancias químicas, entre otras. El gran número de factores de riesgo aumentan la posibilidad de padecer algún tipo de cáncer y si no es tratado a tiempo puede llegar a la muerte (Lybarger *et al.*, 1993).

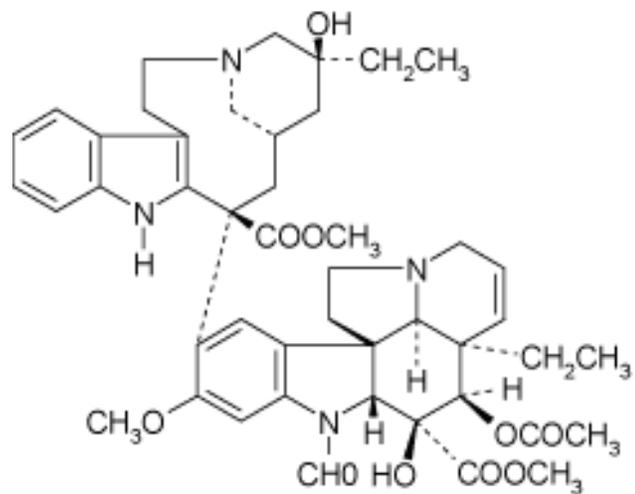
El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y la tercer causa de muerte en México con 70 240 personas por año (INEGI, 2010). Los tipos de cáncer que tiene mayor incidencia en México son en los hombres: el cáncer de próstata, pulmón e hígado y en las mujeres el cérvico-uterino, mama y pulmón. Por otra parte las leucemias y los linfomas son dos de las principales causas de muerte en niños siguiéndole los tumores del sistema nervioso central (Martínez, 2009).

Para el tratamiento del cáncer se tienen tres estrategias que incluyen la cirugía, la radiación y la quimioterapia. El tratamiento varía de acuerdo con el tipo de cáncer y la etapa de desarrollo. La etapa del cáncer se refiere al crecimiento y al hecho de si el tumor se ha diseminado o no desde su ubicación original (Dugdale, 2008).

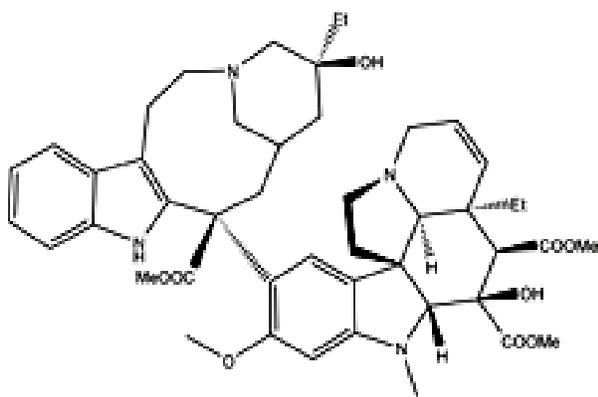
En la quimioterapia para tratar el cáncer se cuenta con varios fármacos los cuales incluyen al etoposido **1**, vincristina **2**, vinblastina **3**, dacarbazina **4**, metotrexato **5**, bleomicina **6**, doxorubicina **7**, ciclofosfamida **8**, dexametasona **9** y prednisona **10**, entre otros (Tenorio, 2006).



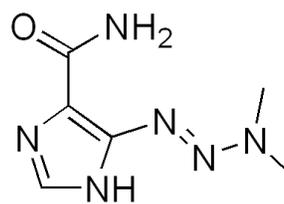
Etoposido 1 (semisintético)



Vincristina 2 (natural)

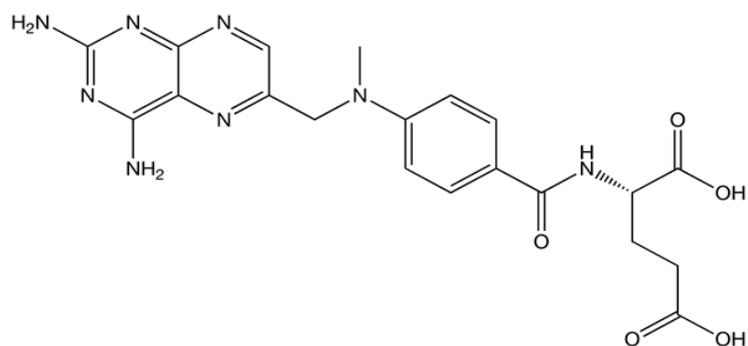


Vinblastina 3 (natural)

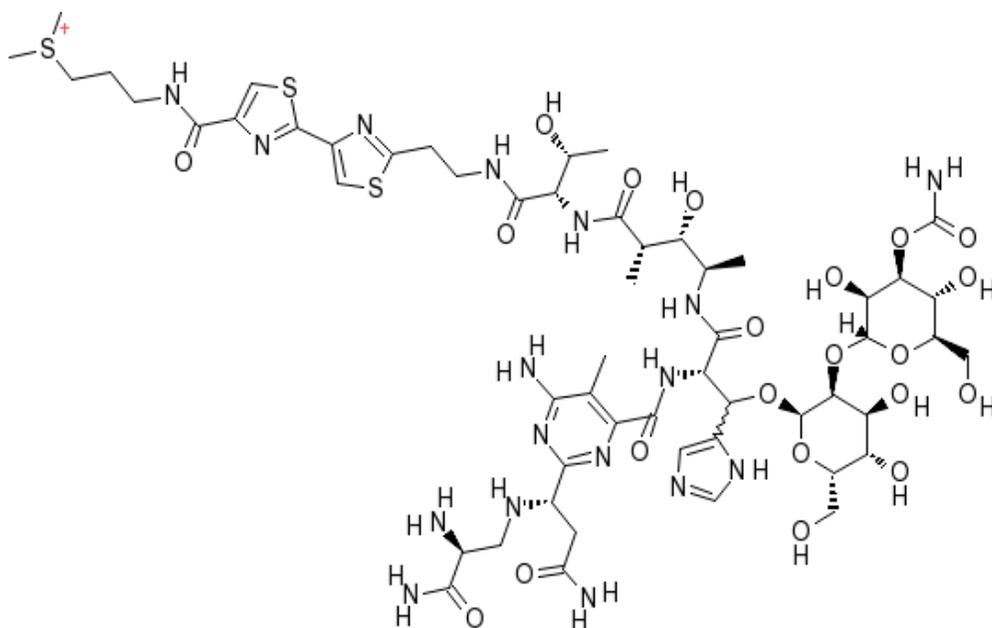


Dacarbazina 4 (sintético)

Figura 2. Estructura de compuestos de origen natural, sintético y semisintéticos utilizados en el tratamiento del cáncer.

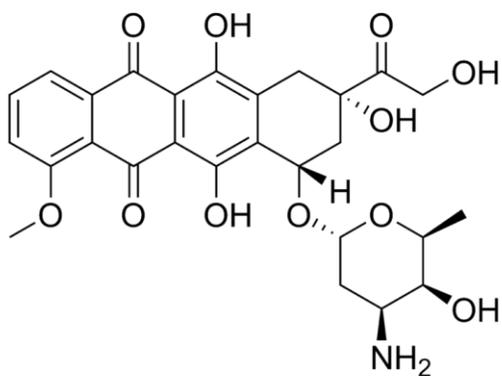


Metotrexato **5** (sintético)

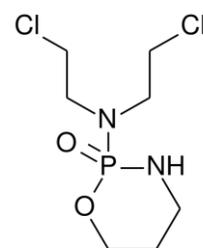


Bleomicina **6** (semisintético)

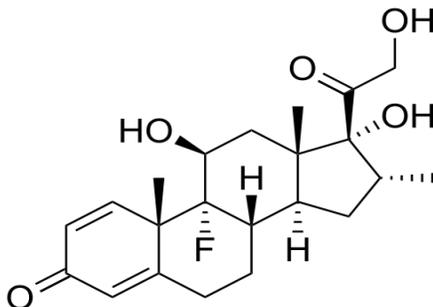
Figura 2. Estructura de compuestos de origen natural, sintético y semisintéticos utilizados en el tratamiento del cáncer (continuación).



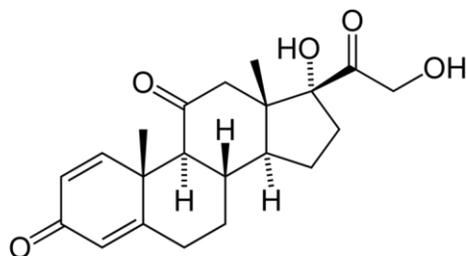
Doxorubicina **7** (natural)



Ciclofosfamida **8** (sintético)



Dexametasona **9** (sintético)



Prednisona **10** (sintético)

Figura 2. Estructura de compuestos de origen natural, sintético y semisintéticos utilizados en el tratamiento del cáncer (continuación).

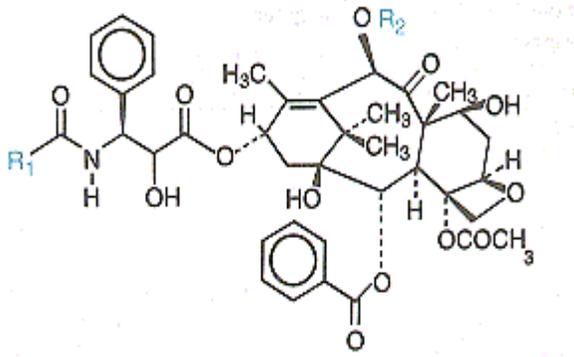
Además de los tratamientos ya mencionados, en la actualidad se están desarrollando otros como la inmunoterapia, el uso de anticuerpos monoclonales, el trasplante de células madre, terapia genética, y la terapia anti-angiogénesis (Tenorio, 2006).

