



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE ETNOBOTÁNICA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Actividad biológica de extractos de plantas
usadas para el tratamiento del cáncer e
infecciones en Tepatepec, Hidalgo.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

JURIANA CORTÉS CABRERA

ASESOR: Miguel Ángel Villavicencio Nieto

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO, NOVIEMBRE 2005.

AGRADECIMIENTOS

M. en. C. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, le agradezco el apoyo incondicional, la paciencia que me brindó y sobre todo el haberme aceptado como su alumna para la realización de este trabajo.

Quím. Blanca Estela Pérez Escandón, agradezco la ayuda recibida para la realización y culminación de este trabajo.

Quím. Alfredo Ramírez Aguirre por su apoyo para la realización de los espectros.

Vilma Maldonado del Instituto Nacional de Cancerología, México por las facilidades otorgadas para la elaboración de las pruebas en células HeLa.

Al jurado revisor: Quím. Blanca Estela Pérez Escandón, M. en. C. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, M. en C. Leticia Romero Bautista, Dr. Otilio Acevedo Sandoval, M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún, Dr. Numa Pompilio Pavón Hernández y Dra. Maritza López Herrera.

DEDICATORIAS

A mis padres Laura y Juan por brindarme la confianza y la oportunidad de culminar mi meta trazada, por estar a mi lado siempre, por las palabras de aliento en los momentos más difíciles de mi vida, por haberme hecho más ligero mi camino y por ser los mejores padres conmigo.

GRACIAS

A mi hermanita Mildred quien vino a dar alegría y felicidad a nuestras vidas, te quiero mucho y me siento orgullosa por que eres una buena estudiante y hermana.

A mi amor Fraank por su cariño, comprensión y por escucharme y saber darme consejos cuando los necesite y por apoyarme moralmente para culminar este trabajo, espero y siempre estemos juntos. Te quiero.

A mis amigos Jorge, Chuy, Luis, Ingrid, Lorena, Mireya y Erika, gracias por la amistad, confianza y sobre todo el haberme permitido conocerlos y convivir con ustedes. Son los mejores amigos.

ÍNDICE TEMÁTICO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
ÍNDICE TEMÁTICO.....	III-IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V-VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX-X
RESUMEN.....	XI-XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cáncer: en medicina alopática y medicina tradicional.....	2
1.2 Relación entre cáncer e infecciones.....	9
1.3 Plantas: Fuente de sustancias bioactivas.....	14
1.4 Necesidad de bioensayos.....	16
2. ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1 Objetivos particulares.....	26
6. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	27
7. METODOLOGÍA.....	32
7.1 Entrevistas.....	32
7.2 Colecta, identificación y elaboración del listado de especies.....	32
7.3 Preparación de extractos.....	33
7.4 Citotoxicidad.....	35
7.5 Obtención del principio activo de <i>Plumbago pulchella</i>	36
7.6 Actividad antibacteriana.....	38
7.7 Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	40
7.8 Pruebas fitoquímicas preliminares.....	43
7.9 Determinación de la correlación entre toxicidad y actividad citotóxica, antibacteriana y la concentración de alcaloides	48
7.10 Fichas por especie de planta	48
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49

8.1 Entrevistas	49
8.2 Efectos citotóxicos	52
8.3 Identificación del compuesto activo de <i>Plumbago pulchella</i>	55
8.4 Efecto citotóxico de la plumbagina.....	61
8.5 Actividad antibacteriana	66
8.6 Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	77
8.7 Pruebas fitoquímicas preliminares	79
8.8 Determinación de la correlación entre toxicidad y actividad citotóxica y antibacteriana y la concentración de alcaloides	81
8.9 Fichas de las especies.....	86
9. CONCLUSIONES.....	102
10. LITERATURA CITADA	105
11. GLOSARIO.....	120
ANEXO 1.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	Ubicación en Hidalgo y división política del municipio de Tepatepec. Información INEGI, 1998.....	29
<i>Figura 2</i>	Vegetación y uso potencial del suelo del municipio de Tepatepec.	30
<i>Figura 3</i>	<i>Yucca filifera</i> (palma).....	31
<i>Figura 4</i>	<i>Prosopis laevigata</i> (mezquite) y <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (garambullo).....	31
<i>Figura 5</i>	Obtención de extractos en Soxhlet.....	34
<i>Figura 6</i>	Gradilla con tubos testigo y tubos que contienen extractos vegetales, ambos con <i>Artemia salina</i>	42
<i>Figura 7</i>	Determinación de triterpenos, flavonoides y saponinas	46
<i>Figura 8</i>	Determinación de alcaloides	47
<i>Figura 9</i>	Frecuencia de uso de las distintas partes de la planta.....	51
<i>Figura 10</i>	Frecuencia de forma de preparación de las plantas medicinales.....	51
<i>Figura 11</i>	Frecuencia de la forma de administración de las plantas medicinales.....	52
<i>Figura 12</i>	Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones del extracto etanólico de <i>Plumbago pulchella</i> durante 12, 24 y 48 hrs. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Cada una de estas barras representan la desviación estándar.....	53
<i>Figura 13</i>	Estructura química y fotografía de los cristales de la plumbagina.....	55

<i>Figura 14</i>	Cromatograma de gases de la plumbagina.....	57
<i>Figura 15</i>	Espectro de masas de la plumbagina (a) comparado con un espectro de la misma sustancia de la biblioteca digital del equipo (b).....	58
<i>Figura 16</i>	Espectro de ultravioleta de la plumbagina.....	59
<i>Figura 17</i>	Espectro de Infrarrojo de la plumbagina.....	60
<i>Figura 18</i>	Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de la plumbagina durante 24 y 48 hrs. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Cada una de estas barras representa la desviación estándar.....	62
<i>Figura 19</i>	Células HeLa expuestas al vehículo (A) o al extracto etanólico (1.0 µl/100 µl de medio por 24 h) de <i>Plumbago pulchella</i> (B). Aumento original 10x.....	63
<i>Figura 20</i>	Células HeLa expuestas al vehículo (A) o a la plumbagina a una concentración de 2.0 µg/ml por 24 h (B) o 5.0 µg/ml por 24 h (C). Aumento original A y B 10x; C 20x.....	64
<i>Figura 21</i>	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Plumbago pulchella</i> 250 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	68
<i>Figura 22</i>	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Plumbago pulchella</i> 500 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	69

Figura 23	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Ambrosia psilostachya</i> 1000 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	70
Figura 24	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Jatropha dioica</i> var. <i>dioica</i> 1000 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	71
Figura 25	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Baccharis salicifolia</i> 250 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	72
Figura 26	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Marrubio vulgare</i> 1000 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	73
Figura 27	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Decatropis bicolor</i> 1000 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	74
Figura 28	Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de <i>Pinaropappus roseus</i> 1000 µg/ml en <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella typhimurium</i> (B) y <i>Staphylococcus aureus</i> (C), en comparación con el testigo negativo.....	75
Figura 29	<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.....	86

<i>Figura 30</i>	Tallo, hojas e inflorescencias de <i>Baccharis salicifolia</i> (Ruíz & Pavón)	
	Pers.....	88
<i>Figura 31</i>	Acercamiento a las inflorescencias de <i>B. salicifolia</i> (Ruíz & Pavón)	
	Pers.....	88
<i>Figura 32</i>	Tallo, hojas y flores de <i>Pinaropappus roseus</i> Less.....	90
<i>Figura 33</i>	<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	92
<i>Figura 34</i>	Flores de <i>J. dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	92
<i>Figura 35</i>	<i>Marrubium vulgare</i> L.....	95
<i>Figura 36</i>	<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.....	98
<i>Figura 37</i>	<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc) Radlk.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i>	Especies vegetales usadas como anticancerígenos.....	11
<i>Tabla 2</i>	Lista de especies usadas para tratar al cáncer en Tepatepec, Hidalgo	50
<i>Tabla 3</i>	CI ₅₀ (µg/ml) de los extractos y fracciones vegetales a la que se reduce al 50% la viabilidad de las células HeLa. Los resultados que se muestran son el promedio de tres experimentos in: inactivo, ne: no ensayada.....	54
<i>Tabla 4</i>	Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las especies de plantas estudiadas. Los resultados se expresaron como: 0 inactivo, 1 parcialmente activo, 2 activo, 3 muy activo	67
<i>Tabla 5</i>	CL ₅₀ y límites de confianza 95% de los extractos etanólicos de las plantas registradas en Tepatepec, Hidalgo probados a un rango de concentración de 5 a 2000 µg/ml en larvas de <i>Artemia salina</i>	79
<i>Tabla 6</i>	Compuestos secundarios presentes en los extractos de las plantas estudiadas. Concentración: 0 nula, 1 baja, 2 media, 3 alta y 4 muy alta	81
<i>Tabla 7</i>	CL ₅₀ en <i>Artemia salina</i> y CI ₅₀ en células HeLa (en µg/ml) de los extractos etanólicos de <i>Jatropha dioica</i> var. <i>dioica</i> , <i>Plumbago pulchella</i> y <i>Decatropis bicolor</i>	82
<i>Tabla 8</i>	CL ₅₀ en <i>Artemia salina</i> y actividad antibacteriana en <i>E. coli</i> (en µg/ml) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas	83

<i>Tabla 9</i>	CL ₅₀ en <i>Artemia salina</i> y actividad antibacteriana en <i>S. aureus</i> (en µg/ml) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas.....	84
----------------	--	----

<i>Tabla 10</i>	CL ₅₀ en <i>Artemia salina</i> y concentración de alcaloides (determinación estimativa) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas.....	85
-----------------	---	----

RESUMEN

El hombre desde la antigüedad ha buscado en las plantas la curación para sus diversas enfermedades. Las ha utilizado para tratar padecimientos como afecciones de la piel, del sistema circulatorio, endocrino, nervioso, reproductor, respiratorio y urinario; también para el cáncer y las infecciones.

En el municipio de Tepatepec, Hidalgo se realizó este estudio sobre plantas medicinales usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones. Se visitaron las comunidades de La Cruz, Lázaro Cárdenas, San Juan Tepa, El Mendoza y la cabecera municipal en donde se realizaron 42 entrevistas semiestructuradas y 42 entrevistas estructuradas empleando cuestionarios que se les dieron a los habitantes de esas comunidades, dando como resultado que se registró el uso de siete especies de plantas que son *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var *dioica*, *Plumbago pulchella* Boiss, *Pinaropappus roseus* Less, *Marrubium vulgare* L. *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers. y *Ambrosia psilostachya* DC. De estas siete especies tres se emplean para tratar el cáncer de matriz, son *Plumbago pulchella* Boiss, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var *dioica* y *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, de las cuales se probaron sus extractos etanólicos para medir su efecto citotóxico en células de la línea de cáncer cérvico uterino HeLa, obteniendo como resultado que *P. pulchella* redujo la viabilidad celular, lo que significa que produjo citotoxicidad mientras que los extractos de *D. bicolor* y *J. dioica* no redujeron la viabilidad de las células HeLa. Se calculó la CL₅₀ del extracto de *P. pulchella* la cual fue de 19.5, 1.5 y 1.0 µg/ml a 12, 24 y 48 hrs.

Para evaluar la actividad antibacteriana se probaron los extractos de *P. pulchella*, *A. psilostachya*, *D. bicolor*, *M. vulgare*, *B. salicifolia*, *J. dioica* y *P. roseus* en tres cepas de bacterias que son *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* en donde seis (75%) de los extractos presento actividad antibacteriana en cuando menos una cepa, siendo el extracto de *P. pulchella* el único que presentó actividad en las tres cepas de bacterias mientras que el extracto de *P. roseus* fue inactivo. En la toxicidad sobre *Artemia salina*, se obtuvieron los valores de la CL₅₀ de las siete especies, presentando una CL₅₀ < 1000 µg/ml, siendo el extracto de *J. dioica* el que presentó la toxicidad más alta en *A. salina* con el valor de CL₅₀ 7.0557 µg/ml mientras que *A. psilostachya* no presentó toxicidad alguna ya que obtuvo una CL₅₀ > 1000 µg/ml. En lo que respecta al análisis fitoquímico

preliminar, *P. roseus* presentó una concentración alta de alcaloides, *D. bicolor* tuvo alta concentración de flavonoides y triterpenos, *J. dioica* var *dioica* y *M. vulgare* ambos presentaron una concentración media de saponinas. El compuesto activo de *Plumbago pulchella* fue la naftoquinona plumbagina que fue citotóxico en células HeLa (CI_{50} 4.6 y 0.66 $\mu\text{g/ml}$ en 24 y 48 hrs respectivamente).

Se concluye que los extractos de las plantas si produjeron efectos citotóxicos al aplicarlos *in vitro* al cultivo celular HeLa, también fueron activos en pruebas *in vitro* en bacterias y hubo presencia de compuestos secundarios por lo que sería interesante continuar investigando a las especies con más actividad en otros modelos experimentales esto ayudaría a encontrar nuevas fuentes de medicamentos. Está visto que las plantas son prueba de esto y se destaca lo importante que es para este tipo de estudios el conocimiento tradicional como guía en la búsqueda de bioactividad en las plantas.

1. INTRODUCCIÓN

En las plantas los seres humanos encuentran una amplia gama de beneficios, entre los que destacan los alimentos y las medicinas (Cronquist, 1969; Schultes y Von Reis, 1997).

De las 250 000 a 300 000 especies de plantas vasculares que se conocen en el mundo (Heywood, 1993; Stork, 1993) el hombre utiliza del 35 al 50% (Sarukhán, 1995); en México se estima que existen de 22 800 (Rzedowski, 1998) a 30 000 (Toledo, 1988; Toledo y Ordóñez 1998 y Ramamoorthy *et al.*, 1998) especies de plantas vasculares, de las cuales 5 000, tienen uso medicinal (Toledo, 1997); en Hidalgo se han reportado 4000 especies de fanerógamas (Villavicencio *et al.*, 1998) y 417 especies de plantas medicinales (Pérez - Escandón *et al.*, 2003).

La relación hombre – planta (Estrada, 1992; Ramamoorthy *et al.*, 1998) permite que los seres humanos den una utilización variada a las plantas, por lo que se han asignado categorías de uso tales como: comestibles, medicinales, construcción, instrumentos de trabajo, maderables, combustibles, uso doméstico, rituales, forrajes, abonos, colorantes, celulosa, base para chicle, barnices, fibras, taninos, ceras, goma, pegamentos, venenos, aromatizantes, insecticidas, ornamentales, sombra, estimulantes, melíferas, saponíferas, aceites, siendo el uso medicinal el más sobresaliente (Toledo *et al.*, 1995; Sarukhán, 1995).

Las plantas medicinales se utilizan para tratar diversos padecimientos como: afecciones de la piel, caída del pelo, caspa, fuegos, sarna, entre otros así como analgésicos en general, para dolor de dientes y de cabeza, etc. e incluso para enfermedades culturales como aire, espanto y mal de ojo, padecimientos del sistema circulatorio como anemia, circulación, várices y presión arterial; del sistema digestivo como bilis, cálculos biliares y cólicos, del sistema endocrino como la diabetes, del sistema nervioso como epilepsia e insomnio, del sistema reproductor como trastornos en la matriz, para la fertilidad y para ayudar al parto; del sistema respiratorio como catarro, dolor de garganta, tos, dolor de pecho y dolor de pulmón y del sistema urinario como cálculos renales y dolor de riñones. Traumatismos como golpes, heridas y torceduras y otros padecimientos como el algodoncillo, baba, calentura, canas, cansancio, gangrena, heridas internas y hernias. También se utilizan para tratar el cáncer (Aguilar *et al.*, 1994, 1996; Argueta, 1994).

1.1 Cáncer: en medicina alopática y medicina tradicional

En la actualidad se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un pequeño número de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y la pérdida o inactivación de estos genes, da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Los factores ambientales y los virus juegan también un papel importante en las alteraciones genéticas que son necesarias para transformar células normales en cancerosas (Klug *et al.*, 1999).

La célula cancerosa está profundamente alterada tanto desde el punto de vista morfológico, como funcional, antigénico y genético; el fenotipo de las células malignas, por lo tanto, difiere de su contraparte normal (Benítez, 1987). Muchos cánceres se relacionan con la producción anormal de enzimas, proteínas y hormonas, moléculas que se conocen como marcadores tumorales. Los agentes que causan cáncer pueden clasificarse en tres grupos: radiaciones, compuestos químicos y virus (Bolaños, 1990; Pacheco, 1999).

Como causa de mortalidad el cáncer ocupa el tercer lugar a nivel mundial (Stehman *et al.*, 2003; The World Health Report, 2004) siendo el carcinoma del cuello de la matriz la segunda neoplasia más común dentro de la comunidad femenina; anualmente se presentan 500 000 nuevos casos de este tipo de carcinoma en todo el mundo (Moura *et al.*, 2002). A la par en México e Hidalgo las neoplasias (tumores) son la segunda causa de muerte (Argueta, 1994; INEGI, 2003a); en Hidalgo el cáncer del cuello del útero es la primera causa de muerte femenina (INEGI, 2001; INEGI, 2003b).

La cirugía, las radiaciones y la quimioterapia es lo que se usa en la medicina alopática para tratar a pacientes con cáncer (Stehman *et al.*, 2003). Los recursos que se invierten para combatir este padecimiento son cuantiosos, por ejemplo en Estados Unidos la cifra asciende a 100 mil millones de dólares anuales (Moura *et al.*, 2002; U.S. Cancer Statistics Working Group, 2004), a pesar de estas cuantiosas inversiones, el cáncer es uno de los principales problemas de salud.

De acuerdo con Mata Pinzón *et al.*, (1994), en la medicina tradicional, el cáncer es considerado como un padecimiento que se manifiesta con tumores, apostemas, abscesos, ulceraciones, heridas y llagas rebeldes a los tratamientos otorgados en la medicina convencional además de una difícil cicatrización. Considerando esta definición, algunos autores sugieren que entonces, se debe tener presente que en la medicina tradicional, el cáncer es una entidad pobremente definida (Cragg *et al.*, 1996) que presenta dificultades para su diagnóstico en condiciones no tecnificadas (Sumner, 2001) ésto se refiere por ejemplo, a que desórdenes como hinchazones o abscesos pueden ser descritos equivocadamente como crecimientos tumorales y por el contrario lo que se diagnostica como un absceso puede ser un tumor (Hostettmann y Marston, 1987). Esta conceptualización de la medicina tradicional no necesariamente coincide con la biomédica, por lo que puede generar dudas y rechazo. Considerando lo anterior, Grace y Reeve (1996) proponen que se requiere ser sensibles a las diferencias y mantener respeto con este criterio así el estudio de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de lo que la medicina tradicional considera como cáncer, se convierte en una guía para la detección de antineoplásicos de origen vegetal. Autores, como Hostettmann y Marston (1987) están de acuerdo con este enfoque consideran que las posibilidades de encontrar moléculas bioactivas aumentan si se estudian plantas usadas en la medicina tradicional.

Uno de los procedimientos usados para el tratamiento del cáncer en la medicina tradicional es el uso de plantas (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1990; Argueta, 1994; Cassileth y Deng, 2004; Lee, 2004), práctica que ha sido empleada desde la antigüedad hasta hoy en día (Cragg *et al.*, 1996; Sumner, 2001).

Brucea javanica Merr. (Simoroubaceae) e *Isodon japonicus* Hara (Lamiaceae) son empleadas en China desde hace siglos, la primera para tratar la leucemia y la segunda para tumores del esófago (Lien y Li, 1987). En lo que concierne a la medicina tradicional africana se han registrado numerosas plantas que han sido usadas contra tumores, por ejemplo *Psorospermum febrifugum* (Guttiferae) y *Maprounea africana* (Euphorbiaceae) (Hostettmann y Marston, 1987). En la república mexicana un grupo amplio de plantas se usan tradicionalmente como antitumorales, entre las que se encuentran *Myroxylon balsamum* Harms (Leguminosae) y *Solanum verbascifolium* L. (Solanaceae) (Argueta, 1994).

Para comprobar las propiedades antitumorales de distintas especies de plantas empleadas tradicionalmente para tratar al cáncer, la metodología principal ha consistido en hacer pruebas *in vitro* en las que distintas líneas de células de tumores se exponen a los extractos y sustancias puras obtenidos de los tejidos vegetales de las plantas en estudio y determinar si éstos producen citotoxicidad (Shu, 1998).

Gracias a las investigaciones que se han realizado, se han aislado sustancias vegetales antineoplásicas que actualmente forman parte del arsenal terapéutico con que cuenta la medicina alopática para luchar contra el cáncer; lo cual puede considerarse como un ligero resultado de haber tenido un acercamiento respetuoso entre ambos tipos de medicina (Hostettman y Merston, 1987). La vinblastina y vincristina son alcaloides que se aislaron de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) o de *Vinca rosea* L. (Apocynaceae) clínicamente estos alcaloides se utilizan para el tratamiento de la leucemia infantil y el linfoma de Hodgkin. La podofilotoxina es un lignano, un compuesto fenólico, encontrado en *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), esta sustancia que inhibe la mitosis de células con cáncer, es precursora de dos drogas semisintéticas usadas en quimioterapia: etoposido y teniposido, que se usan para tratar cáncer de pulmón y de testículo, así como leucemia y linfomas (Koulman *et al.*, 2004); el paclitaxel (taxol) se encontró naturalmente en la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), es activo en cáncer de seno, cerebro, lengua, endometrio y ovario (Duke, 1990); la camptotecina se aisló de *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae), es un alcaloide que se utiliza clínicamente para tratar cáncer gástrico, rectal, de colon, vejiga, hígado, cabeza y cuello (Lee, 2004).

La búsqueda de anticancerígenos vegetales continúa en especies de países en desarrollo. En Brasil, Mans *et al.*, (2000) estudiaron 500 especies de la flora local y reportaron los efectos citotóxicos de sus extractos. En Colombia Betancur-Galviz *et al.*, (2002) reportaron que en ese país se emplean diez especies

del género *Euphorbia* para tratar el cáncer y encontraron que seis de éstas presentan citotoxicidad en células HeLa y otras líneas tumorales. En Tailandia Itheret *et al.*, (2004), seleccionaron once especies de plantas de la flora regional empleadas tradicionalmente como tratamiento para el cáncer, probaron sus extractos en cultivos de células de carcinoma de pulmón LS-174 y encontraron que *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill (Dioscoriaceae) fue una de las especies activas. Waizel – Bucay *et al.*, (2003) estudiaron a una de las hierbas del cáncer de la herbolaria mexicana, *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae) y ensayaron sus extractos en cultivos celulares, encontraron citotoxicidad ligera en células de cáncer de cervix y nula en carcinoma nasofaríngeo y de colon. Por su parte, López (2001) y López *et al.*, (2002) seleccionaron cinco especies de plantas medicinales usadas tradicionalmente en el estado de Hidalgo como anticancerígenos, comprobaron que el extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Klotzsch. (Cupressaceae) muestra efectos citotóxicos en varias líneas celulares tumorales y demostraron que el efecto es por apoptosis, el proceso activo de muerte celular regulado genéticamente; este tipo de muerte celular se encuentra disminuido en células cancerosas (Albert *et al.*, 1998).

Otras plantas que son utilizadas para el tratamiento del cáncer se muestran en la tabla 1 (Martínez, 1990; Aguilar *et al.*, 1994; Moreno – Murillo *et al.*, 2001)

Tabla 1: Especies vegetales usadas como anticancerígenos

Espece	Sustancia activa
<i>Oplopanax borridum</i>	
<i>Asclepias speciosa</i>	
<i>Spiraea betulifolia</i>	
<i>Vinca major</i>	
<i>Vinca minor</i>	
<i>Heterotheca inulide</i>	
<i>Plantado major</i>	
<i>Oenothera rosea</i>	
<i>Castilleja arvenis</i>	
<i>Cuphea aequipetala</i>	
<i>Acalypha leptopoda</i>	
<i>Solanum douglasii</i>	
<i>Solanum chrysotrichum</i>	
<i>Calophyllum lanigerum</i>	Calanolide A
<i>Calophyllum teysmanii</i>	Calanolide B
<i>Conospermum incurvum</i>	Conocurovone
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	Michellamina B
<i>Homolanthus nutans</i>	Prostratina
<i>Camptotheca acuminata</i>	Topotecan (Hycamtin), Irinotecan (CPT-11, Camptosar), Camptothecin
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Homoharringtonina
<i>Dysoxylum binectiferum</i>	Perilifol y flavopiridol

1.2 Relación entre cáncer e infecciones

Tanto en la medicina alopática como en la medicina tradicional se reconoce que en algunos casos, que se mencionan más adelante, existe relación entre cáncer y enfermedades infecciosas.

