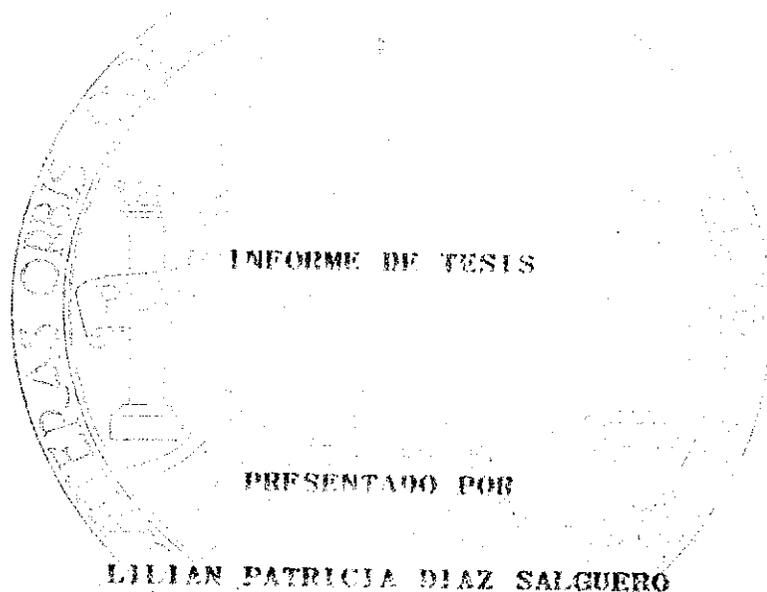


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CITOSTATICA DE CINCO PLANTAS
DE USO MEDICINAL EN EL DEPARTAMENTO DE ALTA VERAPAZ



PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Julio de 1996

R
06
11/11/11
11/11

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

- | | |
|------------|------------------------------------|
| DECANO | Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar |
| Secretaria | Licda. Ana Fortuny de Armas |
| Vocal I | Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez |
| Vocal II | Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán |
| Vocal III | Lic. Rodrigo Herrera San José |
| Vocal IV | Br. Ana Maria Rodas Cardona |
| Vocal V | Br. Hayro Oswaldo García García |

TESIS QUE DEDICO

A: Guatemala

A: la Universidad de San Carlos de Guatemala

A: la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A: Lic. Armando Cáceres Estrada

ACTO QUE DEDICO

A Dios

A mis padres: Alejandro Díaz Molina -
Argelia Salguero López

A mis hermanos: Silvia, Liseth, Alejandro y Jorge

A mis abuelos: Olivia Molina de Díaz
Roberto Díaz Baldizón

A mi esposo: Rafael Torres Meza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Lic. Armando Cáceres, asesor de Tesis, y a la Licda Elsa Jauregui por la ayuda recibida, tanto en la preparación teórica como en la parte experimental del presente trabajo de Tesis.

Manifiesto también mi agradecimiento al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos -FARMAYA- por el financiamiento y la colaboración en el desarrollo de la parte experimental.

INDICE

	Pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	4
3. ANTECEDENTES	6
3.1 Determinación de la actividad citostática	
<i>in vitro</i>	7
3.1.1 Neoplasia	7
3.1.2 Transformación neoplásica	7
3.1.3 Ensayos farmacológicos	10
3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.3 Agentes citostáticos de origen animal	18
3.3.1 Organos vegetales de utilidad terapéutica	18
3.3.2 Compuestos medicinales	19
3.3.2.1 Alcaloides	19
3.3.2.2 No alcaloides	25
3.4 Plantas en estudio	26
3.4.1 <i>Alcalypha arvensis</i> Poepp. y Endl.	27
3.4.1.1 Descripción botánica	27
3.4.1.2 Usos etnomédicos	28
3.4.2 <i>Cornutia grandifolia</i> Schelcht y Cham.	28
3.4.2.1 Descripción botánica	29
3.4.2.2 Usos etnomédicos	29
3.4.3 <i>Eupatorium semialatum</i> Benth	30
3.4.3.1 Descripción botánica	30
3.4.3.2 Usos etnomédicos	31
3.4.4 <i>Neurolaena lobata</i> R. Br.	31
3.4.4.1 Descripción botánica	32
3.4.4.2 Usos etnomédicos	32
3.4.4.3 Química	32

3.4.4.4 Actividades biológicas	33
3.4.5 <i>Polymnia maculata</i> Cav.	33
3.4.5.1 Descripción botánica	33
3.4.5.2 Usos etnomédicos	34
4. JUSTIFICACIONES	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo General	36
5.2 Objetivos Específicos	36
6. HIPOTESIS	37
7. MATERIALES Y METODOS	38
7.1 Universo	38
7.2 Medios	38
7.2.1 Recursos Humanos	38
7.2.2 Recursos Materiales	38
7.3 Procedimientos	40
7.3.1 Recolección e identificación de las plantas	40
7.3.2 Obtención de los extractos	40
7.3.3 Preparación de los extractos acuosos	42
7.3.4 Preparación del cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	43
7.3.5 Actividad antibiótica de los extractos	43
7.3.6 Bioensayo	45
7.4 Diseño Experimental	47
8. RESULTADOS	49
9. DISCUSION DE RESULTADOS	55
10. CONCLUSIONES	57
11. RECOMENDACIONES	59
12 REFERENCIAS	60

1. RESUMEN

El progreso de la quimioterapia se ha fundado en el desarrollo de técnicas de estudio especiales con el fin de lograr sustancias que puedan atenuar las consecuencias del cáncer.

El estudio realizado tuvo como objetivo determinar la actividad citostática de cinco plantas nativas de Alta Verapaz a través de la inducción de tumores en discos de papa. Para esto se utilizó *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria que contiene dentro de su información genética un plásmido inductor de tumores.