Por otra parte en los últimos años se ha generado una intensa búsqueda de nuevos agentes antitumorales de diversas fuentes de origen, entre ellas la flora medicinal es una importante alternativa para el hallazgo de estos compuestos (Colom *et al.*, 2005).

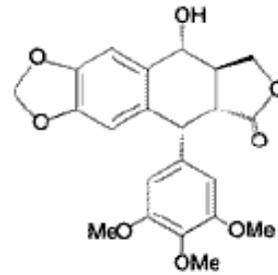
Los aportes a nivel mundial que ha hecho la herbolaria en cuanto a constituyentes antitumorales se refleja en los siguientes productos

- El taxol **11**, aislado de la corteza del “tejo del pacífico”, *Taxus brevifolia*, tiene actividad anticancerígena en un amplio rango de tumores. Es un alcaloide del tipo taxano, actualmente se vende con el nombre comercial de paclitaxel. Este fármaco antitumoral, se utiliza para el tratamiento del cáncer de ovarios, mama, pulmón y el sarcoma de Kaposi (OMS, 2002). El mecanismo de acción del taxol implica la unión de manera irreversible a la subunidad de la tubulina, favoreciendo la polimerización en microtúbulos. Es activo sobre tumores sólidos frecuentemente resistentes a otros fármacos. El efecto secundario que produce es leucopenia y neutropenia (Calvelo, 2011)
- La vincristina **2** y la vinblastina **3** son dos alcaloides obtenidos de *Catharanthus roseus*, la vindesina (Enison) y vinorelbina (Navelbine) son análogos semisintéticos. Los dos alcaloides interaccionan con la tubulina, proteína que forma los microtúbulos del huso acromático en la mitosis, mediante asociación específica con los dímeros proteicos impidiendo su polimerización para formar los microtúbulos; detienen la mitosis en metafase (Ávila, 2006; Calvelo, 2011)

- La podofilotoxina **12** es el principio activo obtenido de la planta *Podophyllum peltatum*, es inhibidor de metafase, en células de unión. Previene la unión de la polimerización de la tubulina requerida para el ensamble de los microtúbulos (PLM, 2005)



Taxol **11**



Podofilotoxina **12**

Figura 3. Fármacos antitumorales de origen natural usados en la terapéutica

Tomando en consideración que la prueba biológica empleada en esta investigación usa la línea celular U-937 responsable del linfoma no Hodgkin. A continuación se mencionan algunos aspectos sobre el Linfoma.

El linfoma es un cáncer del sistema linfático, que se presenta en órganos como el bazo, el timo y las amígdalas y vasos linfáticos, que ayudan a formar el sistema inmunológico. Los linfomas pueden agruparse en dos categorías: los linfomas Hodgkin (LH) y el linfoma no Hodgkin (LNH) (Tenorio, 2006; Grossman, 2004).

El linfoma de tipo Hodgkin se caracterizan por la presencia de células reticulares atípicas llamadas células de Reed-Sternberg (figura 4). Estas células son grandes, multinucleadas o tienen un núcleo celular bilobulado, dando la apariencia de los llamados *ojos de búho*, con nucleolos prominentes en forma de inclusiones, tienden a ser CD30 y CD15 positivas y usualmente CD20 y CD45 negativas.

La presencia de este tipo de células es esencial para el diagnóstico del linfoma de Hodgkin (Harrison, 2006).

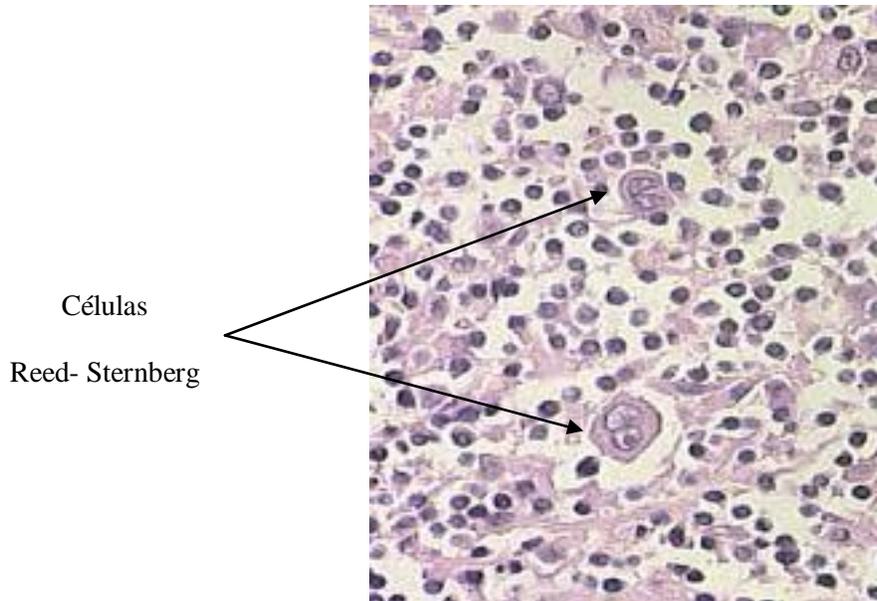


Figura 4. Corte histológico de un linfoma Hodgkin, donde se observan las células Reed-Sternberg.

En el LNH se manifiestan las células T o células B, estas células tienen núcleos de forma ovoide que ocupan la mayoría del espacio intracelular. Por morfología no se puede hacer la distinción de estas células, solamente realizando estudios inmunohistoquímicos, ya que la diferenciación se da por poseer un receptor especial en la superficie de la membrana, el receptor de linfocitos T es denominado TCR por *T cell receptor*. En la figura 5 se observan cortes histológicos de un LNH (Vassallo *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2011)

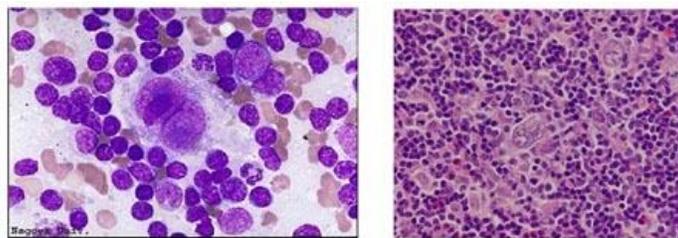


Figura 5. Histología de un linfoma no Hodgkin

Para el tratamiento de los linfomas se emplean metotrexato **5**, bleomicina **6**, doxorubicina **7**, ciclofosfamida **8**, dexametasona **9**, prednisona **10**, etoposido **11** y dacarbazina **12**. Es importante mencionar que aunque se cuenta con fármacos para el tratamiento de los linfomas se continua con la búsqueda de compuestos que sean mas selectivos, menos tóxicos y mas baratos (Tenorio, 2006).

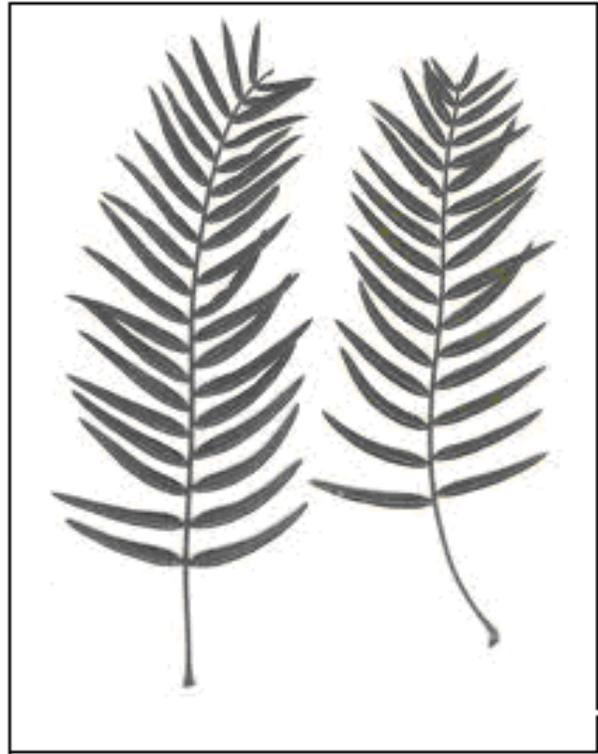
En México el uso de las plantas como agentes antitumorales es muy difundido, dentro de estas plantas puede citarse a: *Brugmansia arbórea* L, *Sida rhombifolia* L, *Datura stramonium* L, *Hamelia patens* Jacq, *Mirabilis jalapa* L (Aguilar *et al.* 1995), *Polygonum mexicanum* Small (Bueno *et al.*, 2005), *Annona purpurea* L, *Annona muricata* L (Croat,1998), *Gelsemium sempervirens* L (BDMTM, 2011), *Rollinia mucosa* Baillon, *Galphimia glauca* Cav (Florence *et al.*, 2011), *Plantago major* L, *Hippocratea excelsa* HBK, *Swietwnia humilis* Zucc, *Annona cherimola* Mill, *Lantana cámara* L, *Piper adencum* L, *Salvia leucantha* Cav, *Cuphea aequipetala* Cav, *Jatropha curcas* L, *Helianthella quinquenervis* A, *Phyllantus niruri* L, y *Waltheria americana* L, entre otras (Marquez *et al.*, 1999).

Otra de las plantas utilizadas en México como agente antitumoral es la especie vegetal de *Schinus molle* conocido popularmente como el árbol del Pirul. Investigaciones en Argentina demuestran que *Schinus molle* es una especie cuyo extracto metanólico de cortezas y hojas tiene efecto citotóxico frente a células Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano). El extracto de *S. molle* inhibió de forma dosis dependiente el crecimiento de las células tumorales, siendo la especie más potente ($CI_{50} = 50$ mg/mL) de entre 5 plantas estudiadas en Argentina (Ruffa *et al.*, 2002; Yuequin, 2007).