Las infecciones son la primera causa de muerte a nivel mundial (The World Health Report, 2004), en México se encuentran en sexto lugar (INEGI, 2003a) y en Hidalgo en quinto (INEGI, 2001, 2003b). En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoció que en el 84% de determinados tipos de cáncer los agentes causales son virus, bacterias y parásitos. Un caso documentado es de los virus 16 y 18 del papiloma humano que son cancerígenos y llegan a ser la causa de desarrollo del carcinoma de cuello del útero; otro caso conocido es el de *Helicobacter pylori*, bacteria causante de úlceras gástricas, padecimiento que en el 20% de los casos, evoluciona hacia la formación de adenocarcinoma del estómago (Cassell, 1998).

En la medicina tradicional, los procesos que se reconocen como cáncer, pueden estar asociados a infecciones (Burke, 1990). Además, hay plantas medicinales que se recomiendan para tratar tumores y para lavar heridas y llagas; un ejemplo de este tipo de plantas es la hierba del cáncer, *Prunella vulgaris* L. (Lamiaceae), cuyos extractos han mostrado citotoxicidad en células tumorales y efectos bactericidas (Willard, 1999); *Mormodica charautia* L. (Cucurbitaceae), una planta distribuida en las zonas tropicales del mundo, se usa tradicionalmente como antitumoral y como desinfectante; en pruebas *in vitro* los extractos fueron citotóxicos

en cultivos de células del melanoma M9 e inhibieron el crecimiento de varias cepas bacterianas (Argueta, 1994).

En cuanto a las infecciones en particular, las bacterianas, su prevalencia se debe en parte a que han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales.

Cuando la penicilina se empezó a usar en humanos en 1941, resultó ser muy eficaz, por lo que se logró reducir la tasa de mortalidad causada por infecciones de origen bacteriano y se pensó que este tipo de enfermedades ya estaba bajo control (Satcher, 1995); pero 20 años después las infecciones volvieron a ocupar los primeros lugares mundiales como causa de muerte y hacia 1975 Mitcher dijo que este repunte era debido al desarrollo de resistencia en distintas cepas de bacterias. El problema ha ido en aumento, de tal forma que enfermedades como la tuberculosis que se creía erradicada, reapareció en 1980 en varios continentes y ahora hay cepas resistentes a la mayor parte de antibióticos conocidos y lo mismo ocurre con la neumonía que anualmente afecta a unos 600 000 personas a nivel mundial (Alleyne, 1998); otro ejemplo es el cólera que en la década de 1990 presentó brotes epidémicos en América Latina (Branding – Bennet y Pinheiro, 1996). Todo se complica aún más al considerar que también han aparecido nuevas enfermedades como el síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA, de origen viral (Satcher, 1995). En este panorama, se ha llegado a considerar a las infecciones como una de las principales amenazas para la seguridad humana (Cragg *et al.*, 1997).

Ante esta situación, es obvio que se requieran nuevos antibióticos, con estructuras y mecanismos de acción diferentes a las de los antibióticos de origen microbiano, como la penicilina, y de esta manera estar en posibilidades de contar con medicamentos con los que se pudiera vencer la resistencia múltiple de las cepas bacterianas.

La OMS, así como los centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) han reconocido esta necesidad y dentro de sus estrategias para enfrentar el problema mundial que representan los microorganismos han definido una en la que se propone que es prioritario aportar el desarrollo de nuevos productos antibióticos y señalan que en el reino vegetal es posible encontrar moléculas que cumplan con los requisitos químicos y fisiológicos señalados arriba para los productos antibióticos que se necesitan (Fauci, 1998), punto de vista que coincide con el de Mitscher *et al.*, (1975) e Iwu *et al.*, (1999).

De hecho, las plantas han sido empleadas desde la antigüedad para tratar procesos infecciosos. En la India desde el año 5000 AC. Se utilizaban especies vegetales aromáticas como el *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) en el tratamiento de infecciones respiratorias (Patel, 1987). En papiros egipcios se reporta el uso del ajo, *Allium sativum* L. (Alliaceae) y de la cebolla, *Allium cepa* L. (Alliaceae) como antisépticos (Elnima *et al.*, 1983; Sumner, 2001). Los Aztecas aplicaban un jugo de maguey *Agave atrovirens* (Agavaceae) para curar heridas aparentemente infectadas (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983). En el Códice Badiano, De La Cruz (1996)

registró el uso de *Plumeria acutifolia* Poirét (Apocynaceae) y de *Capsicum annum* L. (Solanaceae) para la atención la disentería, heridas y bronquitis.

Mitscher *et al.*, (1972) y Mitscher (1975) fueron de los primeros autores que iniciaron los programas de tamizaje (screening) de extractos de plantas para evaluar su actividad antibacteriana. La metodología principal consiste en exponer cultivos de bacterias a diferentes concentraciones de extractos vegetales y determinar la inhibición del crecimiento bacteriano.

Con este enfoque, Cáceres *et al.*, (1990) obtuvieron extractos de 16 especies de plantas empleadas tradicionalmente en el Caribe para la atención de infecciones y encontraron actividad antibacteriana en especies como *Manugifera indica* L. (Anacardiaceae). Hammer *et al.*, (1999) hicieron un estudio en relación al efecto antibacteriano de los aceites esenciales de 52 especies de la flora australiana y encontraron que los aceites de *Cymbopogon citratus* L. (Graminae), *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) y *Pimenta recemosa* L. (Myrtaceae) exhibieron actividad inhibitoria del crecimiento en las 10 cepas de bacterias incluidas en el estudio. Hernández - Díaz y Rodríguez – Jorge (2001) mostraron que los extractos de dos especies del género *Ocimun* (Lamiaceae) de Cuba, presentaron inhibición del crecimiento de cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En Brasil Holetz *et al.*, (2002) reportaron que *Piper regnelli* (Piperaceae) fue activa en *Staphylococcus aureus*; en ese mismo país, Coelho de Souza *et al.*, (2004) reportaron 149 especies de plantas medicinales, seleccionaron 18 de los usados en

infecciones y al evaluarlos en bacterias 12 mostraron actividad. En México, Hernández *et al.*, (2003) hicieron un estudio en Oaxaca, detectaron 44 especies de plantas empleadas para problemas gastrointestinales y al probarlas en bacterias encontraron que la especie más activa fue *Turnera difusa* (Willd) ex Schult (Turneraceae).

En los párrafos anteriores se presentaron evidencias de que efectivamente las plantas son una fuente de compuestos secundarios bioactivos de importancia en la medicina. Otro argumento para reforzar esta idea es que en el periodo 1983 – 1994 las drogas aprobadas para uso humano por la Administración de Alimentos y Drogas “Food and Drug Administration” de los Estados Unidos de América o de entidades similares en otros países, en su mayoría son para el tratamiento del cáncer y de las infecciones y de éstos, la mayor parte (62%) son de origen natural y un 10% provienen de plantas (Cragg *et al.*, 1997).

Otro argumento que destaca la importancia de las plantas en la medicina, es que se calcula que por lo menos el 25% de las prescripciones médicas en el mundo, contienen por lo menos una sustancia vegetal, cuyo valor estimado asciende a diez billones de dólares (Duke, 1990; Shu, 1998; Sumner, 2001).

El potencial que tienen las plantas es mucho más amplio si se tiene en cuenta que apenas una fracción (15%), de las 250 000 a 300 000 especies de plantas actualmente existentes, se ha estudiado desde los puntos de vista químico y

farmacológico, (Balandrín *et al.*, 1985; Holmstedt y Bruhn, 1997; Hostettman, 1997; Cragg *et al.*, 1997), es decir, sólo se ha visto la punta del iceberg y la vasta mayoría de las especies vegetales (85%) sigue siendo una incógnita. De estas últimas, la mayor parte se encuentra en las zonas intertropicales (una porción importante del territorio mexicano se encuentra en esa área) que son los que precisamente registran una acelerada pérdida de habitats, lo que pone en peligro de desaparecer tanto a las especies vegetales que ahí crecen como al conocimiento tradicional asociado a ellos, por tanto, el descubrimiento futuro de sustancias bioactivas de plantas, depende de su conservación (Duke, 1990).

1.3 Plantas: fuente de sustancias bioactivas

Los compuestos secundarios son sustancias orgánicas de peso molecular inferior a 2000 uma (Harborne, 1973; Valencia – Ortiz, 1995). Dichos compuestos se encuentran en las plantas, y en los demás organismos, como respuesta a las presiones de selección de depredadores, competidores, parásitos y microorganismos patógenos y actúan, en primera instancia, como defensas químicas que permiten mantener la integridad de las plantas (Harborne, 1990; Eisner y Meinwald, 1995).

Las propiedades farmacológicas de las plantas se deben principalmente a que contienen metabolitos o compuestos secundarios, los cuales ejercen sus efectos una vez que han sido ingeridos o aplicados los contenidos en infusiones, cataplasmas y otras preparaciones (Estrada, 1995; Balandrín *et al.*, 1985).

Entonces, por un lado está el hecho de que las plantas son una fuente de moléculas bioactivas, que de las drogas naturales para uso humano, la mayoría son para tratar problemas de salud que ocupan los primeros lugares como causa de muerte y que la mayor parte de las plantas no ha sido estudiada; y por otro lado, que urge acelerar la investigación de las plantas en la búsqueda de sustancias de interés médico.

Es por esto que se trata de desarrollar estrategias de investigación eficaces en esta búsqueda. Una estrategia sería la selección de especies vegetales usadas en los sistemas etnomédicos del mundo esto incrementa la posibilidad de encontrar actividad biológica en comparación con la selección al azar de las plantas (Hostettman y Marston, 1987; Schultes y Von Reis, 1997; Betancur – Galvis *et al.*, 2002).

Los compuestos secundarios que se encuentran presentes en las plantas son agrupados en tres grupos principales: compuestos fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas); compuestos nitrogenados: (alcaloides, glicósidos cianogenéticos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de las proteasas); terpenos (lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardíacos, saponinas); hidrocarburos poliacetilénicos y oxalatos (Ikan, 1991).

Los alcaloides; son compuestos heterocíclicos con nitrógeno de carácter básico de los que se conocen más de 20.000 diferentes estructuras, entre cuyos precursores se encuentran varios aminoácidos (Ikan, 1991).

Los terpenos son otro grupo importante de compuestos secundarios entre los que se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, los glicósidos cardíacos y los carotenos. Tienen funciones en las plantas como hormonas (giberelinas) o, de modo más restringido, como atrayentes de polinizadores (Ikan, 1991).

Las saponinas son glicósidos vegetales caracterizados por producir espuma en el agua cuando se mezclan y se remueven, lo que les ha valido su condición de jabones naturales y ha hecho que algunas plantas como la jabonera (*Saponaria officinalis*) fueran utilizadas como tal desde hace mucho tiempo. Entre las plantas ricas en saponinas se conocen a la hiedra (*Hedera helix*), el rusco (*Ruscus aculeatus*), el espárrago (*Asparagus officinalis*), la zarzaparrilla (*Smilax aspera*), la anagálide (*Anagallis arvensis*), la alfalfa (*Medicago sativa*), etc. (Ikan, 1991).

1.4 Necesidad de bioensayos

Otro problema en esta búsqueda es que, como ya se dijo, la gran mayoría de las plantas no se ha estudiado, de modo que hay un gran número de especies disponibles para ser investigadas y no sólo eso sino que también hay que contar con una amplia variabilidad intraespecífica y que a veces, hay que definir en qué órgano vegetal se concentran los componentes bioactivos, todo esto incrementa

notablemente las posibilidades de estudio. Así que autores como Zani *et al.*, (1995), Hostettmann, (1997) y Alves *et al.*, (2000) consideraron que es necesario desarrollar programas de evaluación de la actividad biológica de plantas para descubrir nuevos compuestos activos y que uno de los problemas es contar con bioensayos suficientemente sensibles para detectar sustancias activas presentes en los extractos en concentraciones muy bajas, en ocasiones en el orden de partes por millón (ppm), al mismo tiempo, los bioensayos deben probar un gran número de muestras con las réplicas necesarias para evaluar estadísticamente, también el bioensayo debe ser general, amplio para incluir diversos mecanismos de acción, conocidos o no, a nivel celular, fisiológico, bioquímico y molecular. Al evaluar a los extractos con un bioensayo como el descrito, se descarta a los extractos que hayan resultado inactivos, lo que reduce las posibilidades de la búsqueda; se continúa con los extractos activos, los cuales se separan por cromatografía; las fracciones se prueban, se descartan los inactivos, lo que sigue reduciendo las posibilidades; de ser necesario se recromatografían la o las fracciones activas hasta obtener sustancias puras activas. Éstas que fueron obtenidas con un bioensayo barato ahora son candidatos para probarse en sistemas más costosos, por ejemplo en cultivos celulares.

Meyer *et al.*, (1982), propusieron el uso de larvas de *Artemia salina* (Leach) (Crustaceae), un crustáceo pequeño de aguas salobres, como organismo de prueba en un bioensayo general para evaluar la actividad biológica de sustancias vegetales;

esto se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (Kanegusuku *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2001), el bioensayo con este crustáceo reúne todos los requisitos descritos en el párrafo anterior; los huevecillos de este organismo se pueden obtener fácilmente, eclosionan en 24 hrs en condiciones muy simples, sin asepsia ni medios de cultivo muy elaborados, obteniéndose una gran cantidad de larvas en las cuales pueden aplicarse extractos, fracciones o sustancias puras para evaluar su actividad biológica mediante la cuantificación de la mortalidad producida; en la propuesta se consideró que si una determinada sustancia en una cierta concentración produce efectos farmacológicos y que esa misma sustancia en concentraciones más elevadas produce efectos tóxicos, entonces la toxicidad, medida como la mortalidad producida a un organismo simple, como *A. salina*, puede ser utilizada como criterio para la detección y evaluación de actividad biológica en extractos vegetales y guiar su separación o fraccionamiento y purificación (McLaughlin *et al.*, 1998).

A partir de la propuesta de Meyer *et al.*, (1982), *A. salina* ha sido utilizada por muchos grupos de investigación para explorar extractos de plantas de diferentes regiones para detectar compuestos secundarios con actividad biológica relevante, así, Alves *et al.*, (2000) llevaron a cabo un estudio de exploración de 60 especies de la flora brasileña en la búsqueda de compuestos útiles para el control de enfermedades tropicales, para lo cual efectuaron bioensayos usando *A. salina*; encontraron que el 10% de las especies presentaron mortalidad significativa en ese

organismo, estas especies vegetales se seleccionaron para posteriormente aislar e identificar sustancias activas. Al comparar la toxicidad de extractos de plantas en *A. salina* con la actividad antibacteriana de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, (Zani *et al.*, 1995) encontraron correlación positiva entre ambas actividades, mientras que Franssen *et al.*, (1997) reportaron una correlación inversa y Wanyoike *et al.*, (2004) concluyeron que no había correlación. Tampoco hubo correlación entre la toxicidad en *A. salina* y la actividad antiviral de extractos de plantas de Turquía (Sökmen, 2001).

En otros estudios, la toxicidad producida por extractos de plantas en *A. salina* mostró correlación positiva con la actividad insecticida (Alkofahi *et al.*, 1989), toxicidad en ratones (Parra *et al.*, 2001), efecto hipoglicémico (Kanegusuku *et al.*, 2002) y actividad antibacteriana (De Rosa *et al.*, 1994); Awal *et al.*, (2004) encontraron toxicidad en *A. salina* y actividad antibacteriana de extractos de *Cassia alata* L. (Leguminosae); Abreu - Payrol *et al.*, (2001) observaron baja toxicidad en *A. salina* y ausencia de actividad antibacteriana de extractos del fruto de *Bromelia pinguin* L. (Bromeliaceae) y Yang *et al.*, (2001) aislaron una naftoquinona de extractos de *Impatiens balsamica* L. (Balsaminaceae) guiándose con el ensayo en *A. salina*, posteriormente esa sustancia presentó actividad antibacteriana. Así mismo, se ha reportado correlación positiva entre la toxicidad en *A. salina* y la citotoxicidad en células de carcinoma nasofaríngeo humano (McLaughlin *et al.*, 1998) y en diferentes líneas celulares de tumores humanos (Carballo *et al.*, 2002); inclusive la mortalidad en *A. salina* se empleó como guía

única para aislar e identificar sustancias que posteriormente mostraron citotoxicidad. Shimada *et al.*, (1997) encontraron que los extractos de frutos de *Serenoa repens* (Bart) Small (Palmae), planta usada popularmente para prevenir hiperplasia de próstata, causaron mortalidad en larvas de *A. salina*, el extracto se sometió a un fraccionamiento lo que condujo al aislamiento de l-monolaurina y l-monomirstina, compuestos que después exhibieron citotoxicidad en células tumorales prostáticas PC-3.

Actualmente los ensayos en *A. salina* se consideran una herramienta útil para la evaluación preliminar de la toxicidad de extractos de plantas, la detección de distintos tipos de actividad biológica y para aislar e identificar sustancias vegetales bioactivas.

2. ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES

El uso de las plantas medicinales es una de las actividades más antiguas del hombre y gran cantidad de especies han probado su eficacia empíricamente (Martín del Campo, 1976). Los primeros antecedentes sobre el uso de plantas medicinales se remontan a la prehistoria, se encuentran estudios realizados en Shanidar Irak con 60 000 años de antigüedad, en donde se encontraron restos de ocho especies de plantas posiblemente empleadas como medicina. También se han encontrado plantas en cuevas del Perú, con una edad aproximada de 45, 000 años. En refugios prehistóricos de Coahuila, México con una antigüedad de 8 000 años, se localizaron restos de peyote, mezcal y otras especies (Schultes, 1981).

El primer antecedente escrito pertenece a los Sumerios; en la cultura China, la medicina se practicó desde el año 2500 aC; los antiguos egipcios desarrollaron una rica tradición en herbolaria (Schultes, 1981). En la India también se elaboraron documentos escritos sobre plantas medicinales, los griegos realizaron estudios y empleaban plantas para uso medicinal (Porter, 1967; Schultes, 1981).

En Europa entre los siglos XVI y XVII, se difundió la idea de que las plantas o partes de las mismas, habían sido creadas para el beneficio del hombre, solo se debía observar cuidadosamente sus características para descubrir su utilidad médica. Otro antecedente importante de la época, fue el desarrollo de los jardines botánicos con un papel importante en relación con la medicina (Baker, 1968).

Los antecedentes que se tienen respecto al conocimiento medicinal de la flora mexicana se encuentran inmersos en las obras hechas por indígenas de México y en las crónicas y escritos elaborados por los cronistas españoles. De la variedad de documentos inmediatos a la conquista destacan cuatro obras fundamentales en la bibliografía médica mexicana, que son las siguientes:

El Códice de la Cruz – Badiano: obra redactada por Martín de la Cruz, médico indígena y traducido al latín por otro indígena Juan Badiano en 1552. La obra recibió el título de *Libellus de medicinalibus Indorum Herbis* (Lozoya, 1982; Argueta, 1994; Estrada, 1995; De la Cruz, 1996).

El Códice Florentino o Historia General de las Cosas de Nueva España: esta obra se publicó en 1582 fue realizada por Fray Bernardino de Sahagún (Lozoya, 1982; Argueta, 1994; Estrada, 1992, 1995).

Las Relaciones Geográficas del Siglo XVI: son textos de narraciones que describen la tierra americana y la vida de sus hombres, tocando una variedad de temas como la ubicación y contornos físicos de los pueblos, con su clima, distancias y vías de comunicación, con su fauna y flora y recursos naturales y, además, la vida y muerte de los habitantes, con sus costumbres, creencias y tradiciones, todos estos relatos comparten una estructura común debido a que son la respuesta plural a un cuestionamiento realizado por la administración española ordenado por Felipe II,

incluyen información acerca de plantas medicinales (Martínez, 1976; Lozoya, 1982; Argueta, 1994; Estrada, 1995).

Historia General de las cosas de La Nueva España 1571 – 1577: obra del protomédico Francisco Hernández, (Lozoya, 1982; Argueta, 1994; Estrada, 1995), recabó información de las características de las plantas medicinales, el lugar donde nacen, el clima y la forma de cultivo, hasta la indicación terapéutica, la dosis, la forma de empleo, la vía de aplicación, etc. (Lozoya, 1982; Argueta, 1994; Estrada, 1995; Márquez Alonso *et al.*, 1999).

En la primera mitad del siglo XX destaca la obra del maestro Maximino Martínez (1990) que contiene los conocimientos más completos sobre los usos de las plantas medicinales de México hacia esa época (Estrada, 1985).

En Hidalgo existen algunos antecedentes de estudios sobre plantas medicinales, entre ellos se encuentra el trabajo de García, (1981) donde estudió a las plantas medicinales de la vertiente sur de la Sierra de Pachuca; Espinosa (1985), investigó a las plantas medicinales de la Huasteca Hidalguense; Pérez-Escandón y Villavicencio (1995) publicaron una lista de plantas medicinales empleadas en diversas regiones del estado, Zamora y Barquin (1997) hicieron un registro de plantas de uso medicinal en la Sierra de Pachuca.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer y las enfermedades infecciosas son dos de las principales causas de mortalidad mundial por lo que es necesario contar con nuevas sustancias antineoplásicas y antinfectivas. Tomando en cuenta que la flora del estado de Hidalgo ofrece amplias posibilidades de hallazgo de sustancias bioactivas, debido a su diversidad florística estimada en unas 4000 especies vegetales (Villavicencio *et al.*, 1998) a la que se encuentra asociado un amplio conocimiento tradicional como lo evidencian las 417 especies de plantas medicinales reportadas, la mayoría de las cuales se emplean para padecimientos digestivos y respiratorios de posible origen infeccioso, así como para tratar heridas y llagas que podrían estar relacionadas con el cáncer, para el cual se registra el uso de unas veinte especies de plantas en la literatura (Pérez - Escandón *et al.*, 2003).

Debido a que los habitantes del municipio de Tepatepec, Hidalgo utilizan ampliamente la flora local para curar sus diversas enfermedades entre ellas el cáncer se decidió realizar un estudio para la búsqueda de antineoplásicos y antibacterianos vegetales. La selección del municipio se basa en que no existen antecedentes de estudios etnobiológicos en la zona y por que se encuentra ubicado en la parte sur del Valle del Mezquital, región en donde se asienta el grupo indígena hñahñú, los cuales cuentan con un gran conocimiento de las plantas debido a su uso tradicional. Lo que favorece la detección de las especies de plantas de interés, para el hallazgo de bioactividad en los extractos vegetales.

4. HIPÓTESIS

1. Si en Tepatepec, Hidalgo se utilizan plantas como tratamiento para cáncer, entonces los extractos y sustancias de estas plantas producirán efectos citotóxicos al aplicarlos *in vitro* a cultivos celulares de tumores humanos.
2. Si en Tepatepec, Hidalgo se utilizan plantas para tratar problemas de salud como apostemas, abscesos, ulceraciones, heridas y llagas, en los que pudiera haber infecciones bacterianas, entonces en pruebas *in vitro* los extractos de estas plantas presentarán actividad antibacteriana.
3. En el presente estudio se presenta una correlación positiva entre la toxicidad de los extractos en larvas de *A. salina* y la actividad citotóxica, antibacteriana y con el contenido de compuestos secundarios.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar las especies de plantas medicinales que son utilizadas en Tepatepec, Hidalgo para el tratamiento del cáncer y algunos padecimientos de posible origen infeccioso y recabar información acerca de sus usos, evaluar la actividad biológica de extractos y sustancias de esas especies, así como realizar un análisis fitoquímico preliminar.

5.1 Objetivos particulares

1. Determinar que especies de plantas medicinales son utilizadas en Tepatepec, Hidalgo para el tratamiento del cáncer y algunos padecimientos de posible origen infeccioso.
2. Determinar la actividad biológica de los extractos de las especies seleccionadas por toxicidad en 3 bioensayos: células HeLa (cáncer cervico uterino), bacterias y *Artemia salina*.
3. Aislar e identificar al principio activo, del extracto de la especie de planta que haya mostrado mayor citotoxicidad en células HeLa.
4. Realizar el estudio fitoquímico preliminar para encontrar alcaloides, flavonoides, triterpenos y saponinas, de los extractos de las especies de plantas medicinales registradas.
5. Determinar la correlación entre la toxicidad y los efectos citotóxicos, antibacterianos y el contenido de compuestos secundarios.
6. Elaborar fichas de cada especie de planta estudiada, con un resumen de los datos obtenidos en este estudio y los recabados en la revisión bibliográfica.

6. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El municipio de Tepatepec, por su extensión, ocupa el veintitreceavo lugar en el estado de Hidalgo. Forma parte de la provincia del eje Neovolcánico y de la subprovincia Llanuras y Sierras de Querétaro e Hidalgo. El sistema de topofomas que posee son Sierra que ocupa el 51.87% de la superficie municipal y Llanura que ocupa el 48.13% de la superficie municipal (INEGI, 1998). Se encuentra localizado en la zona del Valle del Mezquital. Sus coordenadas geográficas son; al norte 20°17'; al sur 20°10'; al este 99°00', al oeste 99°09' y con una altitud promedio de 1960 metros sobre nivel del mar (msnm). Tepatepec tiene una superficie de 95.10 km² por lo que representa el 0.29% del estado. Colinda al norte con los municipios de Mixquiahuala de Juárez y San Salvador, al este con el municipio de San Salvador; al sur con el municipio de Ajacuba, al oeste con los municipios de Ajacuba y Mixquiahuala de Juárez (INEGI, 1998). Tepatepec proviene de la palabra náhuatl Tepaltepetl, que significa Cerro de pedernales, este municipio tiene como lengua mater el Hñá Hñu y como lengua oficial el castellano, cabe mencionar que actualmente son pocas las personas en las que prevalece esta lengua mater (INEGI, 1998). Actualmente el municipio cuenta con 30,000 habitantes.

La división política está conformada por Tepatepec como cabecera municipal con latitud norte de 20° 15', longitud oeste de 99° 05' y altitud 1 960 msnm, San Juan Tepa con latitud norte de 20°13', longitud oeste de 99°04' y altitud de 2 000 msnm, El Rosario con latitud norte de 20°15', longitud oeste 99°02' 1980 msnm de altitud, Lázaro Cárdenas "El Mexe", latitud norte 20°13', longitud oeste 99°06' y 2 000 msnm,

Dengantzha con 20°16' de latitud norte, 99°07' longitud oeste y 2 000 msnm y el Mendoza 2 000 msnm (INEGI, 1998). La ubicación en Hidalgo y la división política del municipio de Tepatepec, se presenta en la figura 1.

El clima que predomina es semiseco templado con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 14.8°C, la máxima ocurre en mayo con 17.3°C y la mínima en noviembre con 9.4°C. la precipitación total anual es de 543.4 mm, la precipitación mínima ocurre en enero con 8.8 mm (INEGI, 1998).

Para el municipio de Tepatepec se describen los siguientes tipos de vegetación (figura 2); bosque de encino que ocupa el 6.92% de la superficie municipal en el cual alberga *Quercus laurina* (encino manzanilla) y *Quercus crassifolia* (hoja ancha), también cuenta con matorral crasicaule que ocupa el 30.13% de la superficie municipal en el que se encuentra *Flourensia resinosa*, *Juniperus* sp., *Yucca filifera* (palma) (figura 3), *Prosopis laevigata* (mezquite) y *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo) (figura 4) (INEGI, 1998).

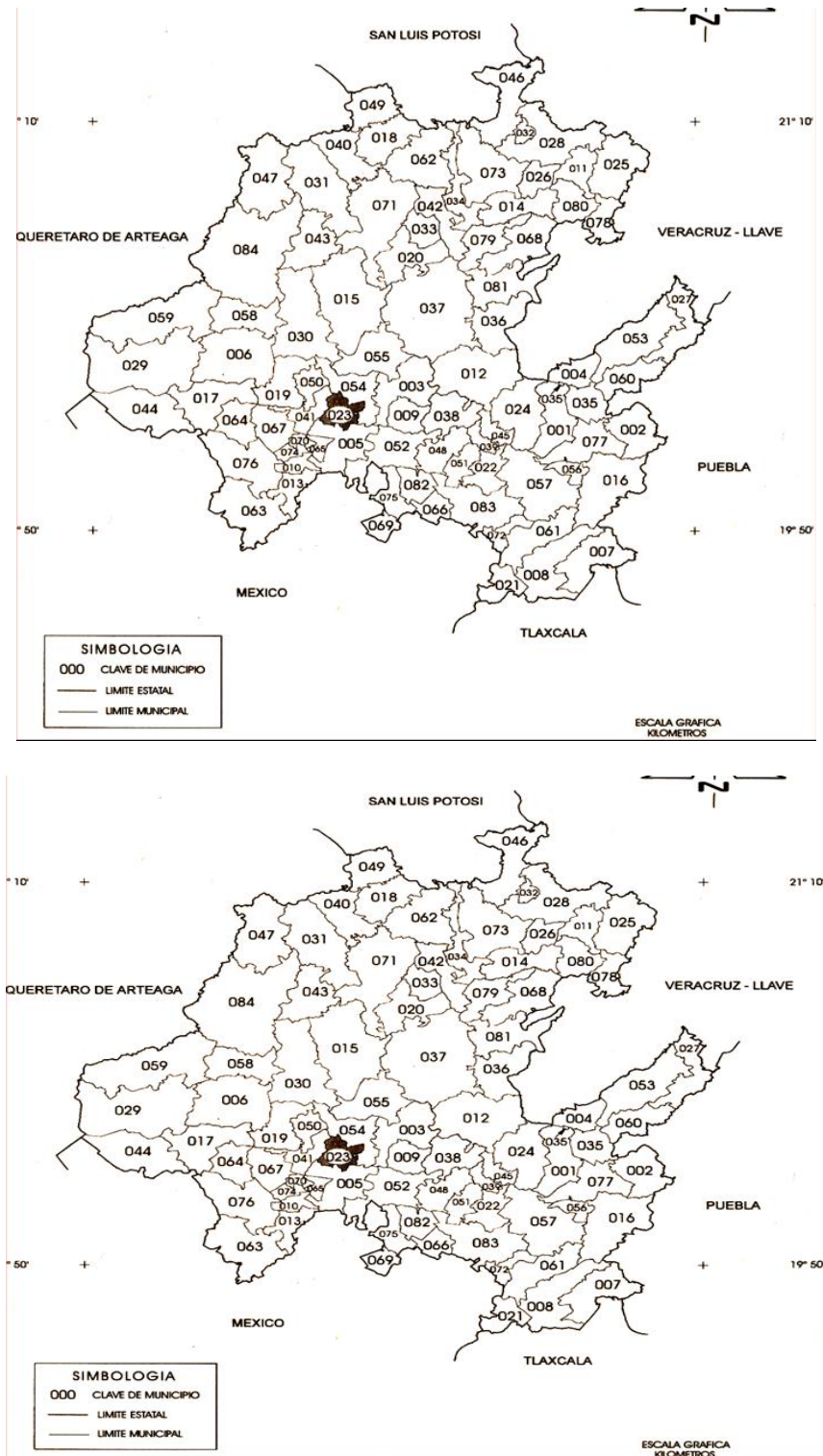


Figura 1. Ubicación en Hidalgo y división política del municipio de Tepatepec.

Información INEGI, 1998.

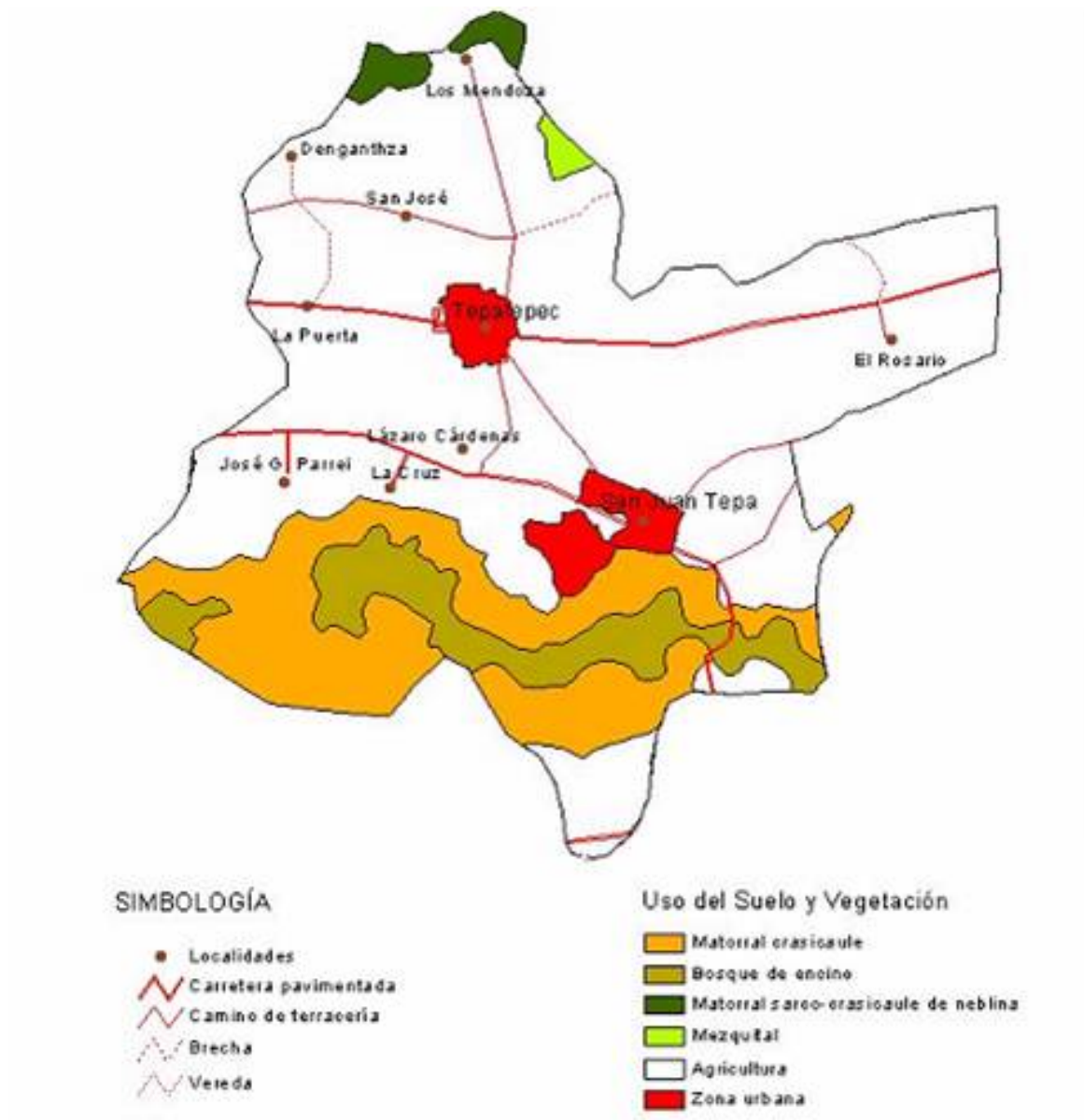


Figura 2. Vegetación y uso potencial del suelo del municipio de Tepatepec.



Figura 3. Yucca filifera (palma)



Figura 4. Prosopis laevigata (mezquite) y Myrtillocactus geometrizans (garambullo).

7. METODOLOGÍA

7.1 Entrevistas

Para determinar las especies de plantas que se utilizan en Tepatepec, Hidalgo para el tratamiento del cáncer y de problemas de salud de origen infeccioso, se hicieron entrevistas a los habitantes del área. La muestra estudiada correspondió a los habitantes de La Cruz, Lázaro Cárdenas, San Juan Tepa, El Mendoza y el centro de Tepatepec.

La definición de la muestra no fue al azar por lo que se hizo un muestreo no probabilístico, intencional, con informantes estratégicos, con disposición a colaborar.

Las entrevistas se hicieron en los meses de enero, febrero, abril y septiembre del año 2003 así como en los meses de febrero y junio del 2004. En total se hicieron 42 entrevistas semiestructuradas y 42 estructuradas por medio de un cuestionario (ANEXO1) (Hernández, 1985; Alexiades, 1996; García Fernando *et al.*, 2000), empleando preguntas abiertas y cerradas en relación con el tema de interés.

7.2 Colecta, identificación y elaboración del listado de especies.

Con base en la información obtenida en las entrevistas y solicitando la colaboración de los informantes se llevó a cabo la colecta por triplicado de las siete especies registradas que fueron; *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk (tallos y hojas) se colectó en maduración, *Marrubium vulgare* L (tallos, hojas y flores) se colectó en floración, *Pinaroppapus roseus* Less (toda) se colectó en floración, *Ambrosia*

psilostachya DC (toda) se colectó en maduración, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers (ramas con hojas e inflorescencias) se colectó en floración, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* (toda) se colectó en floración y *Plumbago pulchella* Boiss (toda) se colectó en floración. Las muestras se prensaron, secaron e identificaron por medio de claves (Standley, 1920 -1926, Rzedowski y Rzedowski, 2001). Una vez identificadas las especies, se elaboró un listado con información adicional acerca de su uso.

Un tanto de los ejemplares se depositó como referencia en el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en el Laboratorio de Etnobotánica de la misma institución. También se colectaron muestras de aproximadamente 0.5 kg de las especies de *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Marrubium vulgare* L., *Pinaroppapus roseus* Less, *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* y *Plumbago pulchella* Boiss para la obtención de extractos para realizar las pruebas programadas.

7.3 Preparación de extractos

Las muestras vegetales colectadas de *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Marrubium vulgare* L. *Pinaroppapus roseus* Less, *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* y *Plumbago pulchella* Boiss, se secaron a temperatura de laboratorio (20 – 25°C) para preparar los extractos.

Las muestras secas de cada especie vegetal de *Decatropis bicolor* (Zucc). Radlk (tallo y hojas), *Marrubium vulgare* L (tallo, hojas y flores), *Pinaroppapus roseus* Less (tallo y flores), *Ambrosia psilostachya* DC (tallo y hojas), *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers (tallo, hojas y flores), *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* (tallo y raíz) y *Plumbago pulchella* Boiss (tallos y hojas), se trituraron en un molino eléctrico. Se pesaron 50 gr de cada muestra y se extrajeron en Soxhlet (figura 5), durante ocho horas, utilizando 200 ml de etanol absoluto. Para determinar la concentración de los extractos se pesó el residuo obtenido después de evaporar a sequedad una muestra de volumen conocido. Los extractos se almacenaron en refrigeración a 0°C, hasta su uso (Harborne, 1973; Ikan, 1991).



Figura 5. Obtención de extractos en Soxhlet

7.4 Citotoxicidad

Para llevar a cabo las pruebas de citotoxicidad se seleccionaron de las siete especies registradas sólo las tres especies de plantas que son utilizadas específicamente en la zona de estudio para tratar al cáncer de matriz. Esta selección se hizo porque las pruebas se llevarían a cabo en células HeLa de cáncer cérvico uterino. Estas especies fueron *Plumbago pulchella*, *Decatropis bicolor* y *Jatropha dioica* var. *dioica*.

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos etanólicos de estas plantas, así como de la fracción de la especie que resulte más activa, se siguió el método empleado por López *et al.*, (2002) en el que se utiliza un cultivo de la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa mantenido en medio DMEM (Dulbecco's Modified Tagle Médium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. En las pruebas se utilizaron placas de 96 pozos, en donde se sembraron 5000 células HeLa por pozo, en 100 µl de medio con 10% de suero fetal bovino, éstas se trataron con los extractos etanólicos de las plantas en diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µl extracto/100 µl de medio); la fracción o sustancia de la especie vegetal se probaron en concentraciones de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 µg/ml. Los cultivos fueron incubados en las condiciones mencionadas y a diferentes tiempos, 12, 24 y 48 hrs, se determinó la citotoxicidad mediante la estimación de la viabilidad celular con la técnica de cristal violeta, para lo cual las células se fijaron con etanol al 70% durante cinco minutos, luego a cada pozo se añadió cristal violeta al 1% disuelto en agua, diez minutos después se

agregó ácido acético al 33%, se midió la absorbancia a 570 nm (DO_{570}) en un lector de ELISA. Las pruebas se realizaron con seis a siete concentraciones por triplicado en tres experimentos independientes utilizando el mismo extracto.

Con los datos obtenidos al medir la DO_{570} se calculó el porcentaje de viabilidad como $100B/A$ donde A y B fueron los valores promedio de DO_{570} de las células no tratadas y tratadas respectivamente. Con los valores porcentuales de viabilidad celular se elaboraron gráficas dosis-efecto con el programa Kaleidagraph 3.6.4, sobre las curvas obtenidas se estimó la concentración inhibitoria 50% (CI_{50}), que se define como la concentración de los extractos y fracciones que reduce la viabilidad de las células tratadas al 50% respecto de la de las células no tratadas. La estimación de la CI_{50} se hizo con este mismo programa, el cual tiene una herramienta que sobre la gráfica elaborada toma un punto en el eje Y, en este caso el de 50%, y traza una línea horizontal hasta intersectar a la curva y a partir de ese punto traza otra línea vertical hasta intersectar al eje X, el valor de ese punto se interpreta como CI_{50} .

Así mismo, para detectar cambios citológicos, los cultivos se observaron en un microscopio invertido Zeiss y se fotografiaron usando una película Kodak Plus X Pan.

7.5 Obtención del principio activo de *Plumbago pulchella*

Una vez que se encontró que *Plumbago pulchella* fue citotóxica se decidió obtener el principio activo para lo cual se pesaron 50 gr. de hojas secas de

P. pulchella, previamente trituradas en un molino, y se extrajeron en Soxhlet durante ocho horas, utilizando 200 ml de hexano. El extracto se secó con 20 gr de sulfato de sodio anhidro, éste se eliminó por filtración y el volumen se redujo en baño María, así se obtuvo un residuo oscuro que se recrystalizó en etanol: agua 1:1 produciendo un sólido en forma de agujas de color amarillo naranja (0.87 gr). La pureza de la sustancia se comprobó en cromatografía de capa fina de gel de sílice G, eluyendo con hexano: acetato de etilo 3:1, se obtuvo una sola mancha (R_f 0.87) observada en luz visible.

Se determinó el punto de difusión de las agujas utilizando un equipo Fisher.

La sustancia obtenida se disolvió en etanol y se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a masas, el cromatógrafo usado fue Perkin Elmer mod. 410 con detector UV de arreglo de diodos Applied Biosystem mod. 20005, con una columna capilar de 30 mm x 0.25 mm con metil fenil silicón 5% y fase móvil de gas helio con flujo de 1.0 ml/min; se utilizó la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV para el espectro de masas Hewlett Packard mod 5890 A. El espectro de masas obtenido se comparó con los de la biblioteca del equipo para identificar a la sustancia. Además del compuesto obtenido disuelto en metanol se obtuvo el espectro de UV/vis con un equipo Perkin Elmer Lambda 25.

También se obtuvo el espectro de IR en una pastilla de KBr en un equipo Perkin Elmer System 2000.

7.6 Actividad antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana de los siete extractos etanólicos de *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Marrubium vulgare* L, *Pinaroppapus roseus* Less, *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* y *Plumbago pulchella* Boiss, se empleó el método de inoculación por estría propuesto por Mitscher *et al.*, (1972) y modificado por Cáceres *et al.*, (1990) como parte del Programa de Investigación Científica Aplicada y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe conocido como TRAMIL (TRAditional Medicine in the IsLands). Para la prueba se utilizaron las siguientes cepas de bacterias: *Escherichia coli* ATCC 53868, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhimurium* que fue aislada en el laboratorio de genética microbiana del departamento de microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN las cuales fueron mantenidas en agar Muller Hinton en refrigeración. Se tomó una muestra de estas bacterias con un asa microbiológica para ser reactivadas y preparar los inóculos para la prueba. La muestra de cada bacteria se sembró en 25 ml de Caldo de Soya Tripticasa Difco previamente esterilizado en autoclave. Estos inóculos se incubaron en una estufa a 37°C por 24 hrs, al cabo de este tiempo se midió la turbidez de los inóculos a 540 nm en un espectrofotómetro UV – Vis JanWay 6405, la turbidez se ajustó con Caldo Soya Tripticasa esterilizado al patrón de la escala de MacFarland que equivale a una concentración de 1.5×10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colonias/mililitro).

La escala de MacFarland relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato de bario que se obtienen al mezclar cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% con el número de bacterias presentes en la muestra (Díaz *et al.*, 2003).

Se utilizaron cajas de Petri de 6 cm de diámetro para preparar placas de agar Muller Hinton conteniendo los extractos etanólicos en diluciones seriadas dobles a 250, 500 y 1000 µg/ml, para esto se utilizó un matraz erlenmeyer en donde se mezcló una cantidad determinada del extracto en cuestión con el medio de cultivo a 45°C para dar la concentración deseada, después se pipetearon 5 ml de la mezcla en cada caja de Petri. Cada caja se consideró una réplica, se prepararon tres réplicas por cada concentración.

Se preparó un testigo positivo que contenía agar Muller Hinton con 30 µl/ml de tetraciclina, la selección de este antibiótico se basó en el reporte de Alves *et al.*(2000). También se preparó un testigo negativo que únicamente contenía al medio de cultivo, cada testigo se preparó por triplicado.

Para hacer la inoculación de las cajas se procedió de la siguiente manera. Con un asa microbiológica se tomó una muestra de cada inóculo que se sembró por estría en la superficie del agar siguiendo un patrón radial, de tal forma que cada caja de Petri tenía tres estrías, una estría por bacteria. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs. Al cabo de ese tiempo las cajas se observaron y se determinó la actividad antibacteriana de los extractos mediante la evaluación del crecimiento bacteriano, lo

que se hizo por comparación con el crecimiento en los testigos al cual se asignaron arbitrariamente valores inversos empleando la escala de 0, 1, 2, 3. Como en las estrías del testigo negativo se observó el máximo de crecimiento bacteriano, se le dió valor 0, en los extractos vegetales en los que se observó un crecimiento similar al del testigo negativo se le dio este mismo valor 0 y se consideraron inactivos. Mientras que en las estrías del testigo positivo con antibiótico hubo inhibición completa del crecimiento, en las tres cepas, a esto se asignó valor 3, a los extractos que produjeron inhibición del crecimiento bacteriano similar a la del testigo positivo se les dio este mismo valor 3 y se tomaron como muy activos. En esta evaluación también se consideraron valores intermedios, 1 o 2, dependiendo de la intensidad del crecimiento, entonces los resultados se expresaron como: 0 inactivo; 1 parcialmente activo; 2 activo; 3 muy activo.

7.7 Toxicidad en *Artemia salina*

Para llevar a cabo la evaluación de la toxicidad de los extractos de *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Marrubium vulgare* L, *Pinaroppapus roseus* Less, *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* y *Plumbago pulchella* Boiss, se usaron larvas de *Artemia salina*, siguiendo el método de Meyer *et al.*, (1982) y McLaughlin *et al.*, (1998). Se utilizaron huevecillos o quistes de *Artemia salina* que se adquirieron en un criadero de peces. Para lograr la eclosión de los huevecillos, éstos se pusieron en una solución acuosa de NaCl 1% con un pH de 7.5 a 8.0, la temperatura de la solución se mantuvo entre 20 y 30° C por lo cual se utilizó un calentador de

acuario, también se oxigenó e iluminó en forma continúa con ayuda de una bomba para acuario y un foco de 75 watts encendido. Los huevecillos eclosionaron en aproximadamente 24 hrs. Las larvas recién emergidas fueron las que se utilizaron en la prueba de toxicidad.

Se emplearon cada uno de los extractos etanólicos que se obtuvieron de cada especie vegetal. Para esta prueba los extractos se prepararon como sigue. En un vaso de precipitado se colocó un volumen conocido del extracto etanólico en cuestión, este se evaporó a 45° C, al residuo se le añadió la cantidad necesaria de solución salina 1% para obtener una mezcla acuosa del residuo etanólico a una concentración de 2 µl/ml, a partir de la cual se hicieron las diluciones necesarias con la solución salina para llevar a cabo la prueba. La prueba de toxicidad se desarrolló de la siguiente manera. En un tubo de ensayo de 5 ml se puso 1.0 ml del extracto preparado previamente, después, con una pipeta Pasteur se colocaron diez larvas de *A. salina*, el volumen se ajustó a 3.0 ml con la solución salina; cada tubo se consideró una réplica, preparándose cinco réplicas por concentración ensayada; inicialmente cada extracto se probó en tres concentraciones: 10, 100 y 1000 µg/ml. Los testigos negativos se prepararon de la misma manera, pero a éstos no se les adicionaron extractos. Los tubos destapados se colocaron en una gradilla la cual se colocó cerca del foco encendido (figura 6); 24 hrs después, a simple vista se contó el número de larvas sobrevivientes en cada tubo. Dependiendo de los resultados obtenidos en esta primera prueba y siguiendo el método de McLaughlin *et al.* (1998), cada extracto se probó en dos concentraciones más, seleccionando de entre las

siguientes: 5, 25, 50, 500, 2000 $\mu\text{g/ml}$, esto se hizo para probar cada extracto en cinco concentraciones y contar con cinco datos, que es el número mínimo requerido para aplicar el programa con el que se efectuó el siguiente cálculo. Con los datos obtenidos al probar cinco concentraciones por extracto se calculó la concentración del extracto a la cual se produjo la muerte del 50% de las larvas de *A. salina*, es decir la concentración letal cincuenta o CL_{50} con límites de confianza de 95%, esto se hizo con el método probit, empleando el programa SPSS 9.0. Se consideró que los extractos produjeron toxicidad en *A. salina* cuando presentaron una $\text{CL}_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.