Para la realización del bioensayo se prepararon extractos acuosos y etanólicos de la plantas en estudio; papa inmadura (verde, tierna), cosechada en Alta Verapaz, se observó que a diferencia de las otras variedades ensayadas, en éstas el crecimiento tumoral era uniforme, que los discos no mostraban ninguna contaminación y que en general su desarrollo era excelente.

El ensayo se realizó con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* de 48 hrs. de incubación en un medio de cultivo que contiene sucrosa y extracto de levaduras. Se hicieron cinco corridas de cada extracto, que hacían un total de 25 tratamientos (en cada caja se colocaron cinco discos). Se inoculó con el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, el extracto de la planta y el solvente que podía ser dimetilsulfoxido (DMSO) para los extractos etanólicos o agua

para los extractos acuosos. Los controles sólo contenían el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* y el solvente DMSO.

Se incubaron durante 11 días luego de los cuales se hizo una primera lectura, se esperó 10 días más para hacer la lectura final. Los resultados fueron expresados como el número de tumores obtenidos.

Debido a que existió mucha variabilidad entre los resultados, no se utilizó Análisis de Varianza de dos vías, sino su alternativa no paramétrica, la prueba de Friedman. En donde se compararon las medianas de los resultados obtenidos por extracto frente a un comparador que ayudaría a determinar si existía o no diferencia significativa entre los grupos frente al control.

Con ésto se pudo determinar que los extractos etanólicos de *Cornutia grandifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Alcalypha arvensis*, *Neurolaena lobata* y *Polymnia maculata* presentan diferencia significativa ($p < 0.05$), lo que indica una probable actividad citostática. De los extractos acuosos sólo *Eupatorium semialatum* presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) a los 21 días de incubación.

Todas las plantas presentaron por lo menos en uno de los extractos diferencia significativa ($p < 0.05$), a los mismos sería necesario completar su estudio, realizando la investigación de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento tumoral, con lo que se conocería otra de las actividades de tan valiosas plantas.

2. INTRODUCCION

Una célula tumoral transplantedada o inducida representa una configuración extraña para el hospedero en el cual se presenta, más agobiante que la mortalidad, es la tensión física y emocional que provoca en el ser humano. Hoy se sabe mucho acerca de los orígenes, prevención y tratamiento del cáncer, ello ha mejorado las perspectivas en parte, ya que el proceso que implica la síntesis de drogas terapéuticas hace que sean de poco alcance debido a su alto costo. Estas drogas, preparadas sintéticamente toman como modelo la estructura molecular del principio activo de productos naturales a los que se les han atribuido propiedades antineoplásicas (1).

El uso de productos naturales crudos para el tratamiento del cáncer se remonta a la antigüedad, existen aproximadamente 3,000 especies de plantas que han sido reportadas por ser usadas de alguna manera en el tratamiento del cáncer. Su uso moderno en cambio tiene una corta historia de 30 años y como resultado de diversas investigaciones en el Instituto Nacional contra el Cáncer en los Estados Unidos, actualmente existen 50 drogas clínicamente activas para el tratamiento del cáncer y otras 100 en varias fases de desarrollo preclínico, algunas de origen natural y otras diseñadas sintéticamente basándose en un modelo del principio activo (1).

PROGRAMA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Uno de los argumentos que dio origen a los esfuerzos por encontrar nuevas drogas de plantas fue el descubrimiento de los alcaloides con actividad antimicótica y antineoplásica de *Catharanthus roseus*, vincristina y vinblastina, que junto con sus derivados son los más importantes clínica y comercialmente debido a que su aplicación es bastante exitosa en el tratamiento de leucemias y enfermedad de Hodgkin (2).

En 1977 el bioensayo de tumorigénesis de la corona de agallas en discos de papa fue propuesto como un sistema ideal para investigaciones de la acción cáncer-anticáncer de ciertas drogas, aprovechando la actividad *in vitro* de *Agrobacterium tumefaciens* de provocar tumores en discos de papa y por presentar similitud en el mecanismo de tumorigénesis, tanto en células vegetales como en animales (3).

En el presente trabajo se realizó un pretamizaje para determinar la actividad citostática de los extractos de cinco plantas (*Acalypha arvensis*, *Cornutia grandifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Neurolaena lobata* y *Polymnia maculata*) nativas del departamento de Alta Verapaz, utilizando el bioensayo *in vitro* de la corona de agallas, para ello se indujeron tumores en discos de papa (*Solanum tuberosum*) con *Agrobacterium tumefaciens*.

3. ANTECEDENTES

Las neoplasias constituyen una patología del crecimiento caracterizada por una proliferación excesiva e incesante de células. Prácticamente todos los tipos de células humanas producen innumerables variedades de neoplasias. Este proceso no se restringe al ser humano unicamente, porque también se forman neoplasias en la mayoría de los vertebrados, en algunos insectos y plantas, su aparición en estos otros seres vivientes ha sido útil para estudiar su génesis y comportamiento (4).

Los tumores deben haber existido en todos los tiempos y en seres humanos y animales del mundo entero, pero los datos más antiguos que se poseen en la actualidad se refieren a tumores en huesos humanos de épocas prehistóricas y de los inicios de la historia propiamente dicha. El Ramayana, manuscrito de la antigua India, es el primer registro histórico que menciona tumores malignos. En él se alude por primera vez a un tratamiento antitumoral, sea a bisturí (cirugía) o con un compuesto arsenical (quimioterapia). Los egipcios fueron los primeros en reconocer que los tumores originados en diversas partes del cuerpo diferían en cuanto a su comportamiento y requerían tratamiento distinto (4).

3.1 Determinación de la actividad citostática *in vitro*

3.1.1 Definición

Neoplasia es una proliferación celular persistente, anormal y relativamente autónoma que obedece a un defecto celular permanente transmitido a la progenie de células. El defecto es inducido por un factor o combinación de varios factores y, una vez que se instala, suele tornarse independiente de éstos (4).