El árbol del pirul tiene 15m de altura aprox., siempre verde con ramas colgantes, aromático resinoso, con tronco grueso (Figura 6a). Las hojas tienen forma de plumitas (Figura 6b), las flores son pequeñas de color crema parecen encaje (Figura 6c), con los frutos globosos y de color rojo rosa (Figura 6d). El árbol crece en climas cálido, semicálido, semiseco y templado (BDMTM, 2011)



a



b



c



d

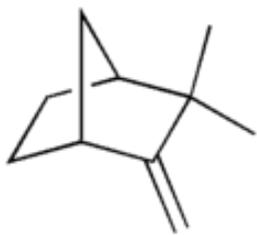
Figura 6. *Schinus molle* L. a: árbol; b: hojas; c: flor; d: frutos

La especie vegetal *Schinus molle* es conocida popularmente en la herbolaria nacional con el nombre de “Pirul”, además de su uso como antitumoral, se emplea en la medicina tradicional como cicatrizante, astringente, en afecciones diversas de la piel, como antiinflamatorio, antirreumáticos, para el tratamiento de tumores locales y verrugas (Duke, 1985; Ruffa *et al.*, 2002; Schmourlo *et al.*, 2005).

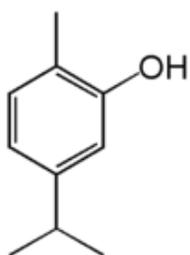
Se le puede encontrar a lo largo de toda la República Mexicana. Otros nombres como se le conoce a lo largo del mundo son el de “falso pimentero, pirú, Perú”. En lenguas indígenas de México, por ejemplo en otomí se le dice “xasa” y en náhuatl como “peloncuáhuil”, entre otros (Hanan *et al.*, 2009).

Investigaciones farmacológicas demuestran actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Un extracto acuoso preparado a partir de los frutos mostró actividad hipotensora en perros (BDMTM, 2011). El aceite esencial de esta planta, mostró toxicidad con una DL₅₀ de 5mg/kg en ratas, tanto por vía intragástrica, como por la vía intradérmica. Otros estudios toxicológicos realizados demostraron que el aceite esencial de esta planta, no muestra actividad irritante en ratón, puerco, conejo y en humanos adultos. Con frecuencia se indican casos de envenenamiento por comer los frutos que producen náusea, diarrea, gastroenteritis y dolor de cabeza (BDMTM, 2011)

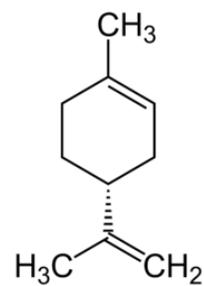
En cuanto a la fitoquímica del vegetal, se ha logrado el aislamiento de esteroides, terpenoides y flavonoides. En la figura 7 se ilustran los terpenoides, estos incluyen a los monoterpenos α -cadineno, canfeno **13**, carvacrol **14**, *p*-gimeno, butirato de geraniol, limoneno **15**, mirceno **16**, hexanoato de nerol, α y β -felandreno **17,18**, α y β -pineno **19, 20**, sabineno **21**, α y γ -terpineno **22, 23**, α -terpineol **24** y terpinoleno **25** (BDMTM, 2011).



Canfeno **13**



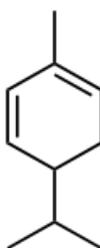
Carvacrol **14**



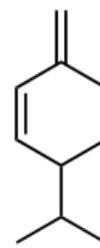
Limoneno **15**



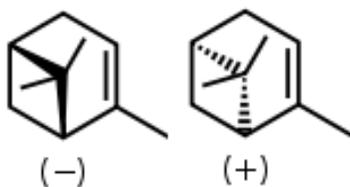
Mirceno **16**



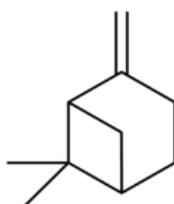
α -Felandreno **17**



β -Felandreno **18**



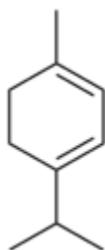
α -Pineno **19**



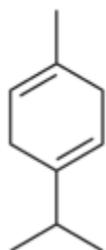
β -Pineno **20**



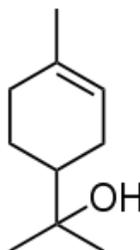
Sabineno **21**



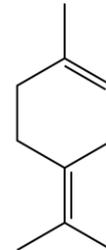
α -Terpineno **22**



β -Terpineno **23**



α Terpineol **24**



Terpinoleno **25**

Figura 7. Monoterpenos aislados en *Schinus molle* L

En la figura 8 se muestran los sesquiterpenos aislados: trans-N- α -bergamotene **26**, bouboneno, α , β , y δ -cadinol **27**, **28**, **29**, α y γ -calacoreno **30**, **31**, β -cariofileno **32**, α -copaeno**33**, α -cubeneno **34**, β y γ -endesmol , germacreno D **35**, β -guaieno **36**, α -gurjuneno **37**, α y γ -mouroleno **38**, **39** y β -espatuleno (BDMTM, 2011).

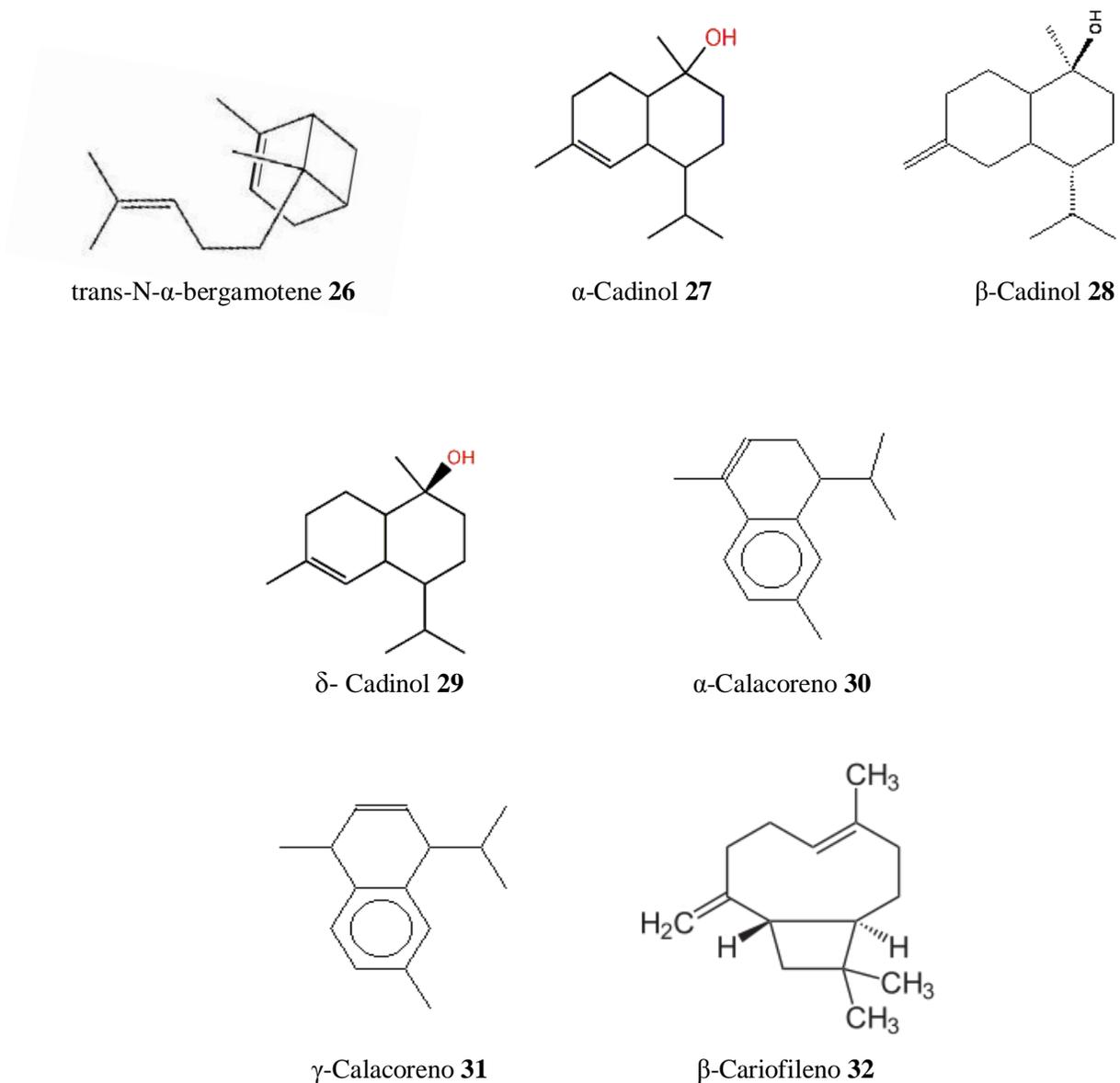
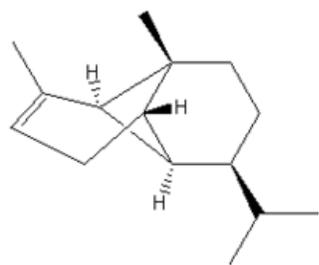
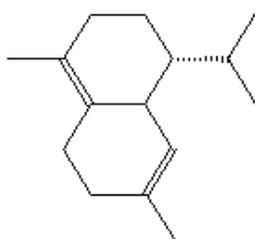