Figura 6. Gradilla con tubos testigo y tubos que contienen extractos vegetales, ambos con *Artemia salina*.

7.8 Pruebas fitoquímicas preliminares

A las siete especies de plantas; *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk, *Marrubium vulgare* L, *Pinaroppapus roseus* Less, *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica* y *Plumbago pulchella* Boiss, se les hicieron pruebas fitoquímicas preliminares para detectar a los siguientes grupos de compuestos secundarios: alcaloides, flavonoides, triterpenos y saponinas. Según la metodología propuesta por Domínguez (1979), por que son los métodos disponibles y más generales.

Flavonoides

Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron los extractos etanólicos cuya preparación ya se describió. Se colocó 1 ml del extracto en cuestión en un tubo de ensayo de 5 ml, luego se colocó un trozo de una tira de magnesio, de aproximadamente 0.03 gr, después se adicionaron dos gotas de HCL concentrado. La formación de colores anaranjados, rojos, azules o violetas se tomaron como una reacción positiva para flavonoides.

El testigo se preparó de igual forma, sólo que en vez de extracto se colocó 1 ml de etanol. En la figura 7 se presenta el diagrama de flujo relativo a esta prueba.

Triterpenos

Para realizar esta prueba también se emplearon los extractos etanólicos. Se colocó 1 ml del extracto en un vaso de precipitado de 10 ml, en un baño de vapor, se

evaporó el disolvente y luego se añadió 1 ml de anhídrido acético: H_2SO_4 1:1 y 1 ml de cloroformo. La formación de colores rojos, rosas o azules se tomó como una prueba positiva para la presencia de triterpenos. El testigo se preparó de igual forma sólo que en lugar del extracto vegetal, se utilizó 1 ml de etanol.

En la figura 7 se presenta el diagrama de flujo que resume los procedimientos de la prueba.

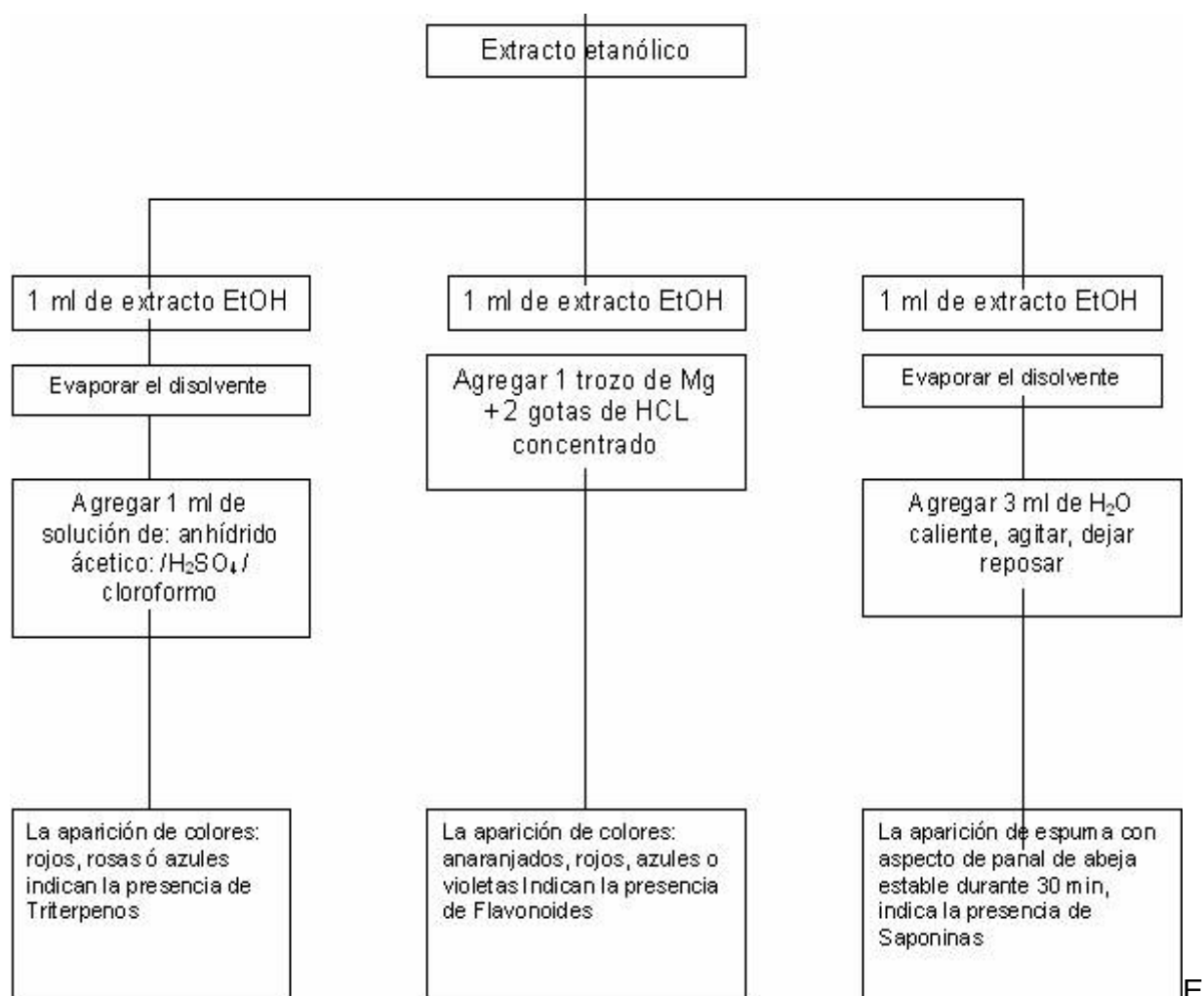
Saponinas

En esta prueba también se emplearon los extractos etanólicos. Se puso 1 ml del extracto en cuestión en un tubo de ensayo de 5 ml, el disolvente se evaporó sumergiendo la base de los tubos en baño María, luego, al residuo, se agregaron 3 ml de agua caliente (a unos 50°C) y el tubo se agitó vigorosamente. La formación de una capa de espuma, que permaneció estable por 30 minutos, se tomó como reacción positiva para la presencia de saponinas. Al testigo con etanol, se procesó de igual forma. En la figura 7 se muestra el diagrama de flujo de la prueba.

Para estimar la concentración de los compuestos secundarios se usó una escala arbitraria de 0 a 4; dependiendo de la intensidad de la reacción, a la concentración se asignaron los siguientes valores: 0 nula, 1 baja, 2 media, 3 alta, 4 muy alta.

Alcaloides

Para llevar a cabo esta prueba, en primer lugar se hizo un extracto metanólico con las muestras vegetales de cada especie, por lo cual se pesaron 3 gr de planta seca molida y se maceraron en un mortero con 10 ml de metanol, el extracto se filtró por gravedad con papel Whatman 1, el filtrado se aciduló con 1 ml de HCL 10%; luego se prepararon tres tubos de ensaye de 5 ml y en cada uno se añadió 1 ml del extracto acidulado; al primer tubo se agregó una gota de reactivo de Dragendorff; al segundo una gota de reactivo de Meyer y al tercero una gota del reactivo de Wagner; la formación de precipitados se tomó como prueba positiva para la presencia de alcaloides. También se prepararon tubos testigo a los que se añadió 1 ml de metanol acidulado y luego los reactivos. En la figura 8 se presenta un diagrama de flujo para ilustrar este procedimiento.



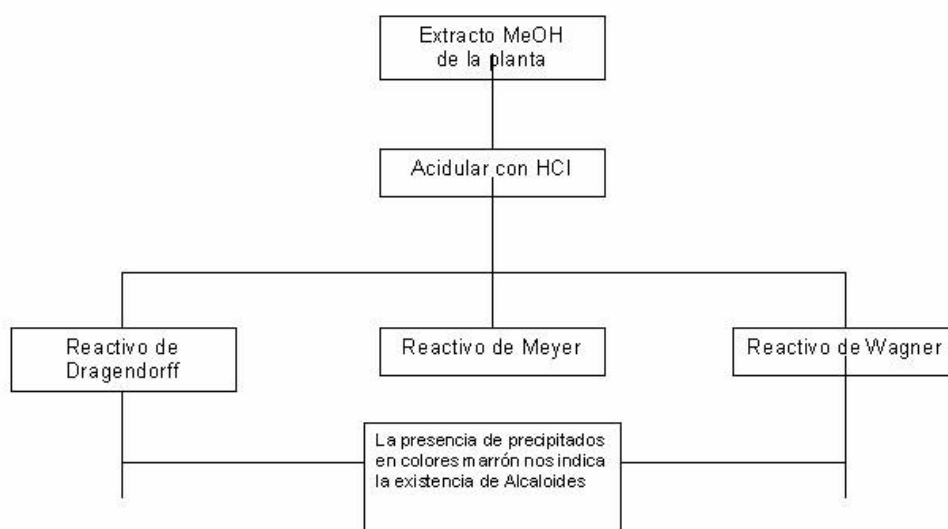
EtOH: etanólico.

HCl: ác. clorhídrico

H₂SO₄: ác. Sulfúrico

Mg: magnesio

Figura 7. Determinación de triterpenos, flavonoides y saponinas



MeOH: metanol

HCl: ác. Clorhídrico

Reactivo de Meyer: se prepara con cloruro de mercurio y yoduro de potasio + agua

Reactivo de Dragendorff: nitrato de Bismuto + ác. Nitríco + yoduro de potasio + agua

Reactivo de Wagner: yodo + yoduro de potasio + agua.

Figura 8. Determinación de alcaloides

7.9 Determinación de la correlación entre toxicidad y actividad citotóxica, antibacteriana y la concentración de alcaloides.

Para determinar la correlación entre la toxicidad en *Artemia salina* y la citotoxicidad en células HeLa, antibacteriana y la concentración de alcaloides, los datos se analizaron con el coeficiente de correlación de rango Spearman (Siegel, 1993).

7.10 Fichas por especie de planta

Se preparó una ficha para cada una de las especies vegetales detectadas en la presente investigación. En la ficha de cada planta se presenta el nombre de la familia botánica, nombre científico, nombre común, una breve descripción de la planta, la cual fue tomada de la literatura (Villavicencio y Pérez-Escandón, 1995; Rzedowski y Rzedowski 2001; Villavicencio *et al.*, 2002), usos de la planta recabados en las entrevistas, forma de preparación, resultados resumidos de la actividad biológica y del análisis fitoquímico preliminar obtenidos en este estudio, antecedentes de uso y análisis químico encontrados en la literatura y una fotografía de la planta.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Entrevistas

Al analizar la información recabada en las entrevistas aplicadas a habitantes de las comunidades de Tepatepec, Hidalgo, se encontró que en el área se usan principalmente siete especies de plantas como tratamiento para el cáncer y para la atención de problemas de salud de posible origen infeccioso, estas especies se identificaron como *Ambrosia psilostachya* DC, *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavón) Pers, *Pinaroppapus roseus* Less, *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var. *dioica*, *Marrubio vulgare* L, *Decatropis bicolor* (Zucc). Radlk. y *Plumbago pulchella* Boiss; (tabla 2).

Al analizar la información, también se encontró que la parte de la planta medicinal que más usan los habitantes para curar estos padecimientos son las hojas; luego el tallo, flores, raíz y las ramas (figura 9). La forma de preparación más frecuente es la infusión, cataplasma, pulverización de cualquier parte de la planta (figura 10) y la vía de administración a la que más se recurre es por vía local; luego la vía oral y otras (figura 11).

Tabla 2: Lista de especies usadas para tratar al cáncer en Tepatepec, Hidalgo

FAMILIA/especie nombre común	Afecciones tratadas	Parte utilizada								Forma de preparación	Administración		
		rz	ta	ho	fl	fr	se	ra	or		lo	ot	
ASTERACEAE													
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC. Altamisa, hierba amargosa.	Tumor, dolor de estómago	x	x	x	x					Cataplasma		x	
ASTERACEAE Baccharis salicifolia (Ruiz & Pavón) Pers. Jarilla	Heridas,susto, infección		x	x	x					Infusión		x	x
ASTERACEAE <i>Pinaroppapus roseus</i> Less. Espul, ispul	Cáncer					x				Infusion	x		
EUPHORBIACEAE <i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i> Sangre de grado	Cáncer de matriz, heridas, dolor de dientes, úlceras	x	x							Cataplasma e infusión, masticar y aplicar látex	x	x	
LAMIACEAE <i>Marrubio vulgare</i> L. Marrubio	Cáncer, heridas		x	x						Infusión	x	x	
PLUMBAGINACEAE <i>Plumbago pulchella</i> Boiss. Pañete	Cáncer de matriz, heridas, caries, úlceras					x				Infusión	x		
RUTACEAE <i>Decatropis bicolor</i> (Zucc). Radlk. Arantho	Cáncer de matriz, heridas, calculos de la vesícula, tos.			x						Infusión y pulverizar	x	x	

rz, raíz; ta, tallo; ho, hoja; se, semillas; ra, ramas. or, oral; lo, local; ot, otros.

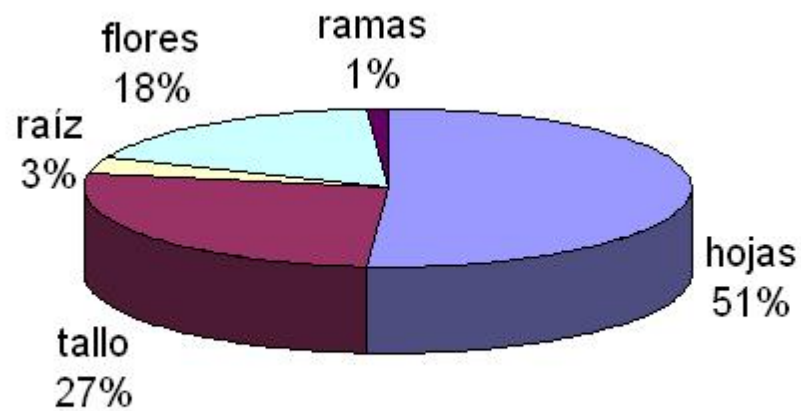


Figura 9. Frecuencia de uso de las distintas partes de la planta.

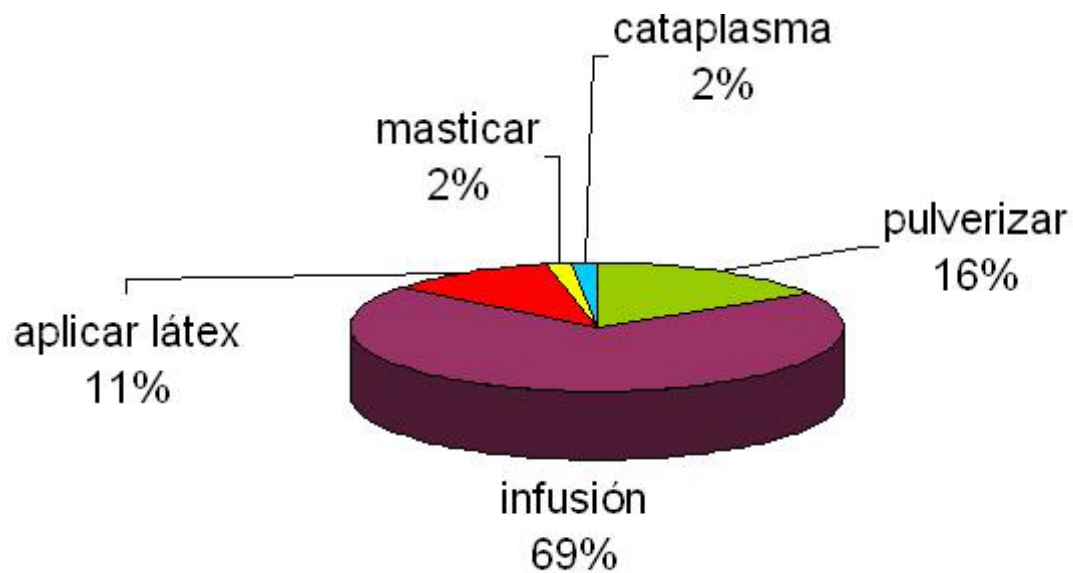


Figura 10. Frecuencia de forma de preparación de las plantas medicinales.

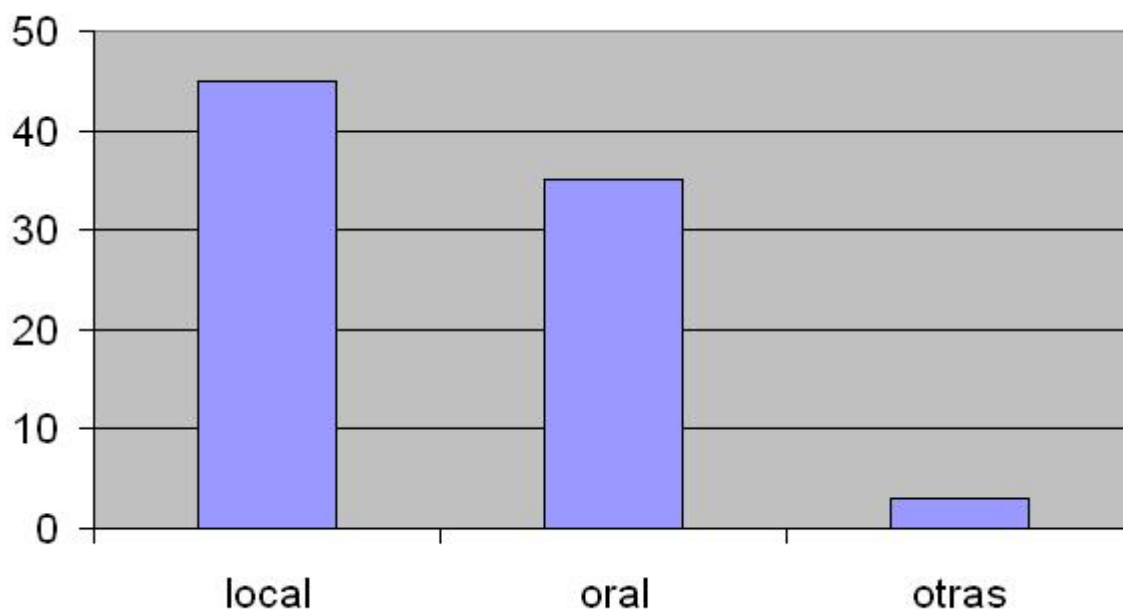


Figura 11. Frecuencia de la forma de administración de las plantas medicinales.

8.2 Efectos citotóxicos

En el municipio de Tepatepec se emplean tres especies de plantas para tratar el cáncer de matriz que son *P. pulchella*, *D. bicolor* y *J. dioica* var. *dioica* dichas especies se usaron para probar el efecto citotóxico de sus extractos etanólicos en la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa. El extracto de *P. pulchella* redujo la viabilidad celular, lo que significa que produjo citotoxicidad. Como se observa en la figura 12, en el tratamiento de 12 hrs se presentó pérdida de viabilidad a partir de la segunda concentración del extracto, 0.1 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ de medio, luego con la cuarta concentración, 0.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, se obtuvo un decremento lineal hasta 62% de viabilidad, el efecto máximo, 52% se alcanzó en la concentración del extracto de 2 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ de medio.

En un tiempo de exposición de 24 y 48 hrs el decremento de la viabilidad fue mayor, decreció linealmente hasta el 37% con 0.2 μ l de extracto, a partir de ahí la viabilidad se mantuvo constante hasta alcanzar el 29%. La pérdida de viabilidad celular dependió de la concentración del extracto y del tiempo de exposición.

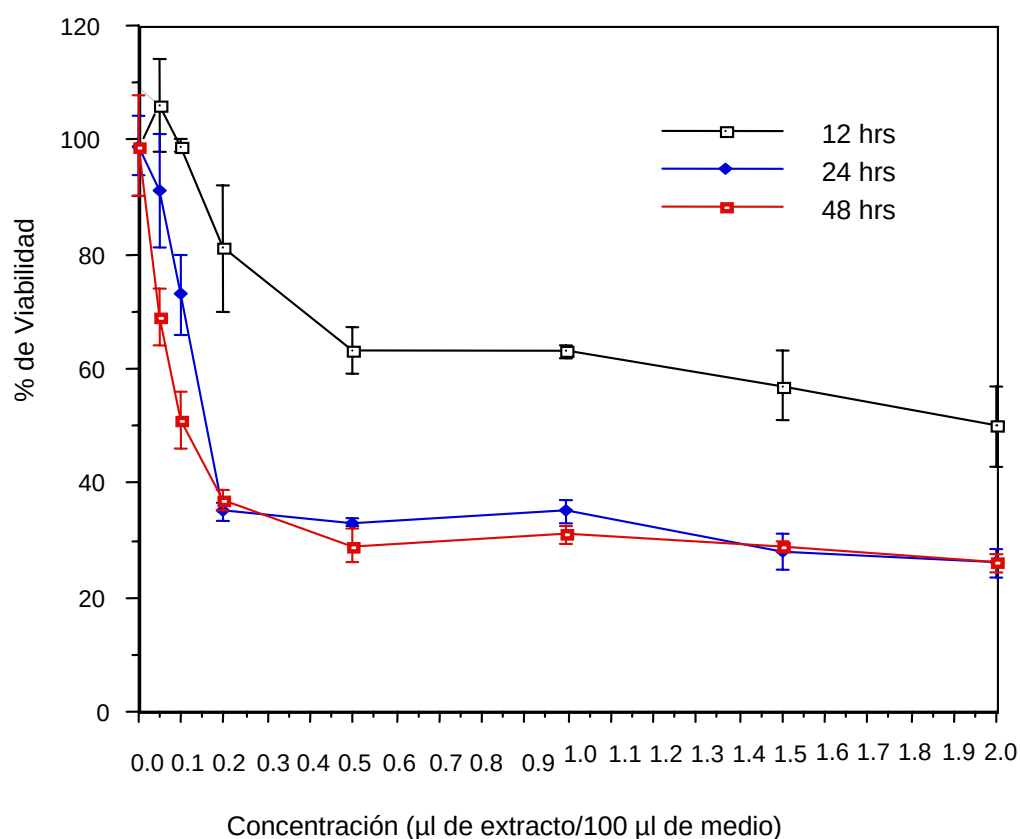


Figura 12. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Plumbago pulchella* durante 12, 24 y 48 hrs. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Cada una de las barras representan la desviación estándar.

Los extractos que no redujeron la viabilidad de las células HeLa fueron los de *D. bicolor* y *J. dioica* var. *dioica* por lo que las gráficas obtenidas no se muestran.

A partir de las curvas dosis-efecto obtenidas se calcularon las CI_{50} . Los resultados correspondientes se presentan en la tabla 3, donde se aprecia que el extracto de *P. pulchella* presentó las CI_{50} de 19.5, 1.5 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ a 12, 24 y 48 hrs respectivamente. De la misma manera los extractos de *D. bicolor* y *J. dioica* var. *dioica* no redujeron la viabilidad celular por lo que las CI_{50} se reportan como no determinados.

Tabla 3. CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de los extractos y fracciones vegetales a la que se reduce al 50% la viabilidad de las células HeLa. Los resultados que se muestran son el promedio de tres experimentos.

Extracto de; o fracción	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$		
	12 h	24 h	48 h
<i>Plumbago pulchella</i>	19.5	1.5	1.0
<i>Decatropis bicolor</i>	nd	nd	nd
<i>Jatropha dioica</i> var. <i>dioica</i>	nd	nd	nd
Plumbagina	ne	4.6	0.66

nd: no determinado, ne: no ensayada.

8.3 Identificación del compuesto activo de *Plumbago pulchella*

Debido que el extracto de *P. pulchella* fue el que produjo citotoxicidad, se optó por continuar con el estudio de esta especie de cuyos tallos y hojas se obtuvo una sustancia. El compuesto aislado de *P. pulchella* fue identificado como plumbagina, 5-hidroxi-2 metil-1,4-naftoquinona. La identificación se basó en los siguientes resultados. El punto de fusión de la sustancia aislada de *P. pulchella* fue de 76-77°C, idéntico al reportado por Kincl y Rosenkranz, (1956) y en The Merck Manual (1997). En la figura 13 se muestra la estructura química y fotografía de los cristales de la plumbagina.

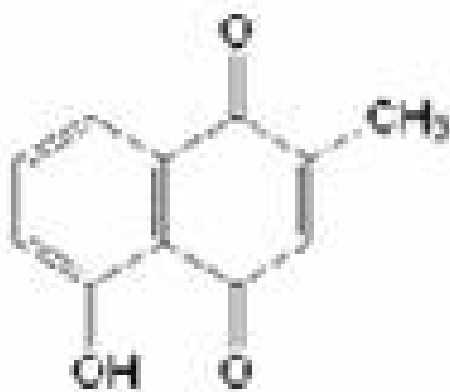


Figura 13. Estructura química y fotografía de los cristales de la plumbagina.