Las neoplasias suelen formar un bulto, masa o tumoración. El término tumor, de acuerdo con la usanza antigua, significa toda tumefacción, cualquiera que fuese la causa, pero en la actualidad se le utiliza casi con exclusividad como sinónimo de neoplasia (4).

3.1.2 Transformación neoplásica

Los principales cambios fenotípicos característicos de la transformación neoplásica, según Robins, son:

3.1.2.1 Pérdida de la reacción a controles del crecimiento.

Las células neoplásicas presentan una proliferación desordenada.

3.1.2.2 Cambios morfológicos.

Las células neoplásicas varían desde las bien diferenciadas, notablemente semejantes a las equivalentes normales, hasta las completamente indiferenciadas, de modo que es imposible por examen

microscópico observar las células que dieron origen al tumor

3.1.2.3 Transplantabilidad. Las células neoplásicas pueden cultivarse fácilmente en medios de cultivo o huéspedes singénicos apropiados. En cambio, a excepción del fibroblasto, es muy difícil y a veces imposible lograr cultivos *in vitro* de células normales.

3.1.2.4 Las células cancerosas son inmortales. Con cuidados adecuados pueden subcultivarse *in vitro* indefinidamente o transplantarse por métodos quirúrgicos de un hospedero apropiado a otro casi sin límite de tiempo. Muchas líneas celulares tumorales estándar se han conservado durante mucho tiempo.

3.1.2.5 Pérdida del anclaje para el crecimiento. La mayor parte de las células neoplásicas malignas se desarrollan fácilmente en medios semisólidos, incluso líquidos, lo que es imposible en células normales mantenidas *in vitro*.

3.1.2.6 Pérdida de la inhibición por contacto. Cuando se desarrollan en cultivo, las células normales forman una capa monocelular en la superficie del medio de cultivo. Al ponerse en contacto entre sí, cesan la división celular ulterior y la movilidad en dirección del contacto de las células. Las células tumorales no reaccionan a estos controles y crecen desordenadamente, apilándose unas sobre

otras para crear masas enmarañadas de muchas capas. Una vez más se deduce que se pierden las señales reguladoras de célula a célula.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3.1.2.7 Disminución de la inhibición que depende de la densidad del crecimiento celular. Uno de los cambios característicos de la transformación neoplásica es el descenso de los requerimientos de componentes del medio (proteínas, vitaminas, minerales, etc.), lo cual significa disminución de la inhibición que depende de la densidad de crecimiento celular. Esta menor dependencia podría guardar relación con el aumento del índice de transporte transmembrana de sustratos celulares vitales.

3.1.2.8 Adquisición progresiva del fenotipo canceroso. Los tumores consisten en muchas subpoblaciones de células que tienen atributos cariotípicos, antigénicos y de otra índole agresivos que son diferentes de las células normales. En modelos experimentales, los tumores benignos con el tiempo pueden convertirse en malignos. En experimentos de clonación se ha comprobado que en una neoplasia determinada algunas células tienen mayor capacidad para dar metástasis que otras. La transformación neoplásica es un fenómeno dinámico.

3.1.2.9 Irreversibilidad del fenotipo canceroso. Se acepta en general que una vez que la célula ha experimentado transformación neoplásica, el proceso es irreversible y

heredable. La progresión tumoral, casi siempre es en dirección de mayor agresividad. En cultivo celular, según dosis-tiempo, algunas células adquieren determinados atributos morfológicos y funcionales de transformación para después volver a ser células aparentemente normales.

3.1.2.10 Capacidad para formar cáncer cuando se implantan en hospederos apropiados. En última instancia, el atributo fenotípico de la célula que la caracteriza como transformada, es la capacidad para originar cáncer cuando se implanta en un hospedero apropiado. Con frecuencia, en el medio de cultivo se advierten muchos de los otros atributos mencionados, lo cual sugiere que la célula ha experimentado transformación cancerosa, pero cabe preguntarse si se desarrollará en el hospedero, si invadirá, si dará metástasis y en última instancia si producirá una neoplasia maligna. Esta es la prueba más crítica de transformación neoplásica (5).

3.1.3 Ensayos farmacológicos

Dada la frecuencia y mortalidad de los tumores malignos, su tratamiento constituye uno de los problemas más serios de la medicina, esto ha dado lugar a una investigación intensiva con el fin de lograr sustancias que puedan curar o por lo menos atenuar las consecuencias de estos temibles procesos; desde luego, eso ha requerido el desarrollo de técnicas de estudio especiales, en las que se funda el

progreso de la quimioterapia (6).

Estas técnicas de ensayo farmacológico deben realizarse sobre una gran variedad de tumores y dadas las diferencias de los mismos es necesario unificarlos en el terreno internacional, tipificar los tumores, las condiciones de transplante y las técnicas de investigación de la actividad antineoplásica; dichas investigaciones deben realizarse en instituciones dotadas de todos los elementos modernos y de personal especializado (6).

El efecto deletéreo producido por las drogas antineoplásicas en las células o acción citotóxica, ya se trate de células normales o neoplásicas, puede estudiarse en cultivos de tejidos en líquidos nutritivos; para evidenciar la acción puede contarse el número de células sobrevivientes o bien emplear placas de agar con cilindros que contienen la droga, al igual que en el caso de los antibióticos (en los que se prueba la susceptibilidad de las bacterias por medio de discos impregnados con este y luego se mide el halo de inhibición); en este caso se añade Azul de Metileno que se decolora con las células vivas y permanece azul si están muertas (tinción supravital). En cultivos de tejidos también puede observarse la acción de las drogas sobre las distintas fases de la mitosis, aún con microscopio eléctrico (6).