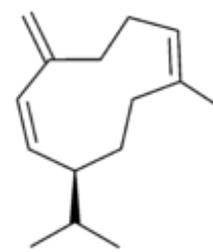
Figura 8. Sesquiterpenos aislados en *Schinus molle* L



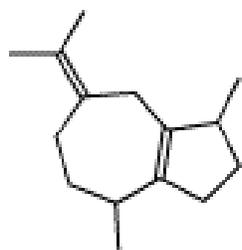
α -Copaeno **33**



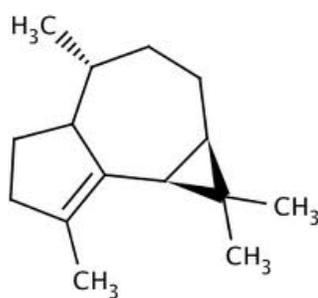
α -Cubeneno **34**



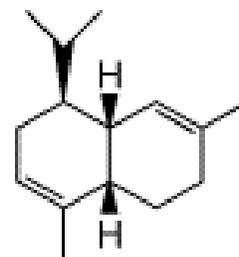
Germacreno D **35**



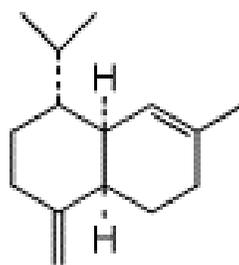
β -Guaieno **36**



α -Gurjuneno **37**



α -Mouroleno **38**



γ -Mouroleno **39**

Figura 8. Sesquiterpenos aislados en *Schinus molle* L (continuación).

En la figura 9 se muestran los flavonoides aislados que incluyen a la quercetina **40** y la rutina **41** (BDMTM, 2011).

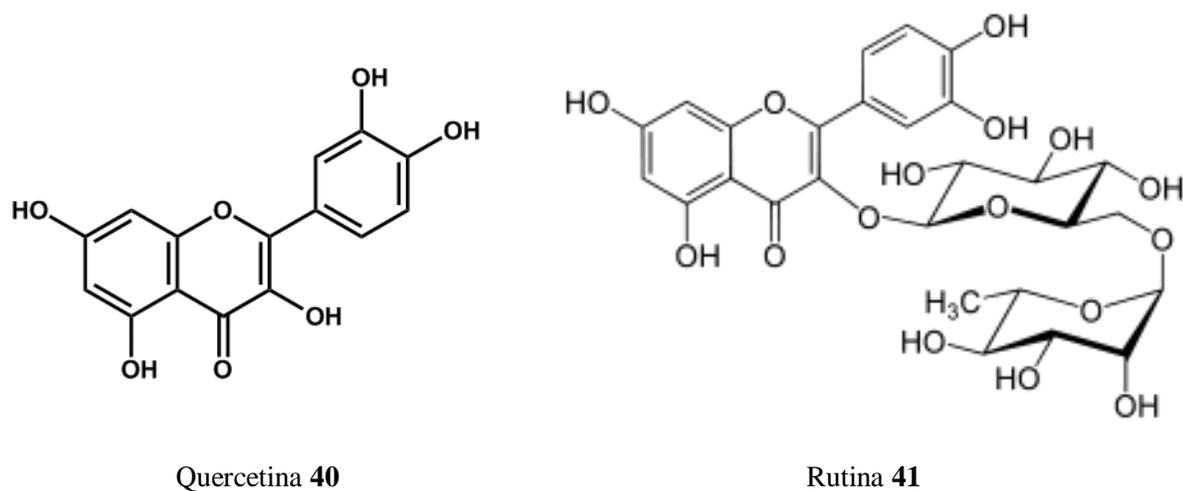


Figura 9. Flavonoides aislados en *Schinus molle* L

En la figura 10 se muestran el esteroil β -Sitosterol **42** (BDMTM, 2011).

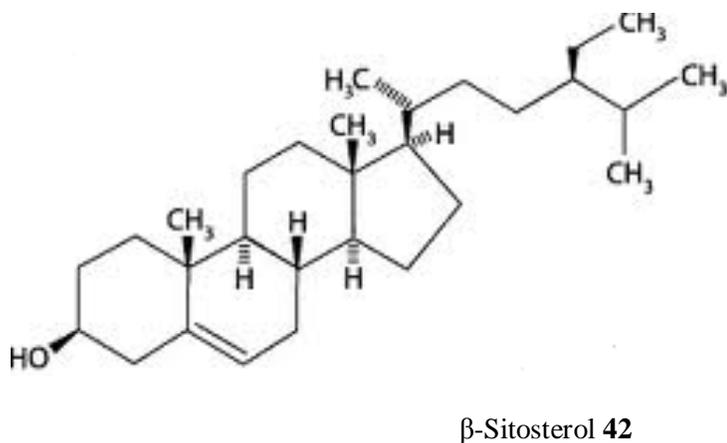


Figura 10. Esterol aislado en *Schinus molle* L (BDMTM, 2011).

III JUSTIFICACION

México es un país que posee una gran tradición en el uso de las plantas medicinales para tratar varias enfermedades entre las que se incluye el cáncer. Algunas de estas especies no han sido investigadas por lo que cualquier esfuerzo que se haga para investigar las plantas está justificado. Adicionalmente se tiene que considerar que el cáncer a nivel mundial es un problema. Los resultados obtenidos de esta investigación aportaran información al conocimiento en el desarrollo de alternativas para tratar el cáncer y de la flora medicinal nacional.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Schinus molle es una especie vegetal que ha demostrado actividad citotóxica contra la línea celular U-937 y las células Hep-G2. Sin embargo hasta la fecha, los productos obtenidos de muestras de hojas que se han colectado en México, no se conoce si tienen efecto contra Linfoma en modelos murino inducido por la línea celular U-937.

V OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antitumoral de los productos obtenidos del extracto etanólico de *Schinus molle* en un modelo murino.

V.1 OBJETIVOS PARTICULARES

V.1.1 Realizar el estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de *Schinus molle*.

V.1.2 Evaluar el efecto de los productos obtenidos de *S. molle* en el modelo de linfoma murino.

VI HIPOTESIS

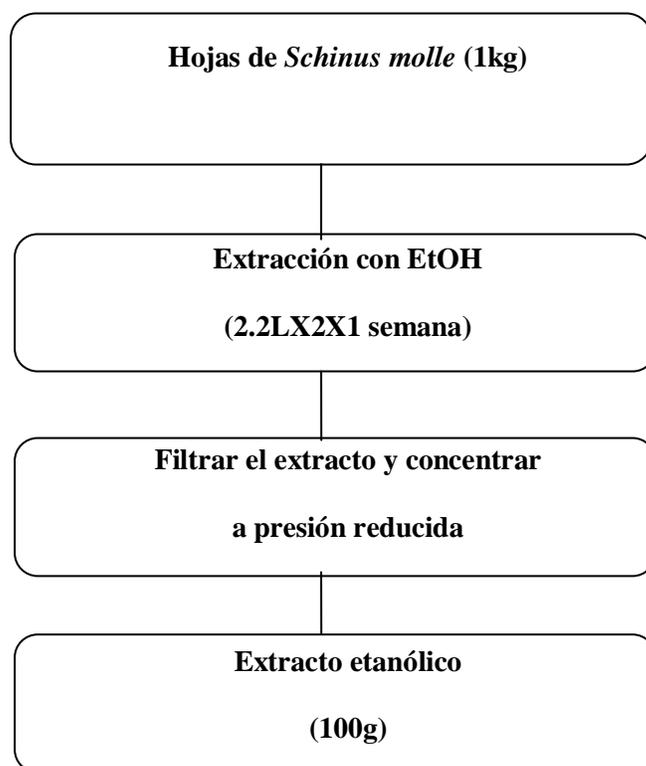
Schinus molle L. ha presentado propiedades citotóxicas contra la línea celular U-937, por lo que los productos obtenidos del extracto etanólico de las hojas inhibirán el linfoma inducido por la línea celular U-937 en ratones de la cepa CD-1 y en ratones desnudos (Nu-Nu).

VII MATERIAL Y METODOS

VII.1 Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L

El material vegetal, se colecto en la Colonia Santa Fe, Delegación Álvaro Obregón, D.F. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de IMSS (Voucher: 15670) y su identificación botánica fue llevada a cabo por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras.

Se recolectó 1kg de material vegetal (hojas) y se extrajo por maceración con 2.2 L de etanol durante una semana a temperatura ambiente por dos ocasiones. Pasada la semana, el extracto resultante se filtró y concentró en el rotavapor a presión reducida, a una temperatura de 40°C hasta peso constante, obteniendo 100 g de extracto de color verde.



Esquema 1. Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L.

VII.2 Análisis cromatográfico

VII.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF).

Para el análisis de las fracciones, extractos y compuestos puros, se realizó CCF. Se emplearon placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (Merck), el sistema de elución que se utilizó fue AcOEt-MeOH-H₂O (10:1.6:1.2).