En la figura 14 se muestra el cromatograma de la plumbagina; se observa una sola señal con un tiempo de retención de 30.68 min., lo que es una evidencia de la pureza de la sustancia; en la figura 15 se muestra el espectro de la plumbagina obtenida que coincide con el espectro de la plumbagina de la biblioteca del equipo el cual se muestra en la misma figura 15, de acuerdo con lo anterior el peso molecular de la sustancia obtenida fue de 188. Los datos de los espectros de UV (figura 16) y de IR (figura 17) fueron: UV(MeOH) nm: 208, 260, 412; IR ^{KBr} cm⁻¹: 1660, 1640, 1455, 1365, 1330, 1260, 1230, 1160, 900, 830, 750. Se encontró que estas señales son idénticas a las de la plumbagina reportadas en la literatura (Kamal *et al.*, 1983; Sadtler, 1987).

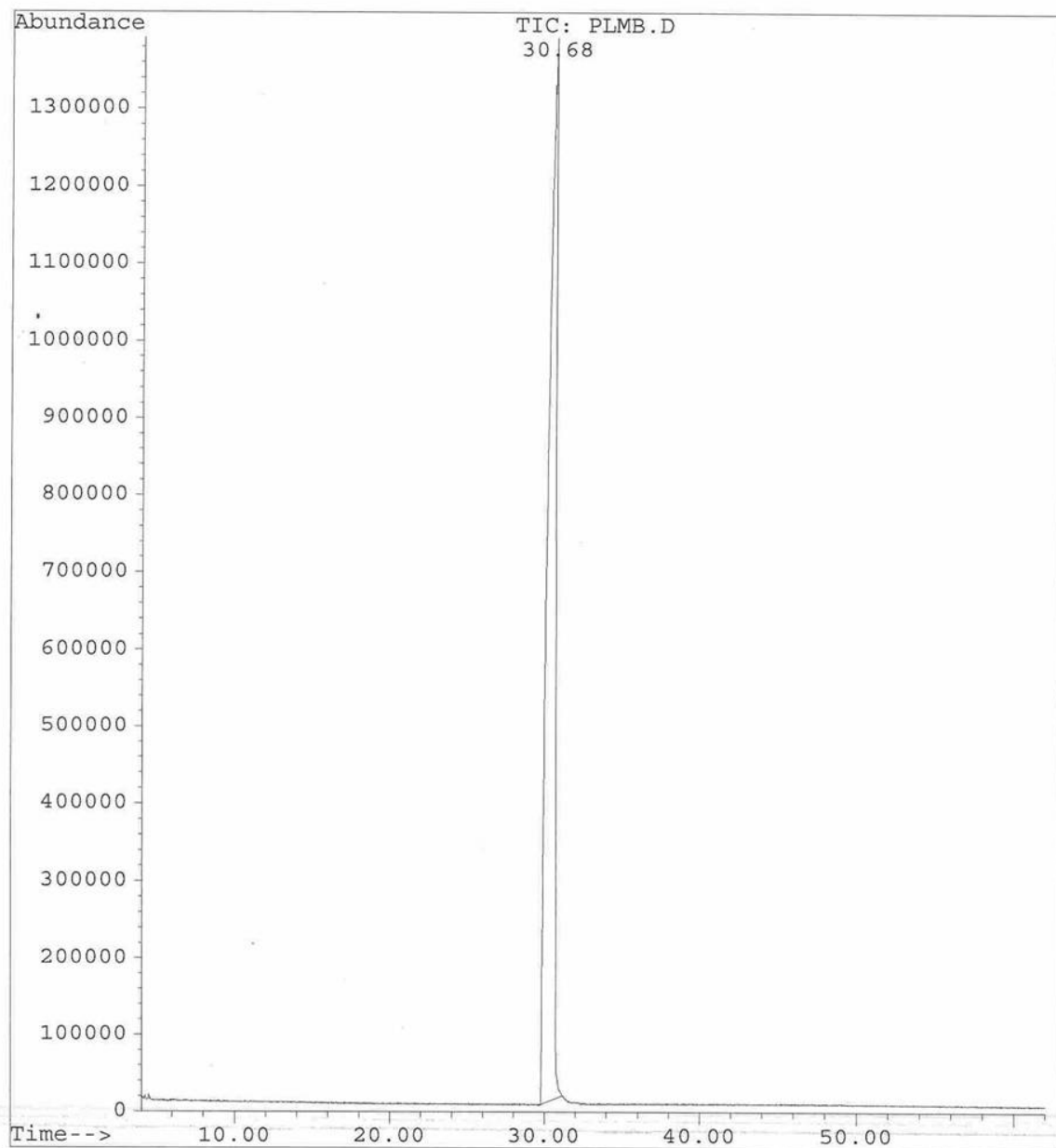


Figura 14. Cromatograma de gases de la plumbagina.

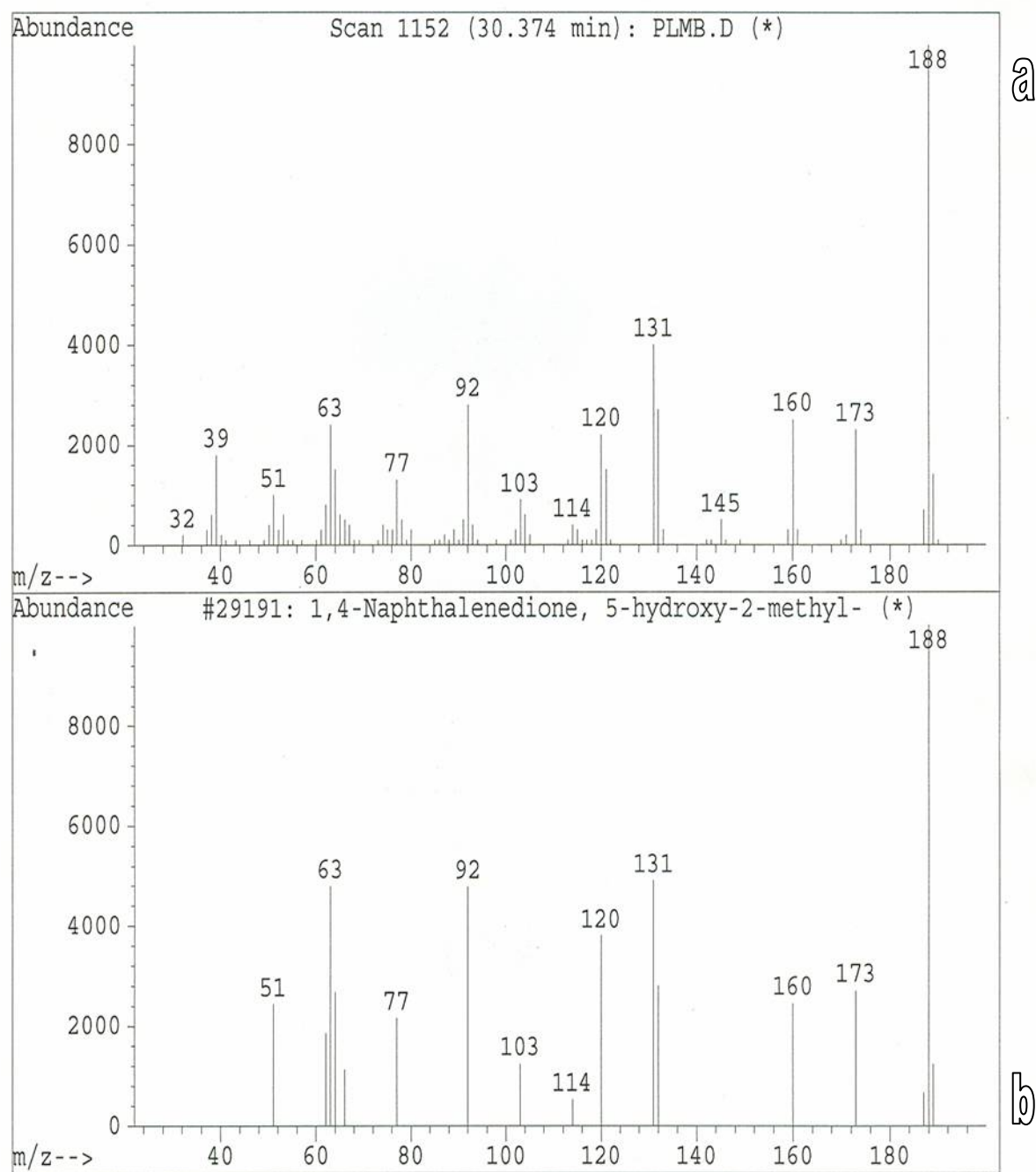


Figura 15. Espectro de masas de la plumbagina (a) comparado con un espectro de la misma sustancia de la biblioteca digital del equipo (b).

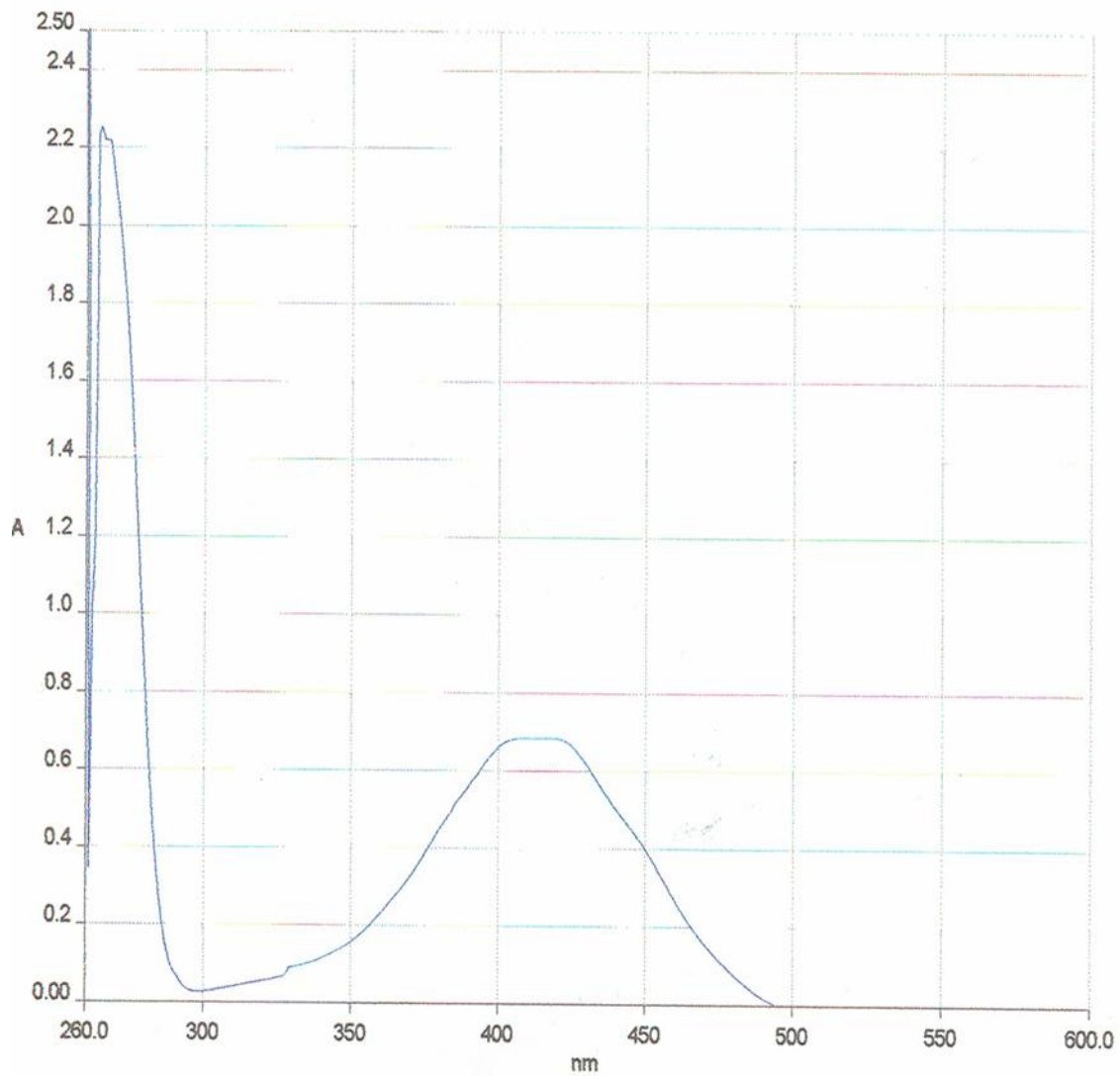


Figura 16. Espectro de ultravioleta de la plumbagina.

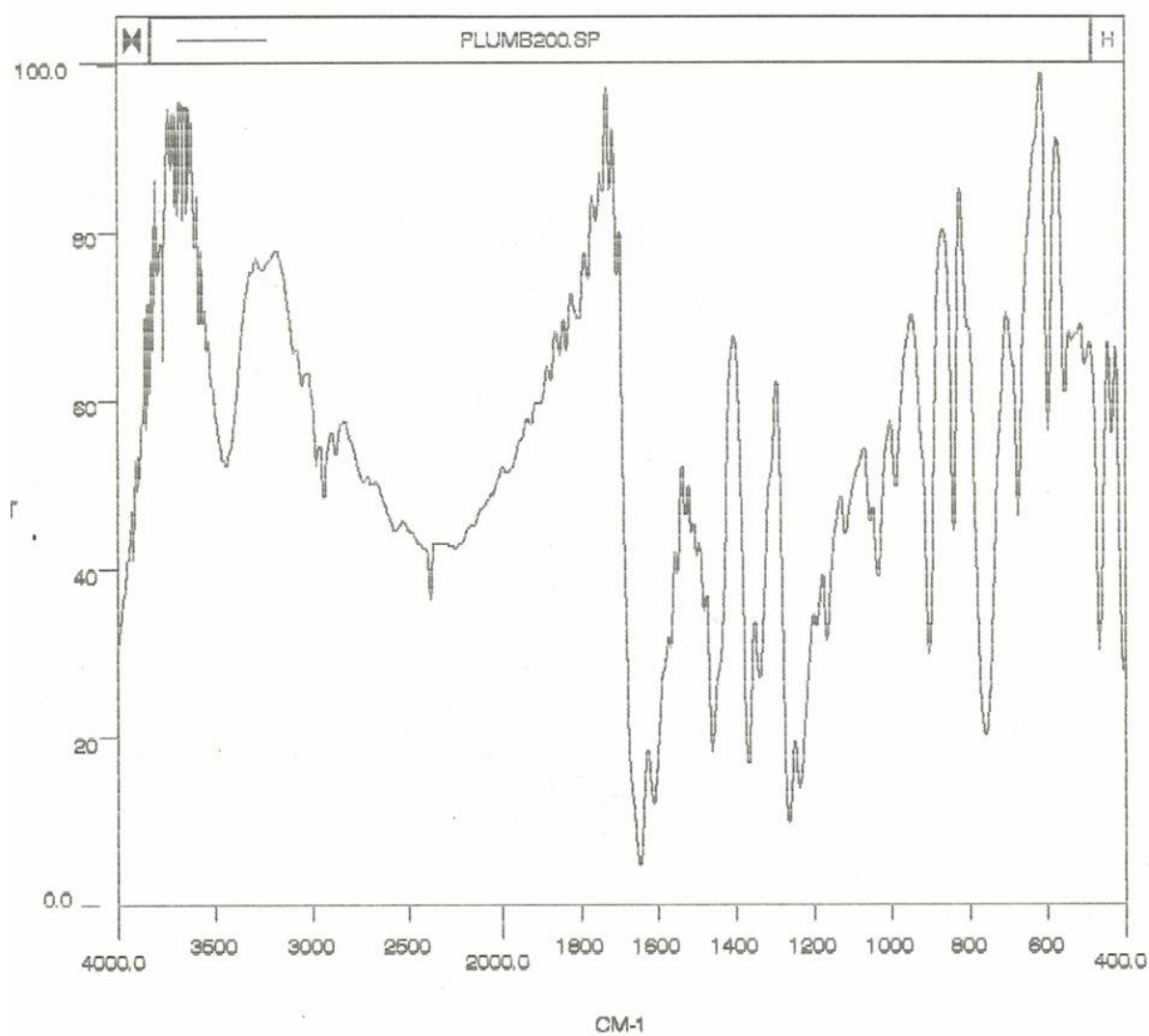


Figura 17. Espectro de Infrarrojo de la plumbagina.

8.4 Efecto citotóxico de la plumbagina

Se decidió ensayar la plumbagina en cultivos de células HeLa para comprobar si ésta era la que produjo el efecto citotóxico. Como se aprecia en la figura 18, la plumbagina produjo una reducción de la viabilidad celular, dicha reducción dependió de la concentración y del tiempo que estuvo en exposición. Esta pérdida de viabilidad se presentó a partir de la primera concentración en un periodo de 24 y 48 hrs. En el tratamiento expuesto a 24 hrs se observó un decremento continuo de la viabilidad hasta llegar a 40% con 6 µg/ml. En el tratamiento de 48 hrs la viabilidad se redujo a partir de la primera concentración hasta el 18% donde se mantuvo estable hasta la última concentración ensayada.

Las CI_{50} de la plumbagina se presentan anteriormente en la tabla II donde se observa que los valores son de los mismos órdenes de magnitud que los del extracto completo a 24 y 48 hrs, por lo cual se supuso que la plumbagina le otorga las propiedades citotóxicas a *P. pulchella*.

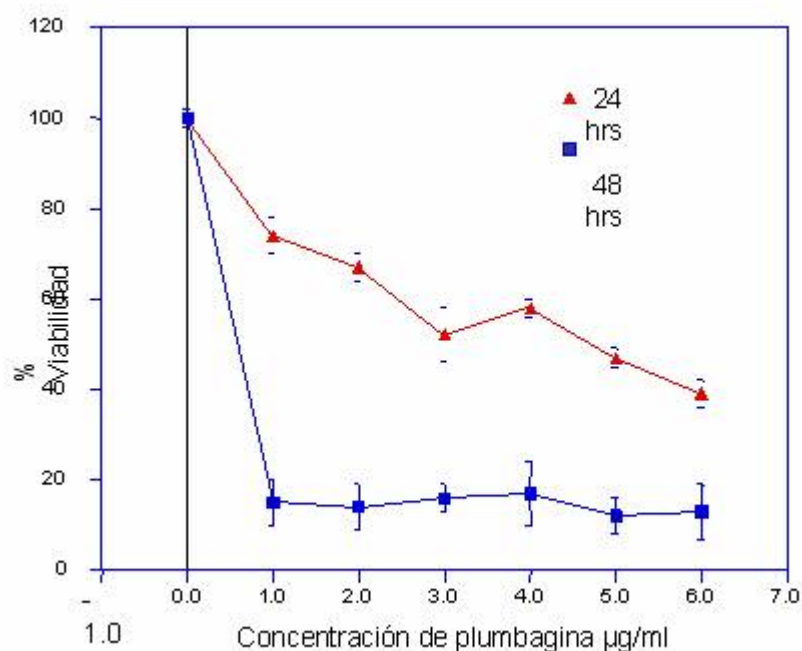


Figura 18. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de la plumbagina durante 24 y 48 hrs. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Cada una de las barras representa la desviación estándar.

En el microscopio se observó (figura 19) a las células HeLa testigo expuestas al vehículo (etanol) (A) con los núcleos no fragmentados y algunas en mitosis; los cultivos expuestos al extracto etanólico de *P. pulchella* (B) presentaron un menor número de células respecto al testigo, lo que comprobó el efecto citotóxico, además se observaron algunas células con núcleos fragmentados y protuberancias celulares, características de células apoptóticas (López, 2001; López *et al.*, 2002).

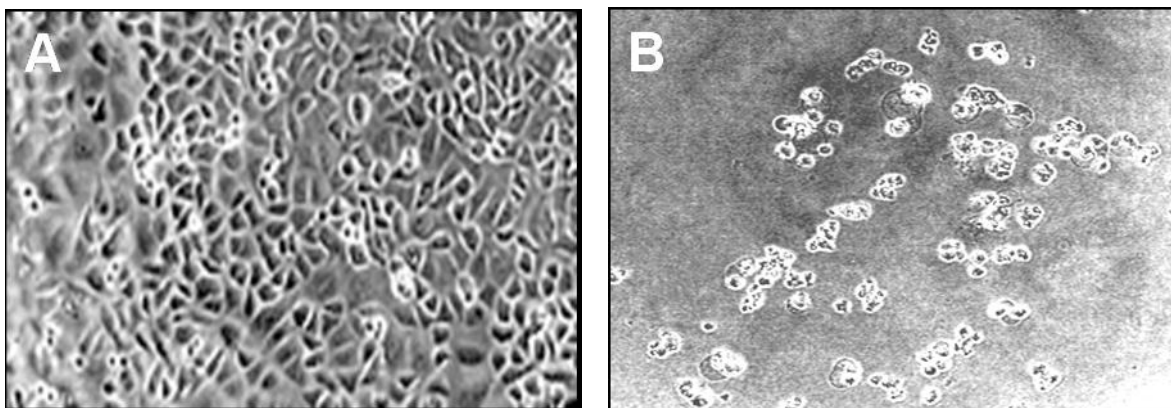


Figura 19. Células HeLa expuestas al vehículo (A) o al extracto etanólico (1.0 µl/100 µl de medio por 24 hrs) de *Plumbago pulchella* (B). A un aumento original 10x.

En la figura 20 se observan las imágenes obtenidas en el microscopio de los cultivos de las células HeLa testigo expuestas al vehículo (etanol) (A) y a la plumbagina a una concentración de 2.0 µg/ml durante 24 hrs (B) al tratar el cultivo con la plumbagina a una concentración de 5.0 µg/ml durante 24 hrs, algunas células mostraron una morfología apoptótica (C) con núcleos fragmentados y protuberancias celulares (López, 2001; López *et al.*, 2002).

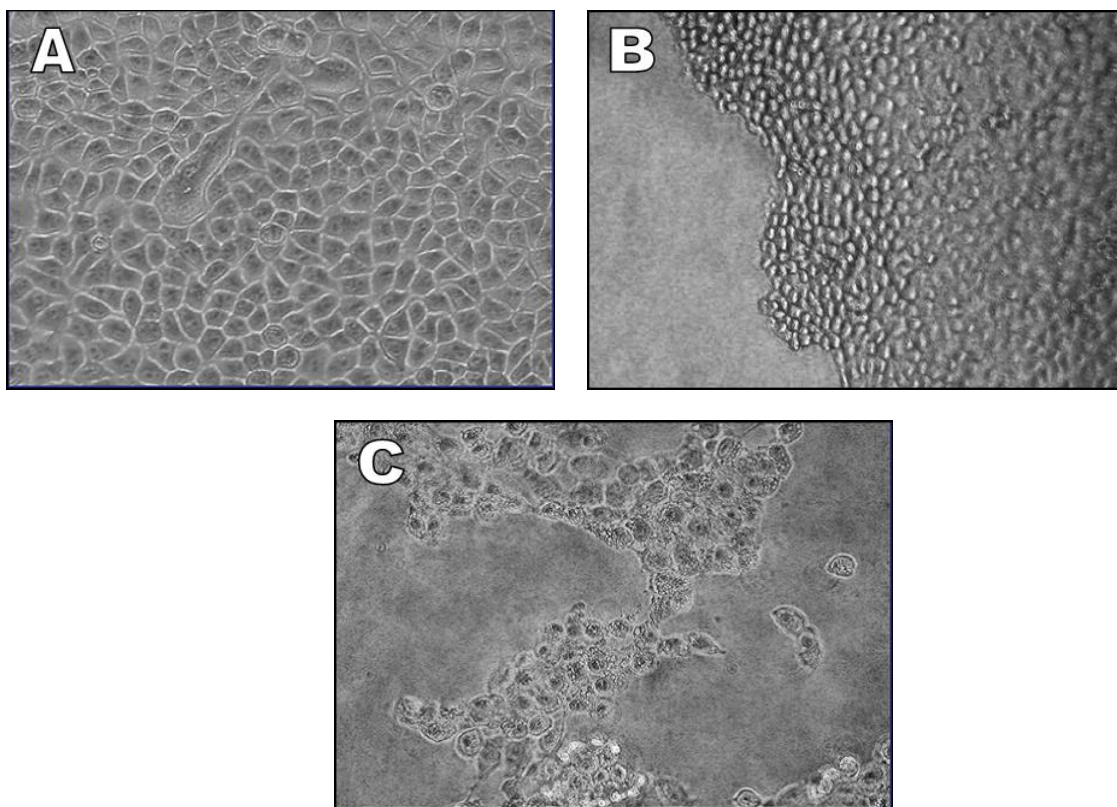


Figura 20. Células HeLa expuestas al vehículo (A) o a la plumbagina a una concentración de 2.0 $\mu\text{g/ml}$ por 24 hrs (B) o 5.0 $\mu\text{g/ml}$ por 24 hrs (C). A un aumento original A y B 10x; C 20x.