Una búsqueda intensa de plantas con actividad antitumoral fue iniciada por el Instituto Nacional contra el Cáncer (INC) en Estados Unidos desde 1957. Más de 120,000 extractos de plantas, de unas 35,000 especies han sido

tamizadas, de las cuales se descubrió la vincristina, vinblastina, vindicina y derivados, podofilotoxinas, 10-hidroxicampdotecina, indacina-n-oxidasa, filantocida, harringtonina y homorringtonina. Los métodos de bioensayo para el tamizaje y examen de extractos han variado a través del tiempo, pero eventualmente se han desarrollado ensayos *in vivo* contra leucemias 3PS y tamizajes *in vitro* para carcinoma humano nasofaríngeo 9KB. Los ensayos para lleucemias 3PS fueron conducidos por el personal del INC y para obtener los resultados óptimos se esperó 2 meses o más (7).

El método de actividad *in vivo* para leucemias 3PS se reconoce como el más satisfactorio de los métodos de tamizaje primario, siendo especialmente útil para predecir el potencial de los agentes antileucémicos (7).

Aunque los métodos de tamizaje de plantas antitumorales han sido sujetos a continuos debates, los marcadores cromosómicos e izoenzimas de las líneas de células 9KB se mantienen en el banco de tumores del INC y de la American Type Culture Collection (ATCC); estas células reaccionan bien en el tamizaje y fraccionamiento de los extractos de plantas, incluyendo indacina-n-oxidasa, que es el más importante agente antitumoral, el cual pudo ser descubierto utilizando estas células para el pretamizaje, no se ha obtenido información estadística que indique la reproducibilidad de los resultados *in vitro*, típicos de la citotoxicidad (7).

Los ensayos de citotoxicidad son caros y es

necesario un alto grado de entrenamiento especializado, técnicas asépticas, equipo y espacio especial, tiempo completo del personal y el uso de sueros animales; todo ello reduce la factibilidad del método (7).

El bioensayo *in vivo* 3PS es comparativamente más caro además de que el tiempo es más prolongado y las complicaciones son varias, algunas veces los ensayos no son reproducibles como un tamizaje antitumoral primario (7).

El tamizaje 3PS se discontinuó en 1986 por presentar resultados insatisfactorios *in vivo* aunque los resultados *in vitro* son aceptables. El programa de desarrollo terapéutico del INC ha producido un nuevo tamizaje primario *in vitro* que abarca un conjunto de cerca de 50 tipos de células cancerosas, incluidos melanomas de pulmón, colon y tumores malignos del seno. Este sistema se dirige específicamente a identificar células con toxicidad selectiva. Esto es lo esperado, debido al papel que juegan los productos de plantas en el descubrimiento potencial y prototipos para el desarrollo de nuevas drogas. En cambio, la alta capacidad de pretamizaje 3PS *in vivo* se ha reemplazado por el nuevo sistema de compuestos que presentan actividad en dicho pretamizaje *in vitro* que consiste en un conjunto de células tumorales humanas. Los compuestos que presentan actividad en dicho pretamizaje *in vitro* se clasifican como selectivos (citotoxicidad en un tipo específico de células), los compuestos selectivos posteriormente deben seguir una evaluación subsecuente con conjuntos tumorales *in*

vivo, especialmente contra células típicas con actividad *in vitro* (7).

El desarrollo de un simple pretamizaje antitumoral, usando el conveniente y barato sistema de extractos de plantas antitumorales, ofrece algunas ventajas en la búsqueda de nuevas drogas anticáncer, así como la inducción de tumores por ciertos microorganismos (*A. tumefaciens*). Inicialmente la formación del tumor (tumorigénesis) de la corona de agallas sobre discos de papa fue propuesta para la transformación de procesos como un buen sistema. Este mismo tumor inducido en arbustos de guisantes presentó más promesas en la acción cáncer-anticáncer de ciertos antibióticos antitumorales. Combinando estas ideas, se demostró que la iniciación de este tumor sobre discos de papa, presentaba una correlación con componentes y extractos de plantas los cuales pueden ser activos contra leucemias SPS. Cuando se agregó un medio enriquecido la viabilidad de la bacteria no fue alterada. El efecto del tumor, es independiente de la antibiosis, aunque si los antibióticos se presentan a concentraciones elevadas pueden ser activos contra *A. tumefaciens* confundiendo el análisis con falsos positivos. La predicción del tumor puede detectarse profilácticamente (anticarcinogénesis) o por medio de la actividad terapéutica (carcinostático), pero el método del tumor de la corona de agallas puede detectar ambas actividades (7).

Se han realizado ciertos análisis modificados sobre una serie de componentes activos naturales (homoarringtonina,

buovarina, vincristina y trewiasina) de 12 extractos de plantas con sospecha de tener actividad 3PS, además en semillas de 41 especies de *Euphorbiaceae*. Todos los compuestos conocidos fueron significativamente activos con buovardina y vincristina, presentando una nítida relación dosis-respuesta entre 2.5 y 10ug por disco (7).

Es así también como en 1988 MacRae, Hudson y Towers, realizaron estudios sobre varias actividades farmacológicas de especies amazónicas de la familia *Euphorbiaceae* entre las que se encontraba el ensayo del tumor de la corona de agallas, modificado por Ferrigni en 1982, observándose que de las 34 especies analizadas el 91 por ciento fueron efectivas en la inhibición del tumor, estableciéndose que el ensayo puede predecir la habilidad de los extractos de inhibir el crecimiento de células de leucemia 3PS *in vivo* (8).

3.2 Agrobacterium tumefaciens

Según Wright, Hill y otros cuando se aísla del hospedero presenta movilidad, pero no cuando se observa en gota pendiente. En realidad existen cepas móviles y otras que no lo son (9).