Los agentes cromógenos que se emplearon se muestran en la tabla 1. Antes de llevar a cabo el revelado de las placas se visualizaron con luz UV con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58, a longitudes de onda de 254 y 365 nm

Agente cromógeno	Composición
Vainillina-H ₂ SO ₄	Ac. sulfúrico al 5% en etanol 10 ml Vainillina 1g
Fast blue (0.5% H ₂ O)	Fast blue 0.5g Agua 99.5 ml
Tricloruro de aluminio	Cloruro de aluminio 5g Agua 100ml
Tricloruro ferrico	Cloruro de hierro III 9.8g Agua 100 ml

Tabla 1. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

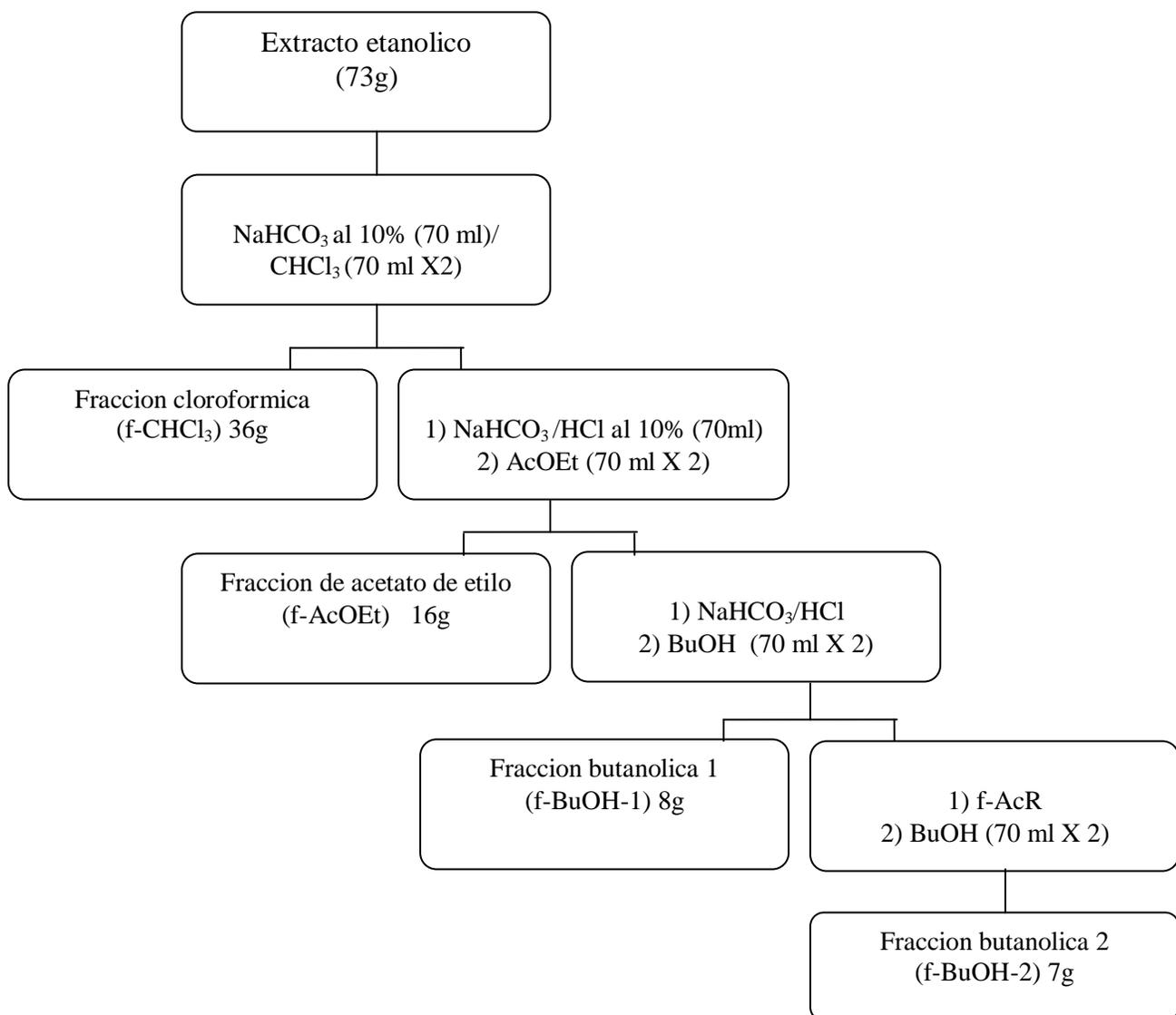
VII.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Para los análisis del extracto, compuestos puros y las fracciones se realizó la cromatografía líquida de alta eficacia. Se colocó una muestra de 10 mg en un vial, se le adicionó 1 ml de MeOH, se agitó cuidadosamente hasta disolverla por completo, una vez disuelta se procedió a filtrar la muestra con un microfiltro para remover el material insoluble y se colocó en otro vial limpio y seco. Una vez sin restos insolubles, se inyectaron 20 µL de la muestra a la columna y se analizó en un periodo de 1h.

El tiempo de retención de la quercetina fue de 41.04 min y la rutina de 33.7 min, el sistema utilizado fue Agua:Metanol:Acetonitrilo.

VII.3 Partición ácido base

Una parte (73 g) del extracto etanolico se suspendió en NaHCO_3 al 10% (70 ml) y se extrajo con CHCl_3 (70 ml X2), a la fase básica se le adicionó HCl al 10% (70 ml) y se extrajo con AcOEt (70 ml X 2) y BuOH (70 ml X 4).



Esquema 2. Fraccionamiento ácido/base del extracto etanólico de *Schinus molle* L.

VII.4 Identificación de flavonoides de la fracción butanólica 1

De la fracción obtenida de la partición acido-base (f-BuOH-1) se obtuvo un sólido de color amarillo que por análisis en CCF y empleando una referencia disponible en el laboratorio, fue identificado como quercetina **40**. Posteriormente se analizó con el CLAR, la quercetina tuvo un tiempo de retención de 20 min.

VII.5 Identificación de flavonoides de las fracciones butanólica 2 y AcOEt

De las fracciones obtenidas de la partición acido-base (f-BuOH-2 y f-AcOEt) se obtuvo un sólido de color amarillo y verdoso-amarillento respectivamente y empleando una referencia disponible en el laboratorio, fue identificado como rutina **41**. Posteriormente se analizó con el CLAR, la rutina tuvo un tiempo de retención de 20 min.

VII. 6 Evaluación biológica

VII. 6.1 Animales de laboratorio

Los animales empleados fueron ratones machos y hembras de peso entre 30-40g de la cepa CD-1 y ratones de la cepa Nu-Nu machos (30-40g), obtenidos del bioterio del IMSS CMN SXXI. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad. Los animales de laboratorio fueron usados conforme lo indica la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio

VII. 6.2 Línea celular

La línea celular empleada fue U-937, ATCC numero: CRL-1593.2. Para la propagación de las células se tomó el medio RPMI (Roswell Park Memorial Institut).

VII. 6.3 Estudio de toxicidad aguda del extracto etanolico de *Schinus molle* L

El ensayo fue conducido según el método de las clases tóxicas agudas descrito en la normativa N° 423 de la OECD (OECD Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method» N° 423)

Se utilizaron 18 ratones cepa CD-1 (9 hembras y 9 machos) entre 30-40 g de peso, los cuales se dividieron en 6 lotes (3 lotes de hembras y 3 lotes de machos) de tres ratones cada uno.

A 4 lotes se les administró el extracto etanólico de *S. molle* por vía intragástrica, administrando las dosis de 100 y 1000 mg/kg, las cuales se administraron en una sola toma, el extracto se disolvió en DMSO al 2% en agua, a los lotes controles solamente se les administró el vehículo (DMSO al 2% en agua). Los ratones tuvieron libre acceso a la alimentación durante todo el experimento, se mantuvieron en observación durante 48 h posteriores a la administración, se registró la mortalidad, los animales sobrevivientes se sacrificaron y se evaluó el daño macroscópico en corazón, riñón hígado, pulmón, páncreas, estomago y bazo.

VII. 6.4 Determinación de efecto antitumoral en un modelo murino de los productos obtenidos de *Schinus molle*

Se inocularon las células malignas en los animales a razón de 1×10^6 células tumorales por ratón, inoculándolo por vía intraperitoneal. A las 24 hr de inoculadas las células tumorales se conformaron, de forma aleatoria, los grupos experimentales.

Para objeto de este estudio se emplearon 9 grupos de ratones de la cepa CD-1: un grupo blanco (sin inóculo y sin tratamiento), un control- (con inóculo de células y sin tratamiento), y los grupos de estudio (quercetina, rutina, el extracto EtOH y las f-CHCl₃, f-AcOEt, f-BuOH-1 y f-BuOH-2). Cada grupo quedó constituido por 6 animales, los cuales se trataron por vía oral durante 9 días a una dosis de 100 mg/kg. Los animales se mantuvieron en observación durante 30 días, y se registro diariamente su peso y sobrevida.

También se emplearon 9 grupos de ratones desnudos: los grupos de estudio (quercetina, rutina, el extracto EtOH y las f-CHCl₃, f-AcOEt, f-BuOH-1 y f-BuOH-2), control- (con inoculo de células y sin tratamiento), y un grupo blanco (sin inoculo y sin tratamiento). Cada grupo quedó constituido por 5 animales, los cuales se trataron por vía oral durante 9 días a una dosis de 100 mg/kg. Los animales se mantuvieron en observación durante 30 días, y se registro diariamente peso y sobrevida.

Una vez concluido ese periodo se sacrificaron y se realizó la necropsia con el fin de extirpar los ganglios axilares e inguinales. La evaluación de la actividad antitumoral se realizó comparando el promedio de los pesos de los ganglios linfáticos de los grupos tratados respecto al promedio de los pesos de los ganglios del grupo control negativo y del blanco.

VII. 7 Analisis Estadistico

Los resultados se expresan como media \pm desviacion estándar. La diferencia entre los estudios se evaluó con la prueba de t de Student, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

VIII RESULTADOS

El presente trabajo se realizó en 2 fases. La primera comprende la preparación de los productos obtenidos de *S. molle* y la segunda el efecto antitumoral en ratones.