Las características morfológicas observadas en las células HeLa tratadas, sugieren que la citotoxicidad producida por el extracto etanólico de *P. pulchella* y la plumbagina, es por apoptosis. Sin embargo, para comprobar este efecto sería necesario realizar otro tipo de pruebas como la tinción de núcleos con bromuro de etidio para observar si se condensan y fragmentan y la técnica de TUNEL para detectar fragmentación de ADN, características que se presentan en el proceso apoptótico (Albert *et al.*, 1998).

No se encontraron antecedentes acerca de la evaluación de los efectos citotóxicos de las tres especies vegetales estudiadas: *P. pulchella*, *D. bicolor* y *J. dioica* var. *dioica*.

Este es el primer reporte acerca del efecto citotóxico de *P. pulchella*; al comparar la CI_{50} obtenida a 48 hrs con el extracto de esta planta en células HeLa, que fue de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, con el valor reportado en otras especies vegetales, se encontró que la cifra fue significativamente menor que la encontrada por Betancur-Galviz *et al.*, (2002) con el extracto de *Euphorbia arenaria* (74.6 $\mu\text{g/ml}$).

La plumbagina ha sido ensayada en distintas líneas celulares de tumores como en las citas de Ehrlich, linfocitos P_{388} de leucemia, melanoma B16F1, sarcoma 180 y fibrosarcomas. Hasta el momento no se detectaron estudios en los que la plumbagina haya sido probada en células HeLa. En cuanto a la información sobre la toxicidad de la plumbagina es limitada, sin embargo se sabe que es una molécula que genera radicales libres como superóxido, el cual puede causar daño a varias biomoléculas (Premakumari *et al.*, 1997) se ha observado así mismo que ocasiona lesión testicular y reducción en el tamaño de epidídimo en perro, por lo cual se podría pensar que la plumbagina es un agente tóxico.

Villavicencio y Pérez-Escandón (1992, 1994) reportaron que la plumbagina es la defensa química de *P. pulchella* ya que es la sustancia que disuade la alimentación de ortópteros y lepidópteros con los que interactúa la planta.

Ribeiro *et al.*, (2003) probaron esta sustancia en bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y en el patógeno fúngico *Candida albicans* obteniendo como resultado la inhibición completa del crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1.56 µg/ml y de *Candida albicans* a una concentración de 0.78 µg/ml. Estos resultados sugieren que la naftoquinona plumbagina promete ser un agente antimicrobial.

8.5 Actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos en la prueba se presenta en la tabla 4, en donde se observa que seis (75%) de los siete extractos presentó actividad antibacteriana en cuando menos una cepa. El extracto más activo fue el de *P. pulchella* ya que fue el único que presentó actividad en las tres cepas de bacterias incluidas en la prueba, a 250 µg/ml el extracto fue muy activo (valor 3) en *S. aureus* ya que inhibió completamente el crecimiento de esa bacteria en *E. coli* y *S. typhimurium* el extracto fue parcialmente activo (figura 21).

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las especies de plantas estudiadas. Los resultados se expresaron como: 0 inactivo, 1 parcialmente activo, 2 activo, 3 muy activo.

Extractos etanólicos de:	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>S. typhimurium</i>		
	concentración de los extractos etanólicos µg/ml								
	250	500	1000	250	500	1000	250	500	1000
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	1	3	3	3	3	3	1	2	2
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	0	0	1	0	0	3	0	0	0
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	0	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz & Pavón) Pers.	0	0	0	3	3	3	0	0	0
<i>Marrubium vulgare</i> L.	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Pinaropappus roseus</i> (Less) Less	0	0	0	0	0	0	0	0	0

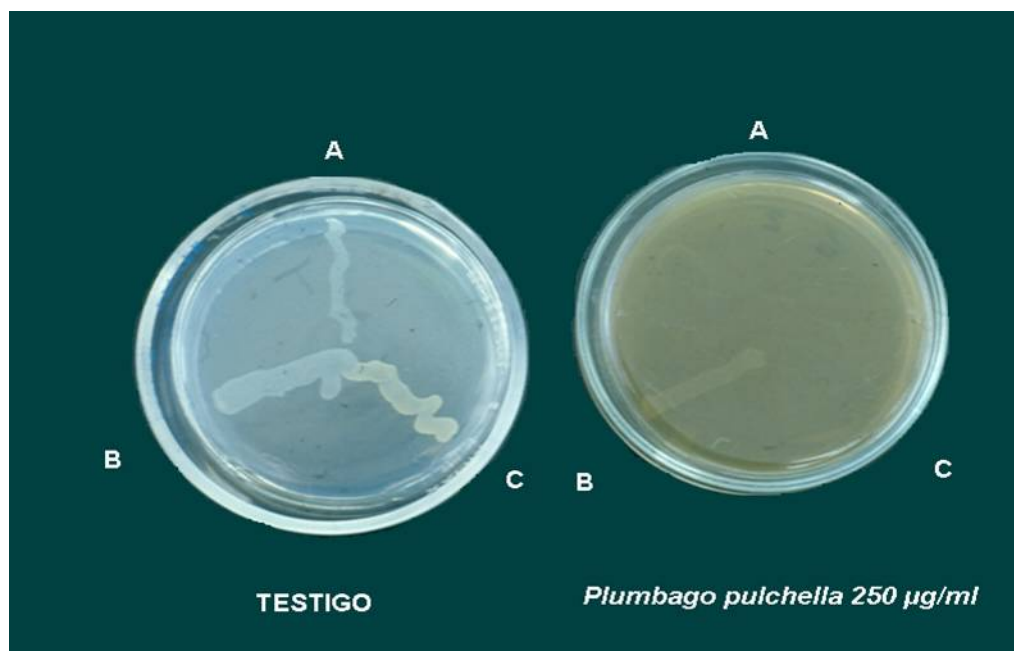


Figura 21. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Plumbago pulchella* 250 µg/ml en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurum* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

En la figura 22 se observa el efecto producido por el extracto etanólico de *P. pulchella* a 500 µg/ml en la intensidad del crecimiento bacteriano, la estría de *S. aureus* expuesta al extracto no muestra crecimiento bacteriano, en comparación con el de la estría correspondiente en el testigo negativo, tampoco hubo crecimiento en la estría de *E. coli* por esto el extracto se consideró como muy activo (valor de 3) en esas dos bacterias, en esa misma figura 22 se muestra la disminución del crecimiento en la estría de y *S. typhimurium* lo que permitió clasificar al extracto como activo (valor de 2).

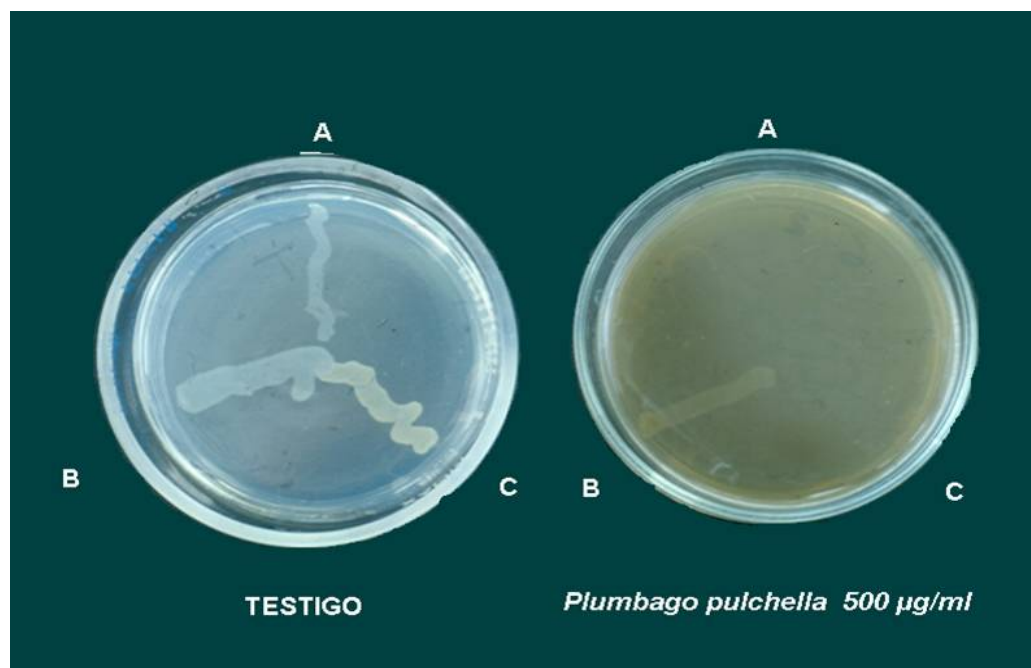


Figura 22. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Plumbago pulchella* 500 µg/ml en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

Le siguió en actividad *A. psilostachya* (tabla 4) cuyo extracto fue muy activo (valor de 3) a 1000 µg/ml en *S. aureus* y parcialmente activo (valor de 1) en *E. coli* a la misma concentración, el extracto fue inactivo (valor de 0) en *S. typhimurium* en las tres concentraciones; en la figura 23 se aprecia la intensidad del crecimiento de las bacterias expuestas al extracto de *A. psilostachya* (1000 µg/ml) en comparación con el testigo negativo.



Figura 23. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Ambrosia psilostachya* 1000 µg/ml en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

El extracto de *J. dioica* var. *dioica* presentó actividad en *S. aureus* siendo activo (valor de 2) y parcialmente activo en *E. coli* (valor de 1) a 1000 µg/ml (figura 24).



Figura 24. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Jatropha dioica* var. *dioica* 1000 µg/ml en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

El extracto de *B. salicifolia* resultó muy activo a partir de 250 $\mu\text{g/ml}$ en *S. aureus* e inactivo en las otras dos bacterias; en la figura 25 se observa la ausencia de crecimiento de *S. aureus*.



Figura 25. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Baccharis salicifolia* 250 $\mu\text{g/ml}$ en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

El extracto de *M. vulgare* mostró ser parcialmente activo a 1000 µg/ml en *E. coli* y *S. aureus* (figura 26).

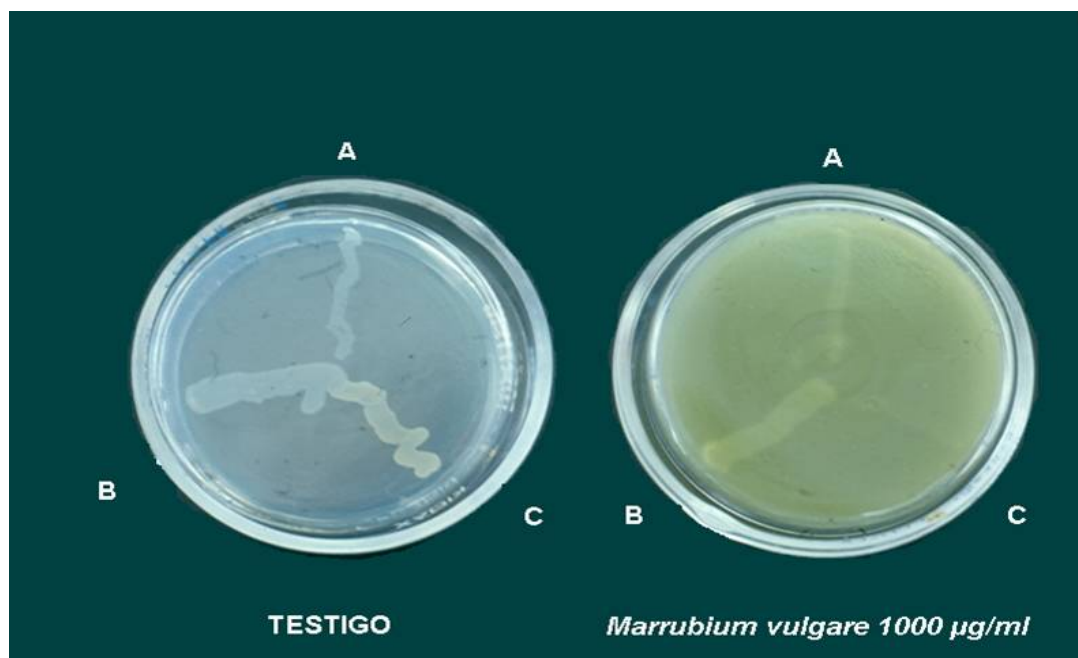


Figura 26. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de Marrubio vulgare 1000 µg/ml en Escherichia coli (A), Salmonella typhimurium (B) y Staphylococcus aureus (C), en comparación con el testigo negativo.

El extracto de *D. bicolor* fue parcialmente activo en *S. aureus* a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (figura 27).

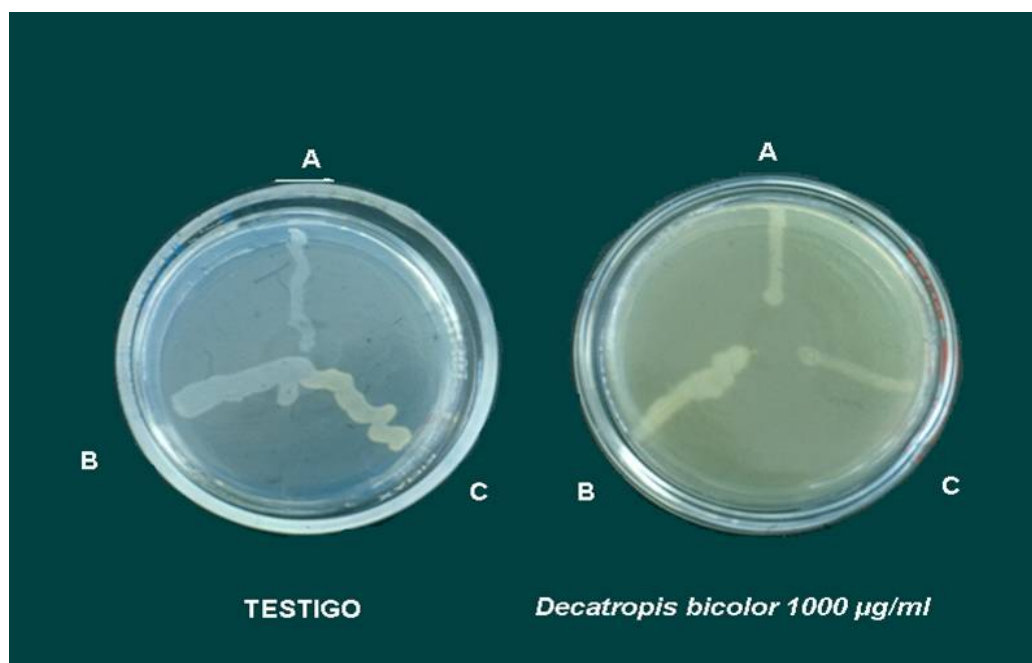


Figura 27. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Decatropis bicolor* 1000 $\mu\text{g/ml}$ en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

El extracto de *P. roseus* fue inactivo en las tres cepas (figura 28). *S. aureus* resultó la bacteria más susceptible pues seis de los siete extractos mostraron algún grado de actividad. *S. typhimurium* fue la bacteria más resistente ya que sólo un extracto, el de *P. pulchella* presentó actividad en esa cepa.

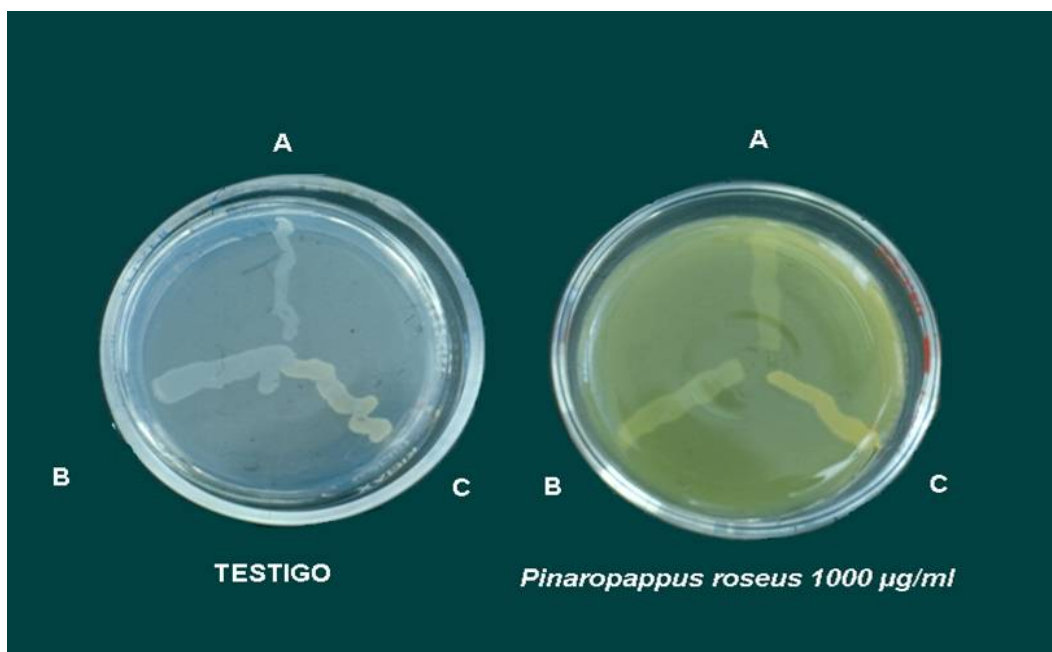


Figura 28. Efecto en el crecimiento bacteriano producido por el extracto etanólico de *Pinaropappus roseus* 1000 µg/ml en *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B) y *Staphylococcus aureus* (C), en comparación con el testigo negativo.

Las siete especies de plantas tienen uso medicinal en Tepatepec, en el tratamiento de problemas de salud a los que puede haber asociadas infecciones, por ejemplo heridas, diarrea, vómito, gripe, entre otros.

La actividad antibacteriana de *P. pulchella* ayuda a confirmar las propiedades que se le atribuyen a la planta que se emplea externamente para el tratamiento de heridas, úlceras y caries. También se usa para lavados vaginales cuando hay cáncer de matriz y como presentó citotoxicidad en células Hela y actividad antibacteriana, las propiedades medicinales que se le atribuyen a la planta pudieran tener como base esos dos efectos. Llama la atención que los usos principales de *A. psilostachya* y *B. salicifolia* sean para tratar problemas digestivos como infección y dolor de estómago y que el extracto etanólico de *A. psilostachya* haya sido parcialmente activo en *E. coli* e inactivo en *S. typhimurium*; el extracto de *B. salicifolia* fue inactivo en las dos cepas; ambas bacterias pueden estar en procesos infecciosos del tracto digestivo; los extractos de las dos plantas fueron activos en *S. aureus*, lo que no tiene relación con el uso de estas plantas, pero con base en este resultado, podrían emplearse en problemas causados por *S. aureus*, por ejemplo en infecciones respiratorias. Respecto de *J. dioica* var. *Dioica* y *D. bicolor*, son dos especies ampliamente usadas en la zona y forman parte del matorral de *Flourensia resinosa*, ambas son usadas para lavar heridas y úlceras, en especial las que están infectadas, así que la actividad antibacteriana que presentaron los extractos de estas plantas ayudan a confirmar la eficacia del uso popular.

Se encontró que los extractos etanólicos de seis de estas siete especies vegetales mostraron actividad antibacteriana, así que los resultados apoyan la segunda hipótesis, en la que se predijo que si estas plantas son empleadas en Tepatepec para tratar padecimientos de posible origen infeccioso, entonces sus

extractos mostrarían actividad antibacteriana, como ocurrió en las pruebas realizadas y ayudan a confirmar las propiedades medicinales que los habitantes de Tepatepec atribuyen a estas plantas y las revelan como una fuente potencial de antibacterianos de origen vegetal. Se encontraron antecedentes de la demostración de efectos antimicrobianos de algunas de las especies de plantas estudiadas. Los extractos de *P. pulchella* presentaron actividad en varias cepas bacterianas y fúngicas (Krishnasamy y Purushothaman, 1980); los extractos de *A. psilostachya* han sido activos en *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Encarnación y Keer, 1991). Se ha reportado que el extracto acuoso de *J. dioica* var. *dioica* fue activo en *S. aureus* (Argueta, 1994) además de ser activo en *E. coli*, *Candida albicans* y *Trichophyton tonsurans* (Belmares et al., 2003). No hay antecedentes de estudios antimicrobianos de *B. salicifolia*, *M. vulgare* y *P. roseus*.

8.6 Toxicidad en *Artemia salina*

Se ensayaron los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas de los cuales se obtuvieron los valores de CL₅₀ (concentración letal cincuenta) que se presentan en la tabla 5 en donde se observa que los extractos de seis (87.5%) de las siete especies mostraron toxicidad en *Artemia salina*, presentando una CL₅₀ < 1000 µg/ml. El extracto de *J. dioica* var. *dioica* fue el que presentó la toxicidad más alta en *A. salina* con el valor de CL₅₀ 7.0557 µg/ml, le siguió en toxicidad *P. pulchella* con una CL₅₀ de 14.9645, luego el extracto de *M. vulgare* con una CL₅₀ de 38.0926, después *P. roseus* con CL₅₀ de 158.9267;

B. salicifolia y *D. bicolor* presentaron CL₅₀ de 516.3467 y 565.0234 respectivamente. El extracto de *A. psilostacya* no presentó toxicidad, tuvo una CL₅₀ > 1000 µg/ml.

P. roseus fue tóxico en *A. salina* e inactivo en bacterias, lo que sugiere que sus extractos podrían ser investigados empleando otros bioensayos para la detección de propiedades farmacológicas más específicas o que los extractos pudieran ser separados teniendo como guía el ensayo con *A. salina* para obtener el principio activo que luego se probaría con otros modelos. Cabe mencionar que no se registraron antecedentes de estudios de la actividad biológica de esta planta. *D. bicolor* mostró toxicidad en *A. salina* y aunque su extracto sólo fue activo en *S. aureus*, es una planta que podría investigarse a futuro pues forma parte del matorral xerófilo y es ampliamente usada en la región (Pérez-Escandón *et al.*, 2003).

El porcentaje (87.5%) de especies tóxicas o activas en *A. salina* fue mayor que el de las plantas con actividad reportadas por Zani *et al.*, (1995) y Alves *et al.*, (2000) ya que sólo obtuvieron un 10%. Este elevado porcentaje de plantas tóxicas sugiere la presencia de compuestos bioactivos en estas especies de Tepatepec, Hidalgo por lo que a futuro podrían ser investigadas; también resalta la importancia de seleccionar plantas medicinales en la búsqueda de extractos bioactivos pues es más probable encontrarlos en esta clase de plantas.

Tabla 5. CL₅₀ y límites de confianza 95% de los extractos etanólicos de las plantas registradas en Tepatepec, Hidalgo probados a un rango de concentración de 5 a 2000 µg/ml en larvas de *Artemia salina*.

Extractos etanólicos de:	CL ₅₀ (µg/ml)	Límites de confianza 95%
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	7.0557	nd
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	14.9645	11.1417 – 24.1865
<i>Marrubium vulgare</i> L.	38.0926	0 – 67.6444
<i>Pinaropappus roseus</i> (Less) Less	158.9267	129.7640 – 193.6285
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz & Pavón) Pers.	516.3467	422.4481 – 624.2361
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	565.0234	491.3541 – 648.3331
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	1088.0947	940.97.41 – 1260.2535

nd= no determinada

8.7 Pruebas fitoquímicas preliminares

En los extractos metanólicos de las siete especies estudiadas, se hallaron presentes alcaloides (tabla 6). *Pinaropappus roseus* Less fue la especie que presentó una concentración alta de alcaloides seguida de *Decatropis bicolor* (Zucc). Radlk con una concentración media y las que presentaron baja concentración fueron *Jatropha dioica* var. *dioica* Sessé ex Cerv, *Marrubium vulgare* L. *Bacharis salicifolia* Pers, *Ambrosia psilostachya* DC y *Plumbago pulchella* Boiss. En lo que corresponde a la concentración de flavonoides *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk y

Plumbago pulchella Boiss fueron las especies que presentaron concentración alta de estas sustancias (tabla 6). *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk fue la especie que presentó concentración alta de triterpenos mientras que *Marrubium vulgare* L. y *Ambrosia psilostachya* DC no presentó concentración alguna (tabla 6). Por último, *Jatropha dioica* var *dioica* Sessé ex Cerv y *Marrubium vulgare* L. presentaron una concentración media de saponinas y por el contrario, en *Pinaropappus roseus* Less y *Decatropis bicolor* (Zucc) Radlk no se encontró presencia de saponinas (tabla 6), solo se esperaba la presencia de estos compuestos por que son las pruebas que estan disponibles en la literatura y las que generalmente se efectuan en pruebas fitoquimicas preliminares.