Son pequeños bastones (0.9x1.5-3.0 μ), Gram negativo, con cuatro flagelos peritricos, no forman esporas y su habitat son suelos, tallos y raíces (10).

Absorbe el Rojo Congo y Azul de bromotimol, utiliza compuestos nitrogenados simples como nitrato de potasio, crece en agar Selenito de Sodio y no forma ácido de azúcares (9).

Las colonias son blancas, convexas, de borde entero. No obstante se ha comprobado una variación de esta característica, así Gainor y Price estudiaron seis colonias distintas de la clásica, notando colonias S y R, unas mucoides, otras acuosas, comprobando también que las reacciones serológicas, de aglutinación y resistencia a bacteriófagos era distinta en las diversas colonias (9).

El género *Agrobacterium* comprende organismos que causan crecimiento de tumores en los tejidos vegetales, originando enfermedades denominadas corona de agallas y raíz pilosa en muchos de los géneros vegetales (11).

Aunque las plantas a menudo forman tejidos desorganizados cuando se lesionan, denominados callos, el crecimiento inducido por *Agrobacterium tumefaciens* es diferente, en este caso el callo tiene un crecimiento incontrolado que semeja un crecimiento tumoral en animales, lo que ha dado lugar a una considerable serie de investigaciones con la esperanza de encontrar un modelo de la forma que el cáncer ocurre en el ser humano. En general, el crecimiento de plantas en cultivo de tejidos requiere de hormonas específicas vegetales, pero el tejido corona de agalla crece sin dichas hormonas. El crecimiento de la

corona de agallas puede ocurrir aún cuando las bacterias hayan sido eliminadas en forma experimental de las células vegetales. Por esto, una vez que *A. tumefaciens* ha iniciado el proceso tumoral su presencia ya no es necesaria, esto ha dado lugar a la realización de muchas investigaciones para averiguar si cualquier información genética ha sido transferida a la planta (9).

La corona de agallas o cáncer de las plantas ataca árboles frutales como el durazno, rosales, remolacha, papa y muchas otras plantas, en las cuales corta el flujo de agua y nutrientes, marchitándolas y por último matándolas. La corona de agallas tiene una distribución cosmopolita (11).

Esta bacteria tiene la capacidad única de transformar las células normales de las plantas en células tumorales. Cuando se establecen las células tumorales, continúan produciendo células anormales independientemente de los microorganismos bacterianos patógenos (11).

La bacteria contiene un plásmido de gran tamaño que es inductor de tumores (TI), el cual lleva información genética al ADN de transferencia para transformar el ADN de células normales y convertirlas en células autónomas cancerosas y tumorales. Sin embargo, los mecanismos de formación de tumores en plantas y animales tienen en común la incorporación intracelular de ácidos nucleicos extraños que las drogas antitumorales bien podrían inhibir la iniciación y crecimiento del tumor en ambos casos (7).

En la actualidad está establecido que este gran

plásmido Ti debe existir en las células de *A. tumefaciens* que inducen la formación del tumor y una porción restringida de este plásmido se transfiere por medio de la transformación de las células vegetales. Este plásmido constituye cerca del 5 por ciento del ADN bacteriano total y contiene no sólo el rasgo para la formación de tumor, sino también varios otros de los cuales el más interesante se relaciona con la producción y utilización de dos aminoácidos poco frecuentes (octopina y nopalina). Después de la infección se incorpora una porción del plásmido a la célula tumoral, como puede demostrarse por experimentos de hibridización con ARNm y plásmido ADN del tumor. Por el empleo de enzimas de restricción se ha demostrado que sólo una pequeña porción del plásmido, equivalente a casi 10 a 20 genes, se transcribe por la planta (11).

A. tumefaciens es la única bacteria conocida que produce tumores vegetales, cuyo desarrollo está muy relacionado al desarrollo de cualquier forma de cáncer en mamíferos (11).

3.3 Agentes Citostáticos de Origen Vegetal

3.3.1 Organos vegetales de utilidad terapéutica

Aunque a veces toda la planta tiene uso medicinal, lo más común es que los principios activos se concentren en ciertos órganos. Generalmente son las hojas las partes que

resultan más ricas en glucósidos, alcaloides y aceites esenciales de aplicación médica, ya que constituyen los órganos de mayor actividad química, donde se lleva a cabo la síntesis de compuestos orgánicos (12).

El tallo sirve fundamentalmente como estructura de soporte y órgano de conducción de la savia bruta y elaborada que en algunas especies puede contener sustancias medicinales. Las yemas terminales de los tallos de especies perennes, donde se encuentran tejidos embrionarios de los que crecerá la planta también acumulan compuestos de utilidad terapéutica. En algunas flores los principios activos se encuentran asociados a los pigmentos que dan color a los pétalos. La cáscara y las semillas por su parte suelen acumular importantes reservas de vitaminas, ácidos orgánicos y azúcares que sirven para tratar enfermedades y alteraciones causadas por deficiencias nutricionales. Las raíces y otros órganos subterráneos, como los rizomas, bulbos y tubérculos, suelen acumular ciertas cantidades de alcaloides (12).

3.3.2 Compuestos Medicinales

A partir de aminoácidos y ácidos grasos, las células vegetales pueden formar miles de compuestos o metabolitos secundarios que tienen propiedades medicinales. Entre estos se encuentran los glucósidos, los aceites esenciales y los alcaloides (12). Los agentes antitumorales de origen vegetal suelen agruparse como alcaloides y no

alcaloides (2).

3.3.2.1 Alcaloides

Es extremadamente difícil definir a los alcaloides porque no presenta un grupo homogéneo de compuestos con actividad química, bioquímica o fisiológica similar. Aunque pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de la estructura química de donde derivan. En general son compuestos nitrogenados, comunmente de sabor amargo, cuya función en las plantas no está bien determinada, aunque se cree que se trata de desechos (12).