En tanto a la evaluación *in vivo* se dividió en 2 partes que fueron el estudio de toxicidad aguda y la evaluación de la actividad antitumoral en ratones. En la determinación de toxicidad aguda se tuvo por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada del extracto etanólico de *Schinus molle*. Para la evaluación de la actividad antitumoral empleando la línea celular U-937, se optó por la medición de peso y longitud de los ganglios inguinales y axilares, debido a que en los linfomas no Hodgkin hay un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos.

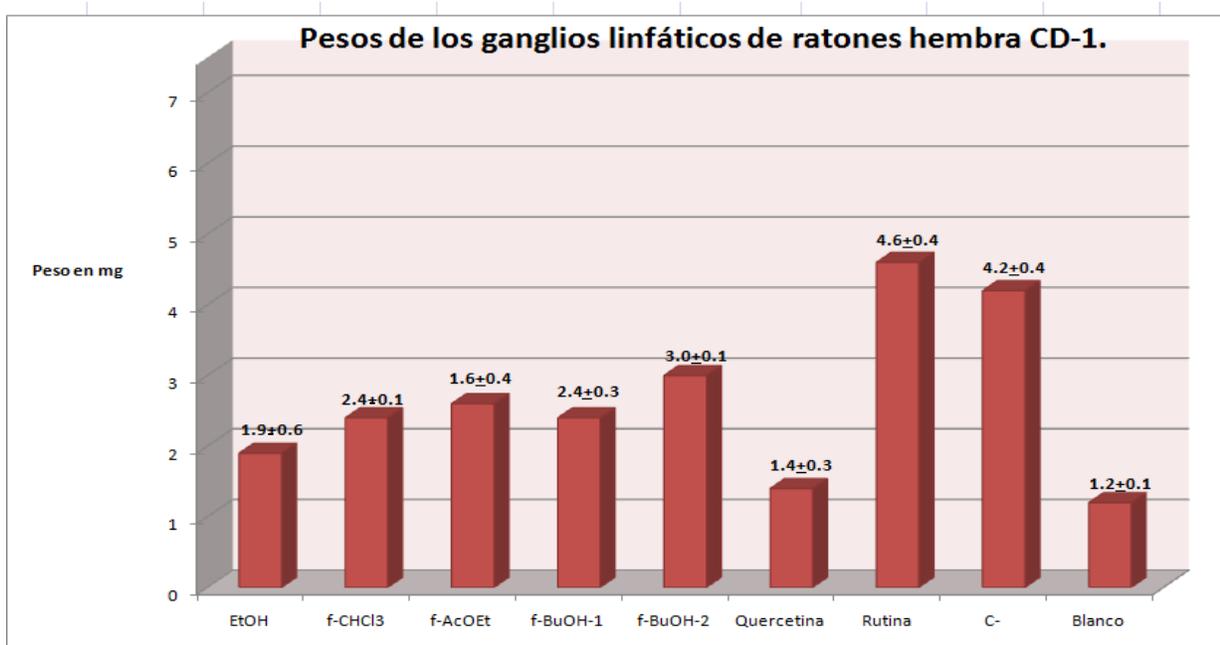
VIII. 1 Obtención de los productos del extracto EtOH de las hojas de la especie de *Schinus molle* L.

A partir de las hojas de *S. molle* se preparó el extracto etanólico a gran escala mediante maceración. El extracto etanólico fue sometido a una partición ácido base obteniendo 5 fracciones: f-CHCl₃ (36 g), f-AcOEt (16 g), f-BuOH-1(8 g), f-BuOH-2(7 g) y f-AcR (4g). A estas 5 fracciones se les realizó la CCF y de igual forma se utilizaron distintos agentes cromógenos para la detección de los compuestos presentes en cada fracción. En la CCF al ser reveladas se demostraba la presencia de flavonoides en la f-AcOEt, f-BuOH-1, f-BuOH-2; estas al compararse con un estándar disponible, demostró que se trataba de los flavonoides rutina y quercetina.

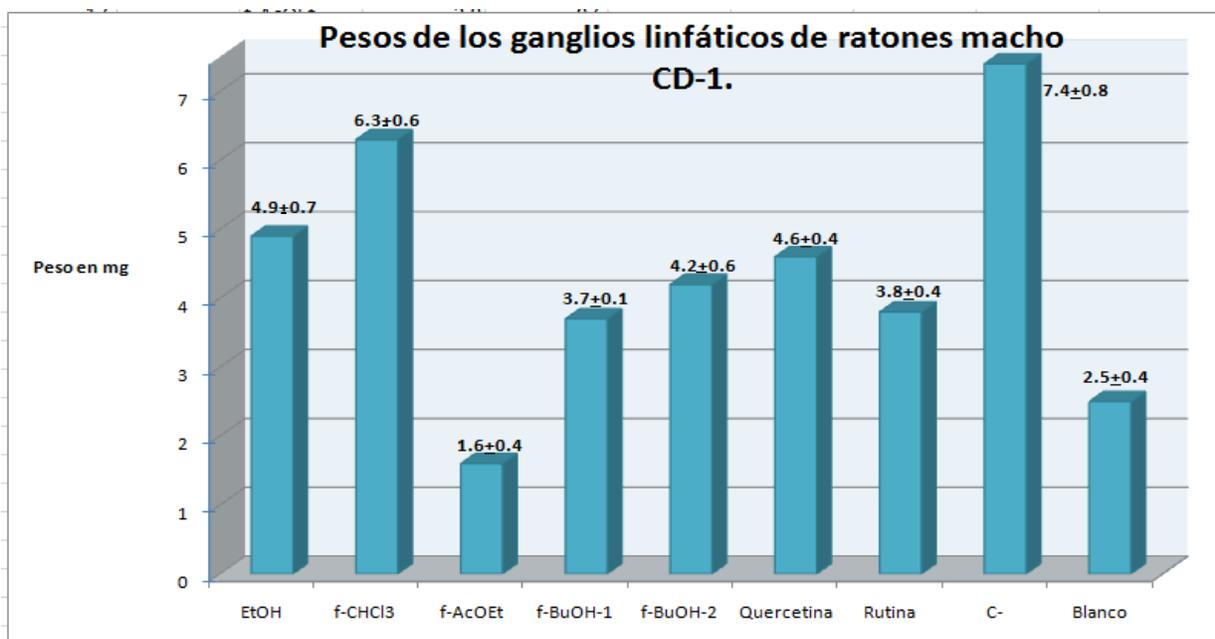
Posteriormente se realizó una CLAR a estas mismas fracciones, los resultados confirmaron que en las muestras se encontraban los flavonoides quercetina y rutina.

VIII.2 Efecto antitumoral del extracto EtOH, de las fracciones obtenidas y de los principios activos rutina y quercetina