Tabla 6: Compuestos secundarios presentes en los extractos de las plantas estudiadas. Concentración: 0 nula, 1 baja, 2 media, 3 alta y 4 muy alta

Especie	Alcaloides	Flavonoides	Triterpenos	Saponinas
<i>Jatropha dioica</i> var. <i>dioica</i> Sessé ex Cerv.	1	0	1	2
<i>Marrubium vulgare</i> L.	1	1	0	2
<i>Bacharis salicifolia</i>	1	2	2	1
<i>Pinaroppapus roseus</i> Less.	3	1	2	0
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc). Radlk.	2	3	3	0
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	1	1	0	1
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	1	3	1	1

8.8 Determinación de la correlación entre toxicidad y actividad citotóxica, actividad antibacteriana y la concentración de alcaloides.

Se realizó una comparación de las especies vegetales respecto a la toxicidad en *A. salina* contra citotoxicidad en células HeLa, actividad antibacteriana y presencia de compuestos secundarios alcaloides. Al comparar la toxicidad de los extractos de *Jatropha dioica* var. *dioica*, *Plumbago pulchella*, *Decatropis bicolor* y la citotoxicidad de estos mismos extractos en células HeLa, no se encontró relación alguna (tabla 7). Con base en los resultados podría decirse que en este caso el bioensayo con *A. salina* no sería de utilidad para detectar citotoxicidad en los extractos de estas plantas.

En contraste, otros autores han reportado correlación positiva entre la toxicidad en *A. salina* y la citotoxicidad en líneas de células de tumores humanos (McLaughlin *et al.*, 1998; Carballo *et al.*, 2002) y han empleado el bioensayo en *A. salina* como guía para separar los extractos y obtener sustancias puras que posteriormente fueron citotóxicas (Shimada *et al.*, 1997).

Tabla 7. CL₅₀ en *Artemia salina* y CI₅₀ en células HeLa (en µg/ml) de los extractos etanólicos de *Jatropha dioica* var. *dioica*, *Plumbago pulchella* y *Decatropis bicolor*.

Extractos etanólicos de:	<i>Artemia salina</i> CL ₅₀ (µg/ml)	HeLa CI ₅₀ (µg/ml)
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	7.0557	nd
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	14.9645	1.5
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	565.0234	nd

Nd= no determinada

Se comparó la toxicidad de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas con la actividad antibacteriana en *E. coli* de estos mismos extractos para determinar si había correlación. En la tabla 8 se presentan los datos de ambas actividades entre las que no se encontró correlación ($r = 0.3$, $p > 0.05$). Por tanto en este estudio el bioensayo en *A. salina* no fue útil para detectar actividad antibacteriana y no convendría usarlo para separar los extractos para obtener principios activos antibacterianos. Otros autores encontraron correlación

positiva entre la toxicidad de extractos en *A. salina* y su actividad antibacteriana (De Rosa *et al.*, 1994).

Tabla 8. CL₅₀ en *Artemia salina* y actividad antibacteriana en *E. coli* (en µg/ml) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas.

Extractos etanólicos de:	<i>Artemia salina</i> CL ₅₀ (µg/ml)	<i>Escherichia coli</i> Actividad antibacteriana ^a
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	7.0557	1
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	14.9645	3
<i>Marrubium vulgare</i> L.	38.0926	1
<i>Pinaropappus roseus</i> (Less) Less	158.9267	0
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz & Pavón) Pers.	516.3467	0
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	565.0234	0
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	1088.0947	1

^a 0 inactivo, 1 parcialmente activo, 2 activo, 3 muy activo

Se comparó la toxicidad de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas con la actividad antibacteriana en *S. aureus* de estos mismos extractos para determinar si había correlación. En la tabla 9 se presentan los datos de ambas actividades entre las que no se encontró correlación ($r = 0.11$, $p > 0.05$). Por tanto en este estudio el bioensayo en *A. salina* no fue útil para detectar actividad antibacteriana.

Tabla 9. CL₅₀ en *Artemia salina* y actividad antibacteriana en *S. aureus* (en µg/ml) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas.

Extractos etanólicos de:	<i>Artemia salina</i> CL ₅₀ (µg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> Actividad antibacteriana ^a
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	7.0557	2
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	14.9645	3
<i>Marrubium vulgare</i> L.	38.0926	1
<i>Pinaropappus roseus</i> (Less) Less	158.9267	0
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz & Pavón) Pers.	516.3467	3
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	565.0234	2
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	1088.0947	3

^a 0 inactivo, 1 parcialmente activo, 2 activo, 3 muy activo

Tampoco se encontró correlación entre la toxicidad de los extractos en *A. salina* y la concentración de alcaloides ($r=0.2$ $p>0.05$) (tabla 10).

Tabla 10. CL₅₀ en *Artemia salina* y concentración de alcaloides (determinación estimativa) de los extractos etanólicos de las siete especies de plantas estudiadas.

Extractos etanólicos de:	Artemia salina CL ₅₀ (µg/ml)	Concentración de alcaloides
		1
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. <i>dioica</i>	7.0557	
<i>Plumbago pulchella</i> Boiss.	14.9645	1
<i>Marrubium vulgare</i> L.	38.0926	1
<i>Pinaropappus roseus</i> (Less) Less	158.9267	3
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz & Pavón) Pers.	516.3467	1
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	565.0234	2
<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	1088.0947	1

0 nula, 1 baja, 2 media, 3 alta y 4 muy alta

8.9 Fichas de las especies



Figura 29. *Ambrosia psilostachya* DC.

Familia: Asteraceae

Nombre científico: *Ambrosia psilostachya* DC.

Nombre común: Altamisa, hierba amargosa

Descripción

Planta herbácea perenne, formando a menudo extensas colonias a partir de una base rizomatosa, erecta, hasta de 80 cm de alto, tallos generalmente simples, a veces ramificados estriados, hojas alternas u opuestas pecioladas. Las hojas son en forma ovada con hendiduras profundas. Las inflorescencias están agrupadas en ramilletes en las puntas de la planta (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Usos y forma de preparación tradicional

Se encontró que la planta se usa para tratar tumores, para lo cual toda la planta se machaca y con el machacado se da masajes en donde está el tumor.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

En cuanto a la actividad antibacteriana encontrada en la presente investigación, el extracto de esta plantas resultó ser muy activo a 1000 µg/ml en *Staphylococcus aureus* y parcialmente activo en *Escherichia coli* a esta misma concentración, sin embargo en *Salmonella typhimurium* el extracto fue inactivo.

En este trabajo de investigación se encontró que esta especie tiene baja concentración de alcaloides, flavonoides y saponinas y hubo una ausencia de triterpenos. El extracto fue inactivo en *A. salina* (LC₅₀ >1000 µg/ml).

Antecedentes de uso, actividad biológica y análisis químico

No se encontraron antecedentes.



Figura 30. Tallo, hojas e inflorescencias de *Baccharis salicifolia* (Ruíz & Pavón) Pers



Figura 31. Acercamiento a las inflorescencias de *B. salicifolia* (Ruíz & Pavón) Pers.

Familia: Asteraceae

Nombre científico: *Baccharis salicifolia* (Ruíz & Pavón) Pers.

Nombre común: Jarilla

Descripción

Arbusto erecto y abiertamente ramificado de 1.5 a 4 mts de altura, hojas alternas, simples, linear-lanceoladas de 8-15 mm de longitud, aserradas o denticuladas, resinosas, inflorescencias agrupadas en cabezuelas de 4-5 mm de color blanco, fruto de alrededor 1 mm de longitud. Florece de enero a marzo. Crece silvestre, se localiza en el matorral xerófilo, a la orilla de caminos, carreteras y en lugares perturbados (Pérez-Escandón *et al.*, 1995; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Usos y forma de preparación tradicional

Para las heridas, se hierven las hojas y las inflorescencias y con un lienzo se aplica el agua en la parte afectada, este procedimiento se repite de dos a tres veces

al día. Para el susto, las ramas con inflorescencias se hierven en agua y con la infusión se dan baños a la persona asustada.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

En este estudio, se detectaron triterpenos, alcaloides y saponinas, estos dos últimos se encontraron en baja concentración. Se encontró actividad antibacteriana, siendo el extracto etanólico muy activo en *Staphylococcus aureus* e inactivo en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Presentó toxicidad en *A. salina* (LC₅₀ 516.3467).

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

Se considera a esta planta son como febrífuga, hemostática, diurética, anticatarral y anticonceptivo; en la medicina tradicional se usa para el dolor de oído se muelen los brotes y se mezcla con aceite de cocinar y Vick Vaporub y se pone en el oído; para la epilepsia se hierva en medio litro de agua tres cogollos por cinco minutos y se deja reposar y se toma tres tazas al día; para el crecimiento del cabello se hace un cocimiento fuerte y debe enjuagarse el cabello con el té, dando masaje vigoroso al cuero cabelludo durante cinco minutos; para la alopecia, seborrea y para lavar los pies (pie de atleta). La infusión de las hojas sirve y se toma para la gastritis (Argueta, 1994).

Se ha registrado que en la planta se encuentran flavonoides como la hispidulina y ésteres aromáticos (Argueta, 1994).



Figura 32. Tallo, hojas y flores de *Pinaropappus roseus* Less.

Familia: Asteraceae

Nombre científico: *Pinaropappus roseus* Less.

Nombre común: Espul o Ispul

Descripción

Hierba de 20 a 30 cm de altura, puede tener poca pubescencia. Las hojas son angostas, se ven de color verde azulado y los bordes a veces tienen dientes. Las flores son de color rosa y están en cabezuelas. Planta silvestre, asociada a cultivos de maíz, frijol y matorral xerófilo (Pérez-Escandón *et al.*, 1995).

Usos y forma de preparación tradicional

Para el cáncer, las flores se hierven en un litro de agua y la infusión se toma durante el transcurso del día.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

El extracto etanólico fue inactivo en las tres bacterias estudiadas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*. Presentó toxicidad en *A. salina* (CL₅₀ 158.926)

En este trabajo se encontró que la planta tiene alta concentración de alcaloides, baja concentración de flavonoides, concentración media de triterpenos y no hubo presencia de saponinas.

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

No se encontraron antecedentes

	
<i>Figura 33. Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var <i>dioica</i>	<i>Figura 34. Flores de J. dioica</i> Sessé ex Cerv. var <i>dioica</i>

Familia: Euphorbiaceae

Nombre científico: *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var *dioica*.

Nombre común: Sangre de grado o sangre de drago.

Descripción

Arbusto de 30 a 60 cm de altura, con los sexos separados; hojas espatuladas de 2 a 4 cm de largo y tallos carnosos con látex o jugo incoloro que al contacto con el aire se vuelve rojizo o negro; flores pequeñas blanquecinas o blanco – rosadas; fruto seco ligeramente esférico, con una sola semilla. Florece en abril y mayo. Crece principalmente en el matorral xerófilo (Pérez-Escandón *et al.*, 1995).

Usos y forma de preparación tradicional

Para el cáncer de matriz, se hierva un trozo de raíz y tallo en un litro de agua y la infusión se toma el té en ayunas. Para las heridas, el látex del tallo se exprime en la herida una vez al día, para el dolor de dientes, la raíz recién cortada se lava para

quitarle los restos de suelo y se muerde dos o tres veces al día. Para evitar la caída del cabello se pone a hervir en suficiente agua toda la planta recién cortada y se lava el cabello.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

El extracto etanólico fue inactivo en células HeLa y activo en *Staphylococcus aureus*. Presentó toxicidad en *A. salina* (LC₅₀ 7.05571). Se encontró baja concentración de alcaloides y triterpenos, concentración media de saponinas y nula de flavonoides.

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

Martínez 1990 la reportó como antidisenterica, antiescorbútica, antiséptica, astringente, para la dermatosis, hemorroides y como tónico capilar. Es empleada para las várices y golpes, para lo cual la planta se hierve y se aplica en forma de cataplasma, o se cuece y se ponen lienzos diariamente sobre los golpes. El agua resultante de la cocción es utilizada en forma de baños para quitar la sarna o en lavados para infección de golpes, heridas y granos. También se recomienda aplicar una gota de látex sobre la piel para sacar espinas, dos gotas en las muelas picadas para provocar su desprendimiento, frotar en la parte afectada para contrarrestar el efecto de las úlceras (Argueta, 1994). Para amacizar la dentadura, con el látex se frotan las encías y los dientes, al terminar se enjuaga la boca con agua tibia (Pérez-Escandón *et al.*, 1995). Los tallos, con hojas o sin ellas, se hierven y el agua resultante se utiliza como enjuague para lavar el pelo, a fin de evitar su caída

(Pérez-Escandón *et al.*, 1995). Para curar los fuegos en la boca, la savia se aplica en los granos, para el algodoncillo, la savia se aplica frotando la parte afectada (Aguilar, 1994).

Se ha demostrado que un extracto acuoso de la raíz ejerce una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (Argueta, 1994).

De la raíz se han identificado tres diterpenos, la citlalitrona, jatrofona y riolosatriona y un esterol, el B – sitosterol. De las raíces se obtiene un aceite esencial resina, saponinas, un alcoloide y ácido oxálico. De los tallos emana un látex rico en taninos (Martínez, 1990; Argueta, 1994).



Figura 35. *Marrubium vulgare* L

Familia: Laminaceae

Nombre científico: *Marrubium vulgare* L.

Nombre común: Marrubio o manrrubio

Descripción

Es una planta que mide 30 a 90 cm de altura, está generalmente cubierta con un vello espeso y blanquecino, con sus tallos cuadrados. Las hojas son opuestas de color blanco, redondas, rugosas y onduladas. Con muchas flores, pequeñas blancas, que se encuentran en la unión de la hoja con el tallo, de forma tubulosa. Los frutos son cuatro pequeñas nueces lisas. Planta silvestre introducida de Europa, común en terrenos de cultivo y cultivada en huertos familiares, asociada a matorral xerófilo (Pérez-Escandón *et al.*, 1995).

Usos y forma de preparación tradicional

Para el cáncer, hojas y tallos se ponen a hervir en un litro de agua y la infusión resultante se toma durante todo el transcurso del día. Para curar las heridas también se hierven las hojas y tallo y la infusión se toma durante el día; esta infusión se usa para lavar heridas.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

En cuanto a la actividad antibacteriana, el extracto etanólico mostró ser parcialmente activo en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Fue tóxico en *A. salina* (CL₅₀ 38.0926). Se encontró baja concentración de alcaloides y flavonoides; concentración media de saponinas y nula de triterpenos.

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

Martínez (1990) reportó que el marrubio se usa para el catarro, el cocimiento se ingiere para eliminar gusanos intestinales, también se usa para la bilis. Además la planta se reporta para la epilepsia, como antidisentérico, contra el flujo menstrual y para calmar los nervios (Linares *et al.*, 1988).

Se emplea para las reumas, para lo cual se toma la infusión de la planta completa y también se unta en la parte afectada. Para el susto, con las ramas frescas de marrubio y las de pirul (*Schinus molle*) se hace un ramo con el que se barre a la persona afectada. Para controlar la diabetes, se toma la infusión de la planta; su uso se extiende a padecimientos de las vías respiratorias como tos, bronquitis, asma,

afecciones pulmonares, de la garganta y gripes (Argueta, 1994; Aguilar *et al.*, 1996). Cuando se presenta ácido úrico, se hierve la parte aérea y se administra de forma oral (Aguilar *et al.*, 1996).

En esta planta se han identificado el camfeno, para – cimeno, fencheno, limoneno, alfa – pineno, sabineno y alfa – terpinoleo; en la hoja se ha detectado el flavonoide apigenina y varios ésteres glicosídicos, como lactato – glicosídicos y cumarín – glicosiol, crisoeriol, luteoín y los derivados lactatoglucosídicos, vicianín 2 y vitexina (Argueta, 1994).

En las partes aéreas se localizan además otros flavonoides como cosmosín e isoquercetina, diterpenos como marrubín, premarrubín, marrubiol, peregrinol, vulgarol; además de los triterpenos beta – sitosterol y ácido ursólico; compuestos fenólicos como ácidos caféínicos y gálico y el alcaloide estaquidrina. La fracción alcaloidea obtenida de hojas y flores y de las saponinas obtenidas de ramas ejercieron una actividad hipotensora, en gatos; los estudios de toxicidad aguda en ratones demostraron que se requieren dosis muy altas del extracto acuoso de las ramas (4.0 g/kg), administrado por vía intra peritoneal, para producir efectos tóxicos; la fracción alcaloidea de las ramas provoca bradicardia en el corazón de rana; se indica que para el hombre, el consumo de grandes cantidades de marrubio pueden inducir diarrea y náusea (Argueta, 1994).



Figura 36. *Plumbago pulchella* Boiss.

Familia: Plumbaginaceae

Nombre científico: *Plumbago pulchella* Boiss.

Nombre común: Pañete

Descripción

Planta herbácea, leñosa en su base, de 40 a 70 cm de alto; hojas de 3 a 6 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho; flores de aproximadamente 8 mm de longitud, azul-moradas, con glándulas visibles a simple vista, que las hacen pegajosas; fruto pequeño. Florece de julio a octubre (Pérez-Escandón *et al.*, 1995). Se encuentra en el matorral xerófilo. Es particularmente abundante en las orillas del matorral que colindan con los terrenos agrícolas, donde frecuentemente crece entre piedras formando grupos densos en lugares sombreados (Pérez-Escandón *et al.*, 1995).

Usos y forma de preparación tradicional

Para curar el cáncer de matriz se hierven las ramas con o sin flores y con la infusión se hacen lavados vaginales.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

El extracto etanólico causó un efecto citotóxico en la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa ya que redujo la viabilidad celular, además se aisló la sustancia activa que se identificó como plumbagina, la cual se ensayó en la misma línea celular y produjo una reducción de la viabilidad celular. Se encontró que la planta tiene baja concentración de alcaloides, triterpenos y saponinas y alta concentración de flavonoides. El extracto etanólico fue activo en las tres cepas bacterianas. Presentó toxicidad en *A. salina* (CL₅₀ 14.9645).

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

De la Cruz (1996) refiere el uso de la planta como tónico. Se usa contra la caries, ganglios inflamados, calma el dolor de vientre, provoca la orina, alivia los cólicos, cura la gangrena, (Argueta, 1994). Se reporta como antitumoral, antidisentérica y antineurálgica (Argueta, 1994).



Figura 37. *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

Familia: Rutaceae

Nombre científico: *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

Nombre común: Aranthó

Descripción

Arbusto o arbolito de 1.2 a 3 m de alto, hojas compuestas, con 5 a 10 folíolos, verdes en la parte superior y café – amarillentos en la inferior; flores pequeñas, blancas. Florece de febrero a abril (Pérez-Escandón *et al.*, 1995) Habita en el matorral xerófilo. Es una planta muy conocida y utilizada en el Valle del Mezquital.

Usos y forma de preparación tradicional

Para el cáncer se hierven tres hojas en un litro de agua y la infusión se toma durante el día. El uso de esta planta es delicado puesto que puede causar ceguera.

Para cicatrizar heridas, las hojas secas se pulverizan, el producto resultante se aplica en las zonas afectadas y éstas se cubren con una gasa o una venda.

Actividad biológica y análisis fitoquímico

El extracto etanólico no presentó citotoxicidad en células HeLa y fue activo en *S. aureus* y tóxico en *A. salina* (CL₅₀ 565.0234).

Presentó alta concentración de flavonoides y triterpenos, concentración media de alcaloides y nula de saponinas.

Antecedentes de usos, actividad biológica y análisis químico

Las ramas se hierven y con la infusión se lavan las heridas de personas o de animales domésticos, una o dos veces al día (Pérez-Escandón *et al.*, 1995).

9. CONCLUSIONES

- Se registraron siete especies de plantas, de las cuales tres son empleadas para el tratamiento de cáncer cervico uterino, estas fueron *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk, *Plumbago pulchella* Boiss y *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. var *dioica*, el resto son usadas para tratar padecimientos de origen infeccioso.
- La parte de la planta que más utiliza la gente son las hojas, la forma de preparación mas frecuente es la infusión y la vía de administración a la que más recurre es la vía local.
- El extracto etanólico de *Plumbago pulchella* una de las tres especies de plantas utilizadas en Tepatepec para tratar cáncer de matriz, presentó citotoxicidad en células HeLa por lo que se entiende el mecanismo de acción como anticancerígeno. Este trabajo es el primer reporte acerca del efecto citotóxico de *Plumbago pulchella*. Lo que le confiere tal propiedad es la presencia de la plumbagina, que es la sustancia activa de esta especie. Esta sustancia ha sido ensayada en distintas líneas celulares de tumores pero hasta el momento es el primer reporte que se tiene acerca del efecto citotóxico en células HeLa. *Decatropis bicolor* y *Jatropha dioica* no presentaron citotoxicidad.
- Se encontró que los extractos etanólicos de seis de estas siete especies mostraron actividad antibacteriana lo cual pudiera estar relacionada con su uso tradicional en el tratamiento de infecciones. *Plumbago pulchella*, fue la especie

que presentó actividad en las tres cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium*, esto ayuda a validar el uso tradicional que le dan para el tratamiento de heridas, úlceras y cáncer de matriz.

- En el bioensayo de *Artemia salina* se encontró que los extractos de seis de las siete especies mostraron toxicidad, siendo *Jatropha dioica* la especie más tóxica, por lo que pudiera ser la más interesante para continuar la investigación.
- En cuanto al análisis fitoquímico, los extractos de cuatro de las siete especies mostraron la ausencia de un compuesto secundario, pero cada una de las siete especies tuvo alcaloides, estos compuestos son considerados como bioactivos.
- No se encontró correlación entre la toxicidad en *Artemia salina* y la citotoxicidad en células HeLa, actividad antibacteriana y concentración de alcaloides por lo que la evaluación con *Artemia salina* no resultó ser un ensayo conveniente para poder determinar las propiedades citotóxicas y antibacterianas de los extractos de las plantas estudiadas, en cambio la prueba con *Artemia salina* fue útil para definir mejor la bioactividad de los extractos y permitió delinear futuras investigaciones en estas especies vegetales.

- Las siete especies de plantas estudiadas exhibieron actividad en por lo menos una de las pruebas, este elevado porcentaje confirma la importancia de seleccionar especies medicinales en la búsqueda de extractos bioactivos, pues es más probable encontrarlos en esta clase de plantas.
- Es importante este tipo de estudios teniendo como guía al conocimiento tradicional para la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos. Este es el primer reporte de estudio biológico en el municipio de Tepatepec, Hidalgo.

10. LITERATURA CITADA

- Abreu-Payrol, J., M. Miranda-Martínez, G. Toledo-Carrabeo y O. Castillo-García. 2001. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). Revista Cubana de Farmacología 35(1):56-60.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Jacquez P y M. E. López. 1994. Plantas medicinales del herbario IMSS. México. México.D.F. 218 p.
- Aguilar, A., J. R. Camacho., S. Chino., P. Jacquez., M. E. López y H. C. Tejada. 1996. Plantas medicinales del herbario del IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social. México D. F. 149 p.
- Alexides, M.N. (Ed.). 1996. Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual. The New York Botanical Garden. New York. 306 p.
- Albert, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 1998. Essential cell biology. Garland Publishing, Inc. New York. 710 p.
- Alkofaji, A., J.K. Rupprecht, J.E. Anderson, J.L. McLaughlin, K.L. Mikolajczak y A. Scott. 1989. Search for new pesticides from higher plants. In: Arnason, J.T., B.J.R. Philogéne and P. Morand (Eds.). Insecticides of plant origin. American Chemical Society. Washington p. 25-43.
- Alleyne, G.A. 1998. Emerging diseases – what now. Emerging Infectious Diseases 4(3):498-500.
- Alves, T.M.A., A. Fonseca-Silva, M. Brandão, T.S. Grandi, E.F.A. Smânia, A. Smânia y C.L. Zani. 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 95(3): 367-373.