El término alcaloide fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819 y se aplica a los compuestos de origen vegetal que tienen propiedades alcalinas. En todo estos compuestos su naturaleza básica se deriva de la presencia del nitrógeno amínico (13,14).

3.3.2.1.1 Taxol

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

El taxol ha sido aislado de varias especies del género *Taxus* incluyendo *T. brevifolia*, *T. baccata* y *T. cuspicata*, posee una actividad comprobada contra melanoma B16 y el sistema xenográfico mamario, una actividad moderada contra leucemias L1210, P388 y P15334 y xenografías de colon CX1 y pulmón LX1. Este alcaloide es efectivo por un mecanismo diferente al de otras drogas anticáncer que usualmente actúan sobre el ADN, ARN o la síntesis de proteínas. Parece ser que actúa como inhibidor de la mitosis

(2).

Debido al bajo contenido de alcaloides en las diferentes especies de *Taxus* y a la gran necesidad de sintetizar derivados del taxol para investigaciones farmacológicas, la síntesis total de este tipo de productos atrae bastante la atención (2).

3.3.2.1.2 Pirrolizidina

Otro tipo de alcaloides importantes son los del grupo pirrolizidina a los que se les han atribuido diversas actividades. Por un lado son potentes agentes anticáncer, hipotensores, anestésicos locales, antiespasmódicos y antiinflamatorios y por otro lado varios alcaloides de este tipo son altamente carcinogénicos y hepatóxicos (2).

A este grupo corresponde la indacina-n-oxidasa, que es el que mejor actividad ha presentado contra melanoma B16, sarcoma M5076, leucemia P388 y carcinosarcoma Walker 256 (2).

Las pirrolizidinas y derivados se han aislado de varias especies de *Senecio*, entre las que se puede mencionar a *S. grisbachii*, *S. subulatus* y *S. latifolius* y *Hackelia floribunda* (2).

3.3.2.1.3 Acronicina

Es el primer alcaloide extraído de la corteza de *Acronychia baueri* que ejerce un amplio espectro de actividad antineoplásica *in vivo* (2).

3.3.2.1.6 Camptodecina

La camptodecina y alcaloides relacionados son una serie de alcaloides bien establecidos como agentes antitumorales. La 10-hidroxicamptodecina originalmente aislada de *Camptotheca acuminata*, es un potente agente anticáncer contra varias malignidades del hombre y ampliamente usada en China para el tratamiento de cánceres hepáticos, gástricos y leucemias (2,15).

Una de las acciones más importantes es que es un fuerte inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos en células animales (2).

3.3.2.1.7 Elipticina

Comprende uno de los más importantes grupos de alcaloides antitumorales. La elipticina y 10-metoxielipticina ejerce marcada actividad contra leucemias L1210, P388 y P1534, el mieloma X5563 y el linfosarcoma Gardner. El mecanismo de su actividad antitumoral se relaciona con su estructura planar y la habilidad de intercalarse con pares de bases del ADN (2). Tanto estos alcaloides como sus derivados poseen un amplio espectro de actividad antitumoral (2).

3.3.2.1.8 Emetina

La emetina es el alcaloide más importante de *Cephaelis ipecacuanha*, los derivados 2,3-dihidro son usados clínicamente en el tratamiento de amebiasis y estudios

recientes han comprobado que es un efectivo agente antitumoral especialmente contra leucemias L1210 y P388 (2).

3.3.2.1.9 Fenantroindolizidina y Fenantroquinolizidina

A estos corresponde un pequeño grupo de alcaloides, cada uno formado biogénicamente de fenilalanina y tirosina (2).

La actividad antitumoral de los alcaloides representativos de este grupo (tilocrebina, tilofotina y criptopleurina) es más débil que la emetina, siendo su mecanismo de acción muy similar. Algunos de estos alcaloides se aíslan de *Tylophora asthmatica* y *Tylophora hirsuta*, *Pergularia pallida* y *Cissus rheifolia* (2).

3.3.2.1.10 Benzo (c) fenantridina

Estos alcaloides son de amplia distribución en la naturaleza. La ambicina que pertenece a este grupo, se aísla de *Corydalis ambigua* y de la corteza de *Fagaropsis angolensis*, es un potente agente contra leucemia linfocítica P388 (2).

La habilidad de estos alcaloides y sus derivados de formar complejos con el ADN, ha sido objeto de amplios estudios, algunos de ellos, como la sanguinarina son importantes hepatóxicos (2).

3.3.2.1.11 Amarillidaceae

Los alcaloides aislados de *Crinum asiaticum*, *Haemanthus kalbreyeri* y *Stenbergia leutea* pertenecen a este grupo y han presentado gran actividad contra la viabilidad de las células de la ascitis así como actividad bacteriostática (2).

3.3.2.1.12 Bisindoles

Pocas plantas han despertado tanto el interés de farmacólogos y médicos como lo ha hecho *Catharanthus roseus*; contiene dos alcaloides, la vincristina y la vinblastina, que han demostrado ser potentes agentes para el tratamiento del cáncer, especialmente para las leucemias y la enfermedad de Hodgkin (12).

Hasta hoy se han identificado cerca de 70 de los alcaloides que contiene y muchos de ellos con propiedades tan importantes como hipotensores e hipoglicemiantes (12,15,16).

3.3.2.2 No alcaloides

A este grupo pertenecen compuestos que pueden ser glucósidos, aceites esenciales u otros. Los glucósidos son compuestos llamados también heterósidos, formados por la combinación de glucosa y otro compuesto, al que se le da el nombre de genérico de aglucona o genina. Los aceites esenciales por otro lado son compuestos a los que deben los vegetales sus olores característicos, se pueden encontrar

como esencias o resinas (12).