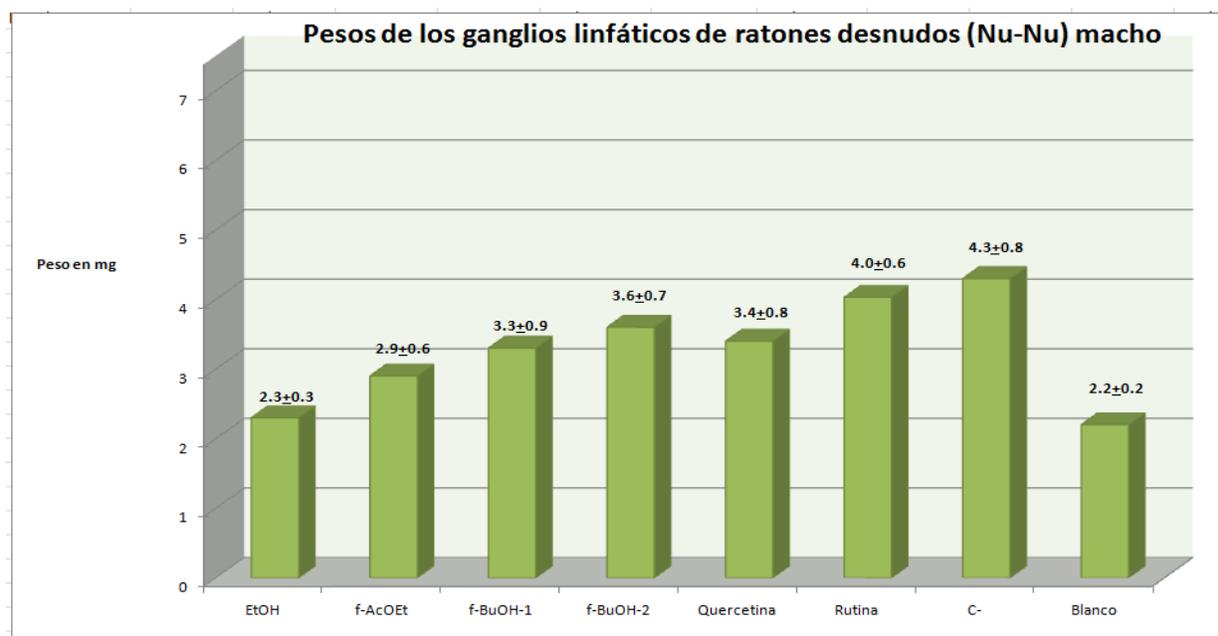
PESO DE GANGLIOS LINFATICOS



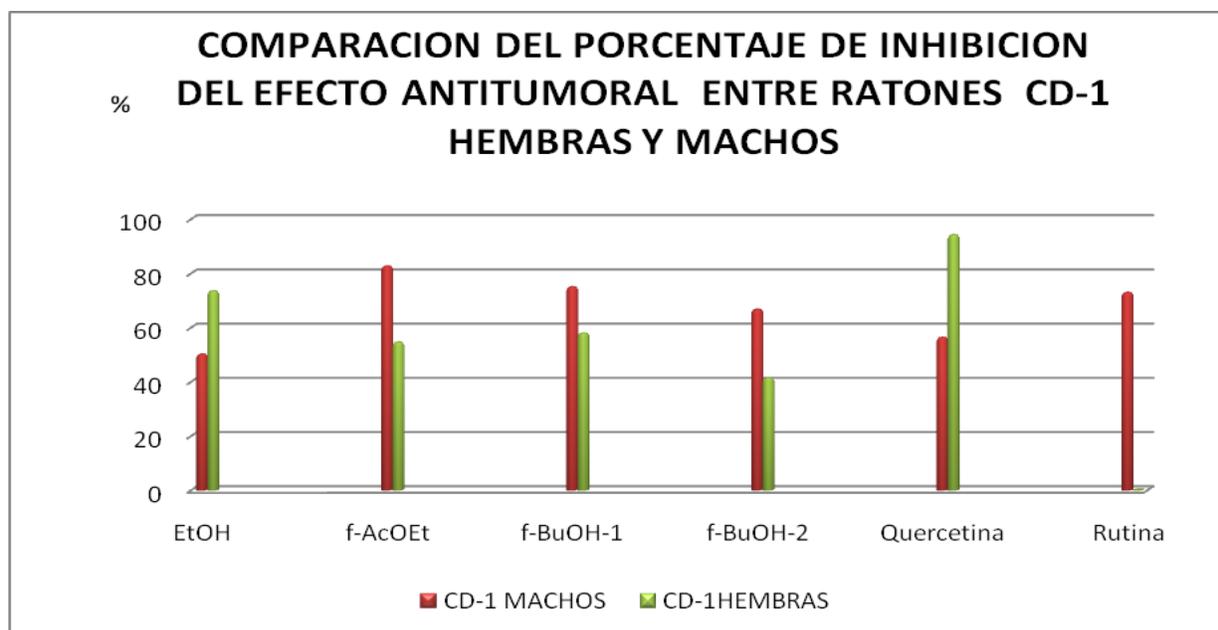
Gráfica 1. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones hembra CD-1.



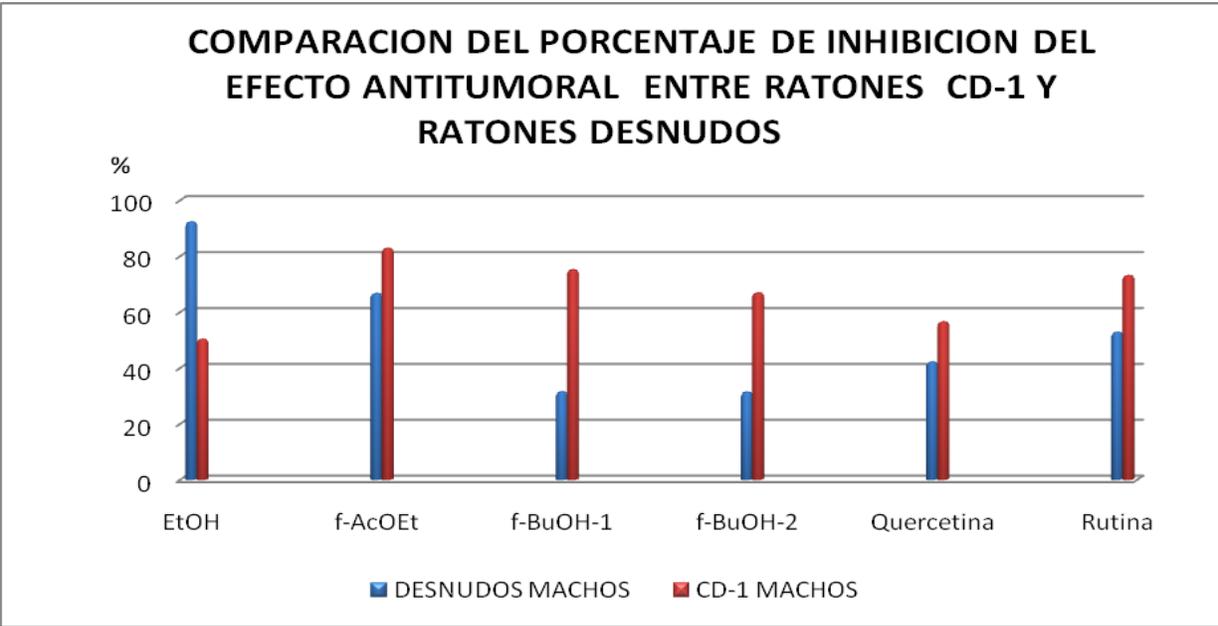
Gráfica 2. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones macho CD-1.



Grafica 3. Promedio de los pesos en mg de los ganglios linfáticos de ratones desnudos (Nu-Nu) macho.

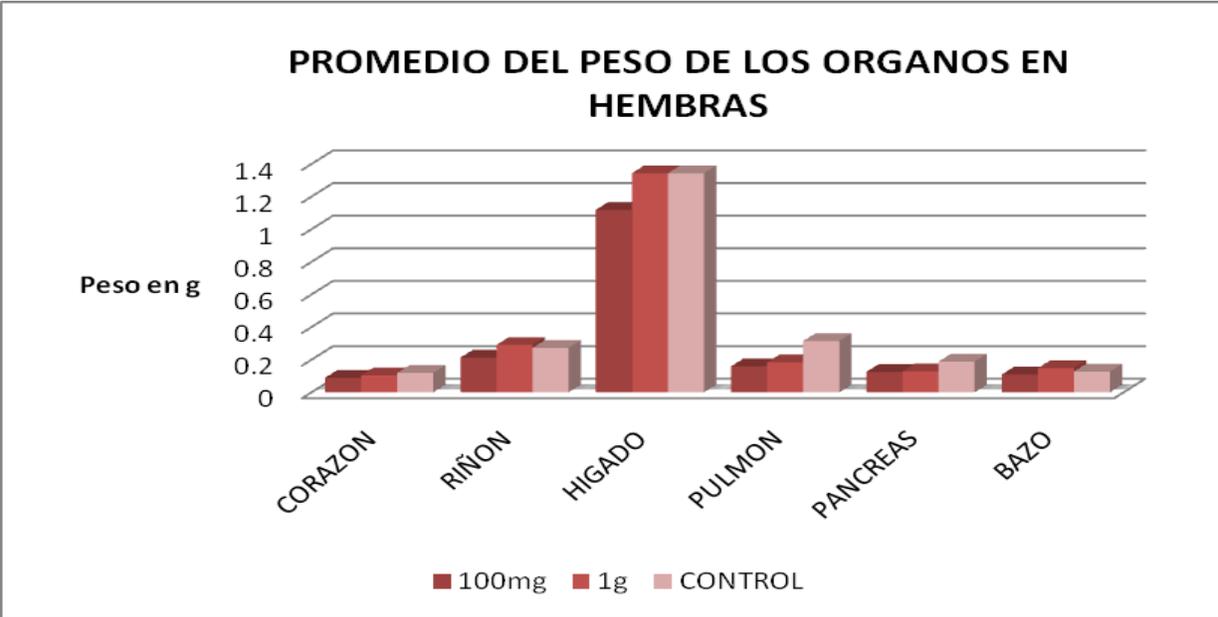


Grafica 4. Porcentajes de inhibición de los extractos de *S. molle* en ratones machos y hembras de la cepa CD-1.

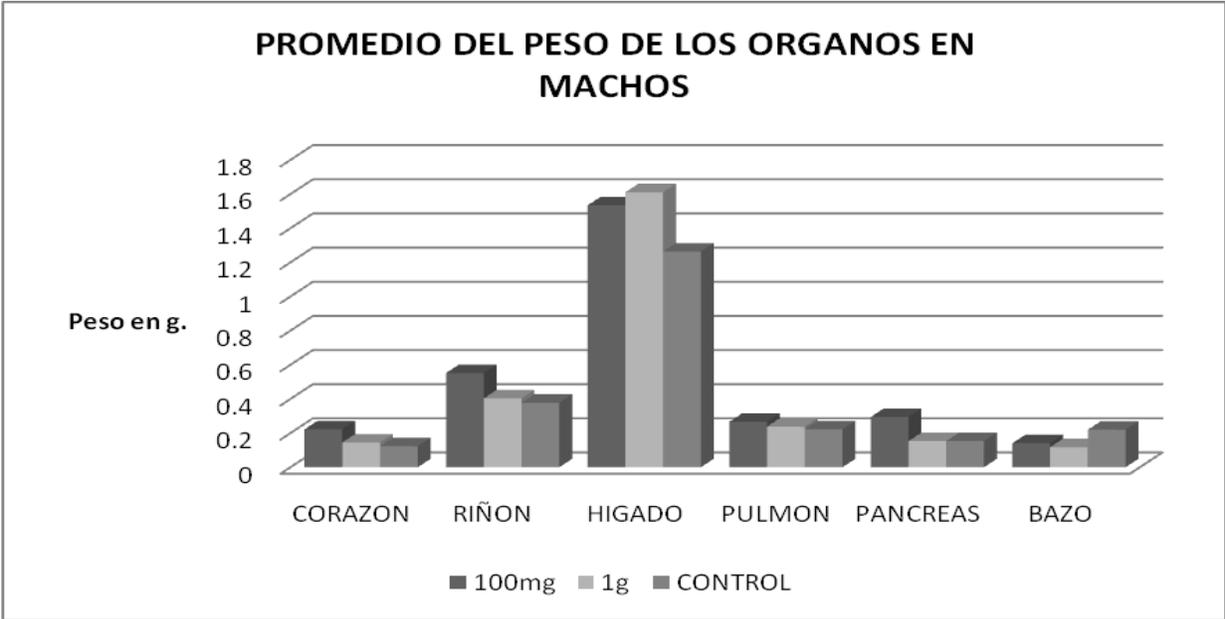


Grafica 5. Porcentajes de inhibición de los extractos de *S. molle* en ratones machos de la cepa CD-1 y ratones machos Nu-Nu

VIII.3. Estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de *Schinus molle* L



Grafica 6. Promedio de los pesos de los órganos del estudio de toxicidad aguda en ratones hembra CD-1



Grafica 7. Promedio de los pesos de los órganos del estudio de toxicidad aguda en ratones machos CD-1

IX ANALISIS DE RESULTADOS

IX .1 Efecto antitumoral del extracto EtOH, de las fracciones obtenidas y de los principios activos rutina y quercetina

Una vez obtenido el extracto, fracciones y flavonoides de *S. molle* se sometieron a la evaluación de la actividad antitumoral en ratones inoculados con las células malignas. En las graficas 1, 2 y 3 se muestra el efecto antitumoral producido por la administración intragástrica de las diferentes productos de las hojas de *S. molle* y de los principios activos a dosis de 100 mg/kg de peso corporal en ratones.