- Argueta, A. (Coord.). 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3 vols. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. 1786 p.
- Awal, M.A., A. Nahar, M.S. Hossain, M.A. Bari, M. Rahman y M.E. Haque. 2004. Brine shrimp toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. *Journal of Medicine Science* 4(3):188-193.
- Balandrin, M.F., J.A. Klocke, E.S. Wurtele y W.H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-1160.
- Baker, H. G. 1968. Las plantas y la civilización. Ed. Herrero Hnos. México D. F. 112 p.
- Belmares, S.Y., O.A. Cárdenas., D.E.V. Cruz., C.M. Rivas y P.R. Carranza. 2003. Fracciones con actividad antimicrobiana de los extractos de *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. *Revista Salud Pública y Nutrición* 2: 1-3.
- Benítez, B. L. 1987. Biología de la célula neoplásica. Su importancia para la oncología clínica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 25(6):457-466.
- Betancur-Galvis, L.A., G.E. Morales, J.E. Forero y J. Roldan. 2002. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro. 97(4):541-546.
- Bolaños, F. 1990. El impacto biológico problema ambiental contemporáneo. Universidad Nacional Autónoma de México D. F. 476 p.

- Brandling-Bennett, A.D. y F. Pinheiro. 1996. Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing?. *Emerging Infectious Diseases* 2(1):59-61.
- Burke, 1990. Infección de heridas. Prevención y control. En: Ballinger, W. (Ed.). *Traumatología*. Interamericana. México, D.F. p. 698-707.
- Cáceres, A., C. Morales, L.M. Girón y M.C. Navarro. 1990. Demostración de la actividad antimicrobiana de algunas especies vegetales usadas popularmente como medicinales en la cuenca del Caribe. *Ciencia y Tecnología* 81-87.
- Carballo, J., Z. Hernández-Inda, P. Pérez, y M. García-Grávalos. 2002. A comparision between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2(1):17-25.
- Cassell, G.H. 1998. Infections causes of chronic inflammatory diseases and cancer. *merging Infectious Diseases* 4(3):475-487.
- Cassileth, B.R. y G. Deng. 2004. Complementary and alternative therapies for cancer. *The Oncologist* 9:80-89.
- Coelho de Souza, G., A.P.S. Haas, G.L. Poser, E.E.S. Schapoval y E. Elisabetsky. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 90:135-143.
- Cragg, G.M., J.E. Simon, J.G. Jato y K.M. Snader. 1996. Drug discovery and development at the National Cancer Institute: potential for new pharmaceutical crops. In: J. Janick (Ed.) *Progress in new crops*. ASHS Press. Arlington. p. 554-560.
- Cragg, G.M., D.J. Newman y K.M. Snader. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60:52-60.

- Cronquist, A. 1969. Introducción a la Botánica. Ed. Continental, México D.F. 96 p.
- Davidson, J.R. y B.R. Ortiz de Montellano. 1983. The antibacterial properties of an aztec wound remedy. *Journal of Ethnopharmacology* 8:149-161.
- De la Cruz, M. 1996. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Fondo de cultura Económica. IMSS. México D. F. 258 p.
- De Rosa, S., A. De Giuho y C. Iodice. 1994. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. *Journal of Natural Products* 57:1711-1716.
- Díaz, R., C. Gamezo e I. López-Goñi. 2003. *Manual práctico de microbiología*. Ed. Masson. Barcelona. 216 p.
- Domínguez, X.A. 1979. *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. México, D.F. 281 p.
- Duke, J.A. 1990. Promising phytomedicinals. In: Janick, J. and J.E. Simon (Eds.). *Advances in new crops*. Timber Press. Portland. p. 491-498.
- Eisner, T. y J. Meinwald (Eds.). 1995. *Chemical ecology. The chemistry of biotic interaction*. National Academic Press. Washington. 450 p.
- Elnima, E.I., S.A. Ahmed, A.G. Mekkawi y J.S. Mossa. 1983. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 38:747-748.
- Encarnación, R. y S. Keer. 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 31:181-192.
- Espinosa, S.J. 1985. *Plantas medicinales de la Huasteca Hidalguense*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México. D. F. 157 p.

- Estrada, E. 1985. Jardín Botánico de plantas medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo. 41 p.
- Estrada, E. 1992. Plantas Medicinales de México: Introducción a su estudio. 4 edc. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo. 566 p.
- Estrada, E. 1995. Plantas Medicinales de México. 2 edc. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo. 580 p.
- Fauci, A. 1998. New and reemerging diseases: The importance of biomedical Research. *Emerging Infectious Diseases* 4(3): 374-378.
- Fournet, A. Angelo, V. Munoz, F. Roblot, R. Hocquemiller y A. Cave. 1992 Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*. 37(2), 159-164.
- Franssen, F.F.J., L.J.J.W. Smelisters, I. Berger y B.E. Medinilla-Aldana. 1997. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 41(7):1500-1503.
- García, R.G. 1981. Plantas medicinales de la vertiente sur de la Sierra de Pachuca. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 118 p.
- García-Fernando, M. J. Ibáñez y F. Alvira (comp.). 2002. El análisis de la realidad Social. Métodos y técnicas de investigación. Alianza Editorial. Madrid. 682 p.
- Grace, N.E. y M.E. Reeve. 1996. Traditional healers and global surveillance strategies for emerging diseases: closing the gap. *Emerging infectious Diseases* 2(4): 351-353.

- Hammer, K.A., C.F. Carson y T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86:985-990.
- Harborne, J.B. 1973. *Phytochemical methods*. Chapman and Hall. London. 278 p.
- Harborne, J.B. 1990. *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press. London. 278 p.
- Hernández X., E. 1985. Exploración etnobotánica y su metodología. *Revista de Geografía Agrícola*. Universidad Autónoma Chapingo. 1:163-164.
- Hernández-Díaz, L. y M. Rodríguez-Jorge. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2:44-47.
- Hernández, T., M. Canales, J.G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar y R. Lira. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 88:181-188.
- Heywood, V.M. 1993. *Flowering plants of the world*. Oxford University Press. New York. 335 p.
- Holetz, F.B., G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A. García-Cortez, C.V. Nakamura y B.P. Dias Filho. 2002. Screening of some plants used in to the Brazilian folk medicine for the treatment in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 97(7):1027-1031.
- Holmstedt, B.R. y J.G. Bruhn. 1997. Ethnopharmacology-A challenge. In: Schultes, R.E. y S. Von - Reis (Eds.). *Ethnobotany. Evolution of a discipline*. Dioscorides Press. Portland. p. 338-342.

- Hostettmann, K. y A. Marston. 1987. Plants used in African traditional medicine. In: Steiner, R.P. (Ed.). Folk medicine. The art and the science. American Chemical Society. Washington. p.111-124.
- Hostettmann, K. 1997. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. International conference on biodiversity and bioresource conservation and utilization. Thailand. 23-27 p.
- Ikan, R. 1991. Natural products: a laboratory guide. Academic Press. San Diego. 360 p.
- INEGI. 1998. Anuario estadístico del estado de Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. Aguascalientes. 406 p.
- INEGI. 2001. Estadísticas vitales. Cuaderno N° 4. Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. Aguascalientes. 197 p.
- INEGI. 2003a. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. Aguascalientes. 721 p.
- INEGI. 2003b. Anuario estadístico. Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. Aguascalientes. 739 p.
- Itoigawa M., K. Takeya y H. Furukawa. 1991. Cardiotonic action of plumbagin on guinea-pig papillary muscle. *Planta Medica* 57(4): 317-319.
- Itheret, A., P.J. Houghton, E.G. Amooqueye, P.J. Burke, J.H. Sampson y A. Raman. 2004. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 90:33-38.

- Iwu, M.M., A.R. Duncan y C. O. Okunji. 1999. New antimicrobial of plant origin. In: Janick, J. (Ed.). *Perspectives on new crops and uses*. ASHS press. Alexandria. p. 457-462.
- Kamal, G.M.B., B. Gunaheat, A.A. Guntatilaka, M. Uvais, S. Sultambawa y S. Balasubramaniam. 1983. 1,2(3)-Tetrahydro-3', biplumbagin: a naphthalenone and other constituents from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* 22(5):1245-1247.
- Kanegusuku, M., J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, R.A. Yunes, V. Cechinel-Filho, A. Azevedo-Maia, M.M. de Souza, F. Delle-Monache y R. Niero. 2002. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift für Naturforschung* 57c:272-276.
- Kincl, F.A. y J. Rosenkranz. 1956. El aislamiento de la plumbagina de *Plumbago pulchella* Boiss. *Ciencia* 16(1-3):10.
- Koulman, A., W.J. Quax, y N. Pras. 2004. Podophyllotoxin and related lignans produced by plants. In: Ramawat, K.G. (Ed.). *Biotechnology of medicinal plants*. Science Publishers Inc. Enfield. p. 9-36.
- Klug, W.S. y M. R. Cummings. 1999. *Conceptos de Genética*. Ed. Prentice Hall. 5 edic. Madrid. 814 p.
- Krishnasamy, M. y K.K. Purushothaman. 1980. Plumbagin: a study of its anticancer, antibacterial and antifungal properties. *Indian Journal of Experimental Biology* 18(8):876-877.
- Lee, K. H. 2004. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural products leads. *Journal of Natural Products* 67:273-283.

- Lien, E.J. y W.Y. Li. 1987. Anticancer chinese drugs: structure-activity relationships. In: Steiner, R.P. (Ed.). Folk medicine. The art and the science. American Chemical Society. Washington. p. 111-124.
- Linares, E.M., B. F. Peñafiel y R. Bye. 1988. Edit. Limusa. México D.F. 125 p.
- López, L. 2001. Inducción de apoptosis en células HeLa por extractos de *Cupressus lindleyi* Klotzsch. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 35 p.
- López, L., M.A. Villavicencio, A. Albores, M. Martínez, J. de la Garza, J. Meléndez-Zajgla y V. Maldonado. 2002. *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells. Journal of Ethnopharmacology 80:115-120.
- Lozoya, J. 1982. Fuentes bibliograficas sobre herbolaria medicinal en México. Biótica. 7(2): 271-291.
- Mans, D.R.A., A.B. de Rocha y G. Schwartzmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. The Oncologist 5:185-198.
- Martín del Campo, R. 1976. Consideraciones acerca de las plantas medicinales mexicanas y su posible proyección mundial en estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. IMEPLAN. México. 102 p.
- Martínez A. M.A. 1976. Historia de las exploraciones etnobotánicas en plantas medicinales en estado actual del conocimiento en plantas medicinales. IMEPLAN. México. 71-96 p.
- Martínez M. 1990. Las Plantas Medicinales de México. 6ª edc. México D.F. 613 p.
- Márquez Alonso, C., F. L. Ochoa., B. E. Rodríguez y R. M. Essayag. 1999. Plantas medicinales de México. UNAM. México D. F. 119 p.

- Mata Pinzón, S.D., M.A. Marmolejo, J.A. Tascón, M. Zurita, Y. Galindo y G.I. Lozano. 1994. Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana I y II. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 917 p.
- McLaughlin, J.L., L.L. Rogers y J.E. Anderson. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* 32:513-524.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols y J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
- Mitscher, L.A., R.P. Leu, M.S. Bathala, W.N. Wu y J.L. Beal. 1972. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology *Lloydia* 35(2):157-165.
- Mitscher, L.A. 1975. Antimicrobial agents from higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 9:243-282.
- Moreno – Murillo B, V. M. Fajardo y M. Suárez. 2001. Cytotoxicity screening of Some Southamerican Solanaceae. *Fitoterapia* (72): 680 – 685.
- Moura, MD., J.S. Silva, R.G. Oliveira, M.F.F. Diniz y J.M. Barbosa-Filho. 2002. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmáutica Bonaerense* 21(1):67-74.
- Pacheco, D. 1999. Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 582 p.
- Parra, L., A. Silva, R. Guerra y I. Iglesias. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimate of medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice to determine acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395-400.

- Patel, N.G. 1987. Ayurveda: the traditional medicine of India. In: Steiner, R.P. (Ed.) Folk medicine. The art and the science. American Chemical Society. Washington. p. 41-65.
- Pérez-Escandón, B.E., M.A. Villavicencio. 1995. Listado de plantas medicinales del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma de Hidalgo. Pachuca. 45 p.
- Pérez-Escandón, B.E., M.A. Villavicencio y A. Ramírez-Aguirre. 2003. Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. 127 p.
- Porter, C. L. 1967. Taxonomy of flowering plants. N.H. Freeman and Company. New York. 73 p.
- Premakumari P., K. Rathinam y G. Santhakumari. 1997. Antifertility activity of plumbagin. Indian Journal of Medical Research. 65: 829 – 838.
- Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot y J. 1998. Fa (Eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p. 129- 145.
- Ribeiro, S., M. R. Figueiredo., T. V. Aragão y Coelho M. A. 2003. Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin Isolated from *Plumbago* Species. 98(7):959-961.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 p.
- Rzedowski, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot y J. 1998. Fa (Eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p. 129- 145.

- Rzedowski, C. de G. y J. Rzedowski. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. CONABIO. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro. 1406 p.
- Sadtler Standard Spectra. 1987. Sadtler Research Laboratories. Philadelphia.
- Sarukhán, J. 1995. Diversidad biológica. Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM 536-537:3-10.
- Satcher, D. 1995. Emerging infections: getting ahead of the curve. Emerging Infections Diseases 1(1):1-6.
- Schultes, R. 1981. El legado de la medicina popular. Blume, Madrid. 249 p.
- Schultes, R.E. y S. Von Reis. 1997. Ethnobotany. Evolution of a discipline. Dioscorides Press. Portland. 414 p.
- Shimada, H., V.E. Tyler y J.L. McLaughlin. 1997. Biologically active acylglycerides from the berries of saw-palmetto (*Serenoa repens*). Journal of Natural Products 60:417-418.
- Shu, Y.Z. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Products 61:1053-1071.
- Siegel, S. 1993. Estadística no paramétrica. Trillas. México D. F. 344.
- Sökmen, A. 2001. Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. Turkish Journal of Biology 25:343-350.
- Standley, P. C. 1920-1926. Trees and shrubs of Mexico. United States National Herbarium. Vol. 23, part 1. 1721 p.

- Stehman, F.B., P. Rose, B. Greer, M. Roy, M. Plante, M. Penalver, A. Jhingran, P. Eifel, F. Montz y J.T. Wharton. 2003. Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. *Cancer* 98(9):2052-2065.
- Stork, N.E. 1993. How many species are there?. *Biodiversity and Conservation* 2:215-232.
- Sumner, J. 2001. *The natural history of medicinal plants*. Timber Press. Portland. 235 p.
- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 14 (81): 17-30.
- Toledo V. M., R. Becerra., E. Martínez., A. I. Batis y C. H. Ramos. 1995. La selva útil; etnobotánica cuantitativa de los grupos indígenas del trópico húmedo de México. *Interciencia*. 20 (4): 177- 186.
- Toledo, V.M. 1997. New paradigms for a new ethnobotany: reflections on the case of Mexico. In: Schultes, R.E. and S. Von Reis (Eds.). *Ethnobotany. Evolution of a discipline*. Dioscorides Press. Portland. p. 75-88.
- Toledo, V.M. y M.J. Ordoñez. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. En: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p. 739-757.
- The Merck Manual. 1997. Merck &Co. Rahway.
- The World Health Report 2004. World Health Organization. Geneva. 96 p.

- U.S. Cancer Statistics Working Group. 2004. United States cancer statistics: 2001 incidence and mortality. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment. 1990. Unconventional Cancer Treatments. OTA-H-405. U.S. Government Printing Office. Washington. 297 p.
- Valencia-Ortiz, C. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Ed. Trillas. México, D.F. 235 p.
- Villavicencio, M.A. y B.E. Pérez-Escandón. 1992. Actividad de la plumbagina (de *Plumbago pulchella* Boiss.: Plumbaginaceae) como disuasiva de la alimentación de tres especies de Orthoptera. Folia Entomologica Mexicana 86:191-198.
- Villavicencio, M.A. y B.E. Pérez-Escandón. 1994. Concentración de plumbagina en *Plumbago pulchella* Boiss. (Plumbaginaceae) y su efecto en la selección de alimento de larvas de *Arachnis aulaea* (Geyer) (Lepidoptera : Arctiidae). Folia Entomologica Mexicana 90:17-24.
- Villavicencio, M.A. y B.E. Pérez-Escandón. 1995. Listado de las plantas medicinales del Estado de Hidalgo. Ed. Universidad Autónoma de Hidalgo, Pachuca. 45 p.
- Villavicencio, M.A., B.E. Pérez-Escandón y A. Ramírez-Aguirre. 1998. Lista florística del estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. 147 p.

- Villavicencio, M.A., B.E. Pérez – Escandón y A. Ramírez – Aguirre. 2002. Plantas útiles del Estado de Hidalgo II. Universidad Autónoma de Hidalgo. Pachuca. 247 p.
- Waizel-Bucay, J., G. Martínez-Porcayo, M.L. Villarreal-Ortega, D. Alonso-Cortés y A. Pliego-Castañeda. 2003. Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae). Polibotánica, 15:99-108.
- Wanyoike, G.N., S.C. Chabra, C.C. Lang at-Thoruwa y S.A. Omar. 2004. Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 90:129-133.
- Willard, T. 1999. Edible and medicinal plants of the Rocky Mountains and neighbouring territories. Wild Rose College. Calgary. 278 p.
- Yang, X., D.K. Summerhurst, S.F. Kovol, C. Ficker, M.L. Smith y M.A. Bernards. 2001. Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamica* L. using bioassay-guided fractionation. Phytotherapy Research 15(8):676-680.
- Zamora, M. L. I y L. M. P. Barquin. 1997. Estudio de la relación Planta- hombre en los municipios de Mineral del Monte y Mineral del Chico, estado de Hidalgo. Ed. BH Arturo Herrera Cabañas. Pachuca. 196 p.
- Zani, C.L., P.P.G. Chaves, R. Queiroz, A.B. de Oliveira, J. Cardoso, A.M.G. Anjos y T.S.M. Grandi. 1995. Brine shrimp lethality as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Phytomedicine 2(1):47-50.

11. GLOSARIO

Absceso. Acumulación de pus, formado por desintegración de los tejidos.

Alcaloide. Compuesto orgánico nitrogenado.

Antibiótico. Sustancia sintética o producida naturalmente por algunos microorganismos, que impiden la multiplicación de otros microorganismos o los destruye.

Antineoplásico. Droga con capacidad de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos (cáncer) y por lo tanto combatirlos.

Apoptosis. Proceso fisiológico provisto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos. Proceso de autodestrucción celular dirigido por activación de genes (y en la mayoría de las circunstancias en la que ocurre son provechosos biológicamente en el caso del cáncer).

Apostema. Herida o absceso purulento.

Artemia salina. (Crustaceae) crustáceo pequeño de aguas salobres.

Bioensayo. Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia, mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.

Cáncer. Anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un pequeño número de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y la pérdida o inactivación de estos genes da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Los factores ambientales y los virus juegan también un papel importante en las alteraciones genéticas que son necesarias para transformar células normales en cancerosas.

Carcinoma. Tumor maligno originado en el tejido epitelial.

Cirugía. Procedimiento de extirpación.

Citotóxico. Que produce daño a la función o a la estructura celular.

Curva dosis-efecto. Gráfica que relaciona la concentración de la exposición y la magnitud del cambio biológico resultante.

CI₅₀. Concentración de los extractos y fracciones que reduce la viabilidad de las células tratadas al 50% respecto de la célula no tratadas.

CL₅₀. Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia, que se espera que mate al 50% de los organismos.

Droga. Cualquier sustancia que cuando es absorbida por organismos puede modificarles una o más de sus funciones.

Efecto farmacológico. Cantidad de principio activo que produce un efecto tóxico (funcional o estructural). Efecto farmacológico deseado en el 50% de la población estudiada.

Endometrio: Revestimiento interno del útero.

Etanol. Alcohol etílico.

Etnobotánica. Estudios de las bases biológicas, ecológicas y culturales de las interacciones y relaciones entre las plantas y el hombre a lo largo del tiempo de evolución y del espacio sociogeográfico.

Extracto. Mezcla de compuestos secundarios obtenidos después de exponer tejidos vegetales orgánicos o inorgánicos en diferentes condiciones.

Extracto etanólico. Mezcla de compuestos secundarios obtenidos después de exponer tejidos vegetales al efecto del etanol.

Fármaco. Toda sustancia con actividad farmacológica, ya sea natural o de origen semisintética o totalmente sintética.

Farmacología. Acción y efecto de las sustancias químicas de diversa naturaleza y origen, sobre la materia viva.

Flavonoides. Son pigmentos fenólicos presentes en la mayor parte de los órganos vegetales.

Fitoquímico. Estudio de los principios activos de las plantas, especialmente de los metabolitos secundarios y que pueden tener aplicación en la medicina o la industria.

HeLa. Células aisladas de cáncer cervical, proveniente de carcinoma anaplásico de cérvix uterino. La línea celular HeLa fue la primera estirpe epiteloide y aneuploide derivada de un tejido humano.

Infusión. Bebida o preparado que se consigue con la inmersión de ciertos vegetales que contienen principios activos en agua hirviendo.

Llaga. Úlcera. Herida abierta, que tarda mucho tiempo en curar.

Machacar. Golpear con fuerza para triturar algo.

Medicina tradicional. Prácticas y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados en forma individual o en combinación para tener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades.

Metabolitos secundarios. Son sustancias químicas producidas por las plantas que se almacenan en sus tejidos. A menudo tienen la función de evitar que ciertos herbívoros como insectos o animales se las coman.

Neoplasia. Tejido neoformado por proliferación de un tipo celular con carácter tumoral.

Planta medicinal. Cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis farmacéutica.

Principio activo. Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga.

Saponinas. Grupo de glucósidos que se separa para que luego sirva de punto de comparación con las que han sido sometidas a algún tipo de experimento.

Susto: Término popular el que designa cualquier sintomatología por una impresión desagradable.

Testigo. Fracción de una muestra que se separa para que luego sirva de punto de comparación con las que han sido sometidas a algún tipo de experimento.

Toxicidad. Capacidad de producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida.

Tumor. Multiplicación anormal de las células.

Triterpenos. Grupo de compuestos secundarios cuyas moléculas contienen 30 átomos de carbono.

Úlcera. Pérdida de sustancias en la piel o de las mucosas a consecuencia de un proceso patológico de destrucción molecular.

Viabilidad celular. Células vivas.

ANEXO 1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE ETNOBOTÁNICA

CUESTIONARIO

Nombre: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Ocupación: _____ Localidad: _____

NOMBRE COMÚN	Características	Hábitat	Época de floración	Categoría de uso	Padecimiento tratados	Parte utilizada	Modo de empleo
	Hierba ☐ Arbusto ☐ Árbol ☐ Enredadera ☐ Otro ☐	Cerro ☐ Caminos ☐ Entre cultivos ☐ Cultivada ☐ Otro ☐		Comestible ☐ Medicinal ☐ Ornamental ☐ Ritual ☐ Otro ☐		Hojas ☐ Flores ☐ Tallo ☐ Raíz ☐ Fruto ☐ Toda ☐	

NOMBRE COMÚN	Características	Hábitat	Época de floración	Categoría de uso	Padecimiento tratados	Parte utilizada	Modo de empleo
	Hierba ☐ Arbusto ☐ Árbol ☐ Enredadera ☐ Otro ☐	Cerro ☐ Caminos ☐ Entre cultivos ☐ Cultivada ☐ Otro ☐		Comestible ☐ Medicinal ☐ Ornamental ☐ Ritual ☐ Otro ☐		Hojas ☐ Flores ☐ Tallo ☐ Raíz ☐ Fruto ☐ Toda ☐	

NOMBRE COMÚN	Características	Hábitat	Época de floración	Categoría de uso	Padecimiento tratados	Parte utilizada	Modo de empleo
	Hierba ☐ Arbusto ☐ Hierba ☐ Árbol ☐ Arbusto ☐ Enredadera ☐ Árbol ☐ Enredadera ☐ Otro ☐	Cerro ☐ Caminos ☐ Entre cultivos ☐ Caminos ☐ Cultivada ☐ Entre cultivos ☐ Cultivada ☐ Otro ☐		Comestible ☐ Medicinal ☐ Ornamental ☐ Medicinal ☐ Ritual ☐ Otro ☐		Hojas ☐ Flores ☐ Tallo ☐ Flores ☐ Tallo ☐ Raíz ☐ Fruto ☐	
						Toda ☐	
NOMBRE COMÚN	Características	Hábitat	Época de floración	Categoría de uso	Padecimiento tratados	Parte utilizada	Modo de empleo
	Hierba ☐ Arbusto ☐ Árbol ☐ Enredadera ☐ Otro ☐	Cerro ☐ Caminos ☐ Entre cultivos ☐ Cultivada ☐ Otro ☐		Comestible ☐ Medicinal ☐ Ornamental ☐ Ritual ☐ Otro ☐		Hojas ☐ Flores ☐ Tallo ☐ Raíz ☐ Fruto ☐ Toda ☐	
NOMBRE COMÚN	Características	Hábitat	Época de floración	Categoría de uso	Padecimiento tratados	Parte utilizada	Modo de empleo