3.3.2.2.1 Ligninas

Entre los compuestos más importantes de este grupo se encuentran la podofilotoxina y compuestos relacionados, aislados de plantas de la familia *Berberidaceae* y *Cupressaceae*. Son agentes citotóxicos muy fuertes por lo que su uso es bastante restringido a dosis mínimas, sin embargo, derivados semisintéticos han probado ser bastante efectivos con toxicidad moderada (2).

3.3.2.2.2 Quassinoides

Este es un grupo de triterpenoides y derivados, distribuidos limitadamente a plantas de la familia *Simaroubaceae* (2,15).

3.4 Plantas en estudio

Desde tiempo inmemorial el hombre ha recurrido a las plantas en busca de curación para sus males y alivio a sus dolores. Esta búsqueda lo ha hecho profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (12).

Es así en Guatemala y especialmente en Alta Verapaz, donde los conocimientos de las plantas para el

tratamiento de muchos padecimientos han hecho de esta región una importante zona etnobotánica, pues estos han trascendido a través del tiempo y hoy en día son aún remedios caseros (17).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3.4.1 *Acalypha arvensis* Poepp. y Endl. (Euphorbiaceae)

Hierba que crece entre matorrales húmedos, campos o riveras, a menudo como hierba indeseable en terrenos cultivados o en terrenos baldíos (18).

En Guatemala puede encontrarse en los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Petén, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos y Huehuetenango; así mismo en el Sur de México, Honduras, Costa Rica, Panamá y Sudamérica tropical (19).

3.4.1.1 Descripción botánica

Planta anual, ascendente, usualmente de 50 cm. de altura, simple o ramificada; el tallo algunas veces extendido, no forma raíces en los nudos, con tricomas largos y suaves expandidos ampliamente o puede ser que se presente sin ningún tipo de indumento, densamente pubescente en las partes jóvenes; hojas membranosas sobre peciolo de 2 a 3.5 cm de largo, ovalo-romboides o rombico-lanceloladas de 3 a 7 cm de largo, obtusas en la base, palmatinervada, crenadas o aserradas, pilosas en ambas superficies, algunas veces sin ningún tipo de indumento; espigas escasamente pedunculadas,

axilares, andróginas, de 1.5 a 2.5 cm de longitud por 10 a 13 mm de ancho, florífero escasamente estaminado en el ápice de la flor; las superiores completamente pistiladas y las inferiores estaminadas; frutos con brácteas de 5 mm de ancho, 4 a 7 lóbulos en la base, triangulados u ovaes, filiform-acuminado, cubierto por prolongaciones más o menos duras; estilo lacinulado; cápsula de 2 mm de ancho, pilosa; semilla ovoides, de 1 mm de largo (18-20).

3.4.1.2 Usos etnomédicos

Planta conocida en toda Guatemala con el nombre de "Hierba del cáncer", muy usada como medicina casera. Existe en general la creencia que es un remedio para el cáncer, también usada en el tratamiento de picaduras de insectos ponzoñosos, inflamaciones cutáneas y enfermedades venéreas (19).

3.4.2 *Cornutia grandifolia* Schlecht y Cham. (Verbenaceae)

Arbusto que crece entre matorrales húmedos o muchas veces en bosques densos en segundo crecimiento, entre 150 y 1300 mts. sobre el nivel del mar; crece en Alta Verapaz, Guatemala, Izabal, Sacatepéquez; también en México y de Honduras a Panamá (21).

3.4.2.1 Descripción botánica

Arbusto de 5 mts de alto, las ramas densamente velutino-tomentosas (como aterciopelado); hojas sobre fuertes peciolas de 1 a 5 cm de largo, lámina ovalada, ovalo-elíptica u ovalo-oblongas de 7 a 30 cm de largo y 5 a 19 cm de ancho, acuminadas, atenuadas en la base y prolongadas, con los extremos dirigidos hacia abajo, usualmente densamente velutino-tomentoso sobre ambas superficies, más pronunciado en parte anterior (raramente solo puberulento), el margen usualmente dentado, es raro que esté entero; inflorescencias terminales, paniculadas, de 15 a 40 cm de longitud, las flores son numerosas, corto-pediculares, la cima pedunculada, raquis, pedúnculo y pedicelo, usualmente velutino-tomentoso; cáliz poco profundo a la antesis, cupuliforme y truncado, algunas veces dentado de 1 a 2.5 mm de largo, densamente corto-pubescente; el fruto usualmente en forma de disco, cúpula poco profunda, corola azul brillante a púrpura profundo, puberulenta; el tubo abrupta y fuertemente incurvado, de 6 a 9 mm de largo por 2.5 a 5 mm de ancho, más amplia en la base y a menudo en forma de bolsa, el labio inferior del limbo es por lo regular abaxial o ventral del tubo; el ovario densamente pubescente; frutos subglobosos de 3 a 5 mm de largo, pubescente o puberulento (20,21)

3.4.2.2 Usos etnomédicos

En Alta Verapaz la decocción de las hojas es utilizada como antirrábico (21), para la gastritis y muy poco

conocido su uso contra el cáncer, aunque popularmente se menciona (21).

3.4.3 *Eupatorium semialatum* Benth. Asteraceae/Compositae

Es un arbusto nativo desde el noreste de México hasta Costa Rica, entre 1,000 y 3,000 m de altitud; en Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Guatemala, Jalapa, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa; en Alta Verapaz, donde se conoce con el nombre de "Bajché", crece silvestre y abundante entre matorrales o en áreas forestales mixtas, más a menudo en bosques de pino, pinabete, encino o roble, algunas veces en bosques de ciprés (21).