A excepción el efecto ocasionado del principio activo de rutina en hembras CD-1 todos los extractos estudiados a la dosis de 100 mg/kg produjeron descensos significativos del peso de los ganglios con respecto al grupo blanco tanto en ratones hembras como en machos de la cepa CD-1, como de los ratones de la cepa Nu-Nu. Encontrándose que a esta dosis el tratamiento con mayor actividad en hembras CD-1 fue la quercetina con un 94.9 % de disminución del tumor, en machos CD-1 fue la f-AcOEt con un 82.81% y en los ratones Nu-Nu, el que tuvo el mayor efecto fue el extracto EtOH con un 92.27%.

Se piensa que esta variación entre géneros de ratones de la cepa CD-1 es debida a los constantes cambios hormonales que presentan los ratones hembra como se muestra en la grafica 4. Como era de esperarse el C-, que es el grupo que no se le dio ningún tratamiento, solamente se les inoculo las células malignas, tanto de hembras como de machos, el peso y tamaño de los ganglios linfáticos fue el mayor.

Comparado los porcentajes de inhibición de los productos obtenidos de *S. molle* entre los ratones machos CD-1 y los ratones Nu-Nu como se muestra en la grafica 5, el efecto observado mostro cierta similitud. En los ratones Nu-Nu el efecto se concentró en el extracto EtOH, seguido de la f-AcOEt y rutina; en los ratones machos CD-1 se concentró en las f-AcOEt, f-BuOH-1 y en la rutina. Por tanto

podemos decir que los efectos ocasionados por la f-AcOEt y rutina, tuvieron un comportamiento muy parecido sin importar las cepas.

Por último al comparar los resultados que obtuvimos de los ratones de la cepa CD-1, podemos observar que los machos fueron mas susceptibles que las hembras. Y comparando los resultados entre cepas, la cepa Nu-Nu fue la más susceptible al modelo como era de esperarse por su inmunodeficiencia.

IX .2 Estudio de toxicidad aguda del extracto etanólico de *Schinus molle* L

En el estudio de toxicidad aguda se evaluó el efecto tóxico que tiene extracto etanólico de *S. molle* en los órganos internos de los animales, como se observa en la grafica 6 y 7 el extracto etanólico de *S. molle* presentando ningún efecto toxico en los ratones hembra, ni en los ratones macho de la cepa CD-1.

X CONCLUSIONES

- ❖ **X.1** El extracto EtOH, las distintas fracciones obtenidas y los flavonoides que se extrajeron de las hojas de *Schinus molle* L poseen actividad antitumoral en ratones inoculados con la línea celular U-937 perteneciente a un Linfoma no Hodgkin, a dosis de 100 mg/kg de peso, siendo extracto EtOH, la f-AcOEt y la quercetina los más efectivos.

- ❖ **X.2** El fraccionamiento químico biodirigido del extracto etanólico permitió la identificación de los flavonoides quercetina y rutina.

- ❖ **X.3** El efecto antitumoral producido por el extracto, fracciones y principios activos derivados de las hojas de *Schinus molle* permite explicar en parte el uso de esta planta en comunidades indígenas de México para combatir distintos tipos de cáncer.

- ❖ **X.4** El estudio de toxicidad aguda que se le realizó al extracto EtOH de las hojas de *Schinus molle* L demuestra que no ocasionó ningún efecto tóxico en los órganos de los ratones.

XI BIBLIOGRAFIA

- Abasto, K., Avilés, E., Céspedes, G., Claros, E., Guillén, V., Luna, N., y Morales, M. (2004). *Planta medicinales y sus usos*. Brújula Universitaria Universidad del Valle. Cochabamba, Bolivia.
- Abbas, A., Lichtman A. (2011). *Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd edition)*. Saunders. ISBN 978-1-4160-4688-2.
- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S, Jacquez, P. y López M. E. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Nacional del Seguro Social*. Primera edición. Redacta S.A. México, p.14, 15, 139, 148, 165, 178, 192 y 193
- Ávila, O. (2006). *Estudio antibacteriano y químico de los productos derivados de las flores de Chiranthodendron pentadactylon Larreat*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México D.F.
- (A.M.) Ayuntamiento de Murcia. www.blogs.murcia.es/barriomaraula/category/ciencia/ [consulta: 25 enero 2011]
- (BDMTM) Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx [consulta: 20 enero 2011]
- Bueno, J., Alvarez, F. (2005). *Biodiversidad del Estado de Tabasco*. 1ª edición. Editorial CONABIO. México. P. 455 y 2337
- Calvelo, F. (2011). *Mecanismos de acción antitumoral*. Publicación periódica Boletín oncológico Hospital General Obispo Polanco. Teruel. p 2-3.
- Colom L., Azcue F. M, Pérez G. R., Respall R.M, Ruiz G. R, Quesada C. W. (2005). *Evaluación antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 36, No. Especial. La Habana, Cuba. p 3
- (CONABIO) Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. www.conabio.gob.mx [consulta: 22 enero 2011]

- Corzo, M., Hernández, A. (2008). Conocimientos y practica de las mujeres de 20 a 50 años sobre el uso y conservación de las plantas medicinales en la comunidad de Salpet Melchor de Mencos, Peten durante los meses de enero a mayo 2008. Tesis de licenciatura. Guatemala, p. 10-12
- Croat, T.B. (1998). Flora de la Isla de Barro Colorado. Publicado en: Species Plantarum 1: 536-537. 1753.
- Dugdale, D. (2008). Cáncer – Tratamiento. Enciclopedia medica online. University of Maryland Medical Center (UMMC). Baltimore.
- Duke JA (1985) CRC Handkbook of Medicinal Herbs. CRC Press: Boca Raton, pag. 434
- Florence J., Meyer, Y. (2007). Base de données botaniques Nadeaud de l'Herbier de la Polynésie française www.herbier-tahiti.pf [consulta: 19 enero 2011]
- Grossman H. (2004). Linfomas: Linfoma No Hodgkin y enfermedad de Hodgkin. AIDSMEDES. U.S
- Hanan A. y Mondragón, A. (2009). Anacardiaceae. Schinus molle L. Pirú. México.
- Harrison R. (2006). Harrison Principios de Medicina Interna. Enfermedad de Hodgkin clásico. 16a edición. McGraw-Hill. Harrison online en español.
- (INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/tabulados/ConsultaMortalidad.asp [consulta: 22 enero 2011]
- Lybarger, J., Spengler, R., DeRosa, C. (1993). Priority Health Conditions: An Integrated strategy to Evaluate the Relationship Between Illness and Exposure to Hazardous Substances. Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades. U.S, p 4-5
- Beers, M., Fletcher,A. (2004). Manual Merck de información medica para el hogar. Segunda edicion. Editorial Oceano. Seccion 14: Transtornos de la sangre. España.
- Martínez, M., Bernardo (2009). Linfomas. Unidad en Investigación Medica en Inmunológica e Infectologia CMN “La Raza”. México D.F.

- Márquez A. C., Lara O. F., Baldomero R., Mata E. R. (1999). Las plantas medicinales de México II. 1ª edición. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p. 15, 16, 19, 2, 27, 28, 29, 49, 52, 55, 56, 57, 61, 62, 65, 79, 83, 84, 85, 91, 105, 106, 107, 108, 127, 128, 137, 138, 141, 143, 153 y 154
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005. Ginebra, (documento de referencia WHO/EDM/TRM/2002.1)
- Organización mundial de la Salud Ginebra. (2002). Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS. No 2.
- Pérez, L. y Carmona M. D. (2005). Información sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer cervico-uterino y satisfacción con la atención médica. Psicología y Salud. Vol.15 No. 001. Universidad Veracruzana, México, p. 85-95
- PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Edición 51, México (2005)
- Ruffa M., Ferraro G., Wagner M., Calcagno M., Campo R., Cavallaro L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J Ethnopharmacol 79: 335-339
- (SPT) Salud para ti. [www. saludparati.com/plantasmedi1.htm](http://www.saludparati.com/plantasmedi1.htm) [consulta: 20 enero 2011]
- Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS (2005) Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. J Ethnopharmacol 96: 563-568
- Tenorio, O. (2006) Enfermedades hematológicas del bazo. Linfomas. UNAM, Facultad de Medicina.
- Vassallo, J., Barrios, E. (2003). Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, Montevideo.

- Yuequin, Zeng. (2007). Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Tesis doctoral. Departamento de Farmacología. Universidad de Valencia, España, p 5-10