3.4.3.1 Descripción botánica

Arbol frágil de 1.5 a 6 m de altura; ramas color café, densamente puberulentas; raíces semileñosas y ramificadas. Hojas gruesas, opuestas, punteadas en los extremos, más o menos aserradas, color verde oscuro con vellosidades en las superficies. Inflorescencias en forma de racimos o cabezas de 6 a 7 mm de largo, redondeados muy ramificados, con vellosidades color café. Flores fragantes, menudas, blancas o rosa nacarado. Aquenios de 2 a 3 mm de largo, angostamente oblongos, ligeramente estringosos (20,21).

3.4.3.2 Usos etnomédicos

En Guatemala y especialmente en Alta Verapaz, la decocción de las hojas se utiliza para tratar la diabetes (22), también se usa para dolores de estómago e inflamación intestinal, dolores de cabeza, cuerpo, huesos, inflamaciones del hígado, paludismo y tos (23,24).

Estudios farmacológicos demuestran que el extracto acuoso de la hoja a dosis de 1,000 mg/kg de peso disminuye significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratas albinas normoglicémicas y con hiperglicemia inducida experimentalmente con aloxano (22).

El estudio toxicológico del extracto acuoso de la planta demostró un margen de seguridad para su uso una dosis de 0.2 a 6.4 g/kg de peso (22).

3.4.4 *Neurolaena lobata* R. Br. (Asteraceae/Compositae)

Nativa desde el sur de México hasta el norte de Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe. Se distribuye desde el nivel del mar hasta 1,450 m de altura (25).

En Guatemala se le conoce con los nombres de Mano de Lagarto, Tabaquillo y especialmente en Alta Verapaz la llaman "Tres Puntas", por la forma de sus hojas (25).

3.4.4.1 Descripción botánica

Arbusto de 1 a 4 m de altura, usualmente poco ramificada; tallos estriados, surcados, densamente pubescentes cuando jóvenes. Hojas corto-pecioladas o casi sésiles, casi glabra en el envés, alternas, acuminadas, agudas o curneadas en la base, las inferiores pueden tener hasta 30 cm de largo, densamente corto-pilosas en el envés y a menudo volutinosas. Inflorescencia corimbo-paniculada, las cabezuelas numerosas, pediceladas, sicoidea; involucre de 5-6 mm de tamaño; filarios puberulentos, pálidos, obtusos, 4-5 mm de largo; corolas de amarillo a naranja pálido, alrededor de 4 mm de longitud. Aquenios negros, esencialmente glabros, alrededor de 1.5 mm de largo; papus unisariado, 30 o más cerdas, alrededor de 4 mm de largo, blanco-amarillento (18,20,25).

3.4.4.2 Usos etnomédicos

La decocción de las hojas es utilizada por vía oral para el paludismo, dolor de estómago y cabeza y para bajar la fiebre (26).

3.4.4.3 Química

Estudios fitoquímicos han demostrado la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Ciccio, 1978). De las hojas y los tallos se han aislado tres germacranólidos, uno de los cuales corresponde de Neurolenina B, mientras que los otros son compuestos nuevos, los cuales fueron elucidados por

métodos espectroscópicos denominados Lobatina A (I) y Lobatina B (II). (27).

3.4.4.4 Actividades biológicas

Un extracto de las hojas administrado a ratones normo e hipoglicémicos demuestra un efecto hipoglicemiante (28).

3.4.5 *Polymnia maculata* Cav. (Asteraceae/Compositae)

Nativa desde el sur de México hasta Panamá, entre los 200 a 3,000 mt sobre el nivel del mar. Crece entre matorrales húmedos y bosques de pino o encino y como hierba indeseable en muchos terrenos de cultivo. En Guatemala prácticamente crece en todos los departamentos. En Alta Verapaz es conocida como "Ax" (ash). (25).

3.4.5.1 Descripción botánica

Hierba erguida, de 1 hasta 5 m de longitud, generalmente ramificada, los tallos están como salpicados de manchas color café-rojizo, que puede ser de escasa a densamente puberulentos y poco glandulares. Las hojas son usualmente sésiles o sobre amplio peciolo. Cuando son tiernas se presentan alargadas con peciolo amplio, comúnmente dilatados y serrados en la base, algunas veces perfoliados; el limbo es tripinervado. Son color verde

oscuro, ovaladas, de 9 a 45 c de ancho, irregularmente lobadas o anguladas, lóbulos agudos o acuminados e irregularmente dentados. Flores amarillas de 3 mm de diámetro, brácteas ovaladas o lanceoladas de 5 a 6 cm de diámetro, puberulentas, el disco de 1 a 1.5 cm de diámetro, compuesto de más o menos 100 flósculos y compuesto de 15 a 20 rayos. Semillas ovoides, lisas, negras, de 4 a 5 mm de largo por 3 a 6 mm de ancho, sin papus (20,25).

3.4.5.2 Usos etnomédicos

En Alta Verapaz se utiliza la planta fresca o su jugo, especialmente el raspado del tallo, aplicado sobre heridas y cortadas como cicatrizante (29).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

4. JUSTIFICACIONES

Alta Verapaz es una región que por su relieve y extensión tiene una gran variedad de climas, paisajes y cultivos, ésto la hace tener una riqueza botánica impresionante que unido a los conocimientos de medicina natural de sus habitantes, representa una de las zonas de mayor tradición etnobotánica del país (29).

Las plantas en estudio crecen en forma silvestre en esta región y sus habitantes las utilizan por sus conocidos efectos analgésicos y antiespasmódicos (*Eupatorium semialatum* y *Neurolaena lobata*), cicatrizante (*Polymnia maculata*), como remedio para los cólicos (*Acalypha arvensis*) y contra la rabia y el cáncer (*Cornutia grandifolia*) (28).

El presente estudio pretende ampliar el conocimiento acerca de las plantas a utilizar, a través del método de inducción de tumores en discos de papa por *A. tumefaciens*, y así obtener información acerca de la actividad citostática de las plantas mencionadas, estableciéndose una prueba que podría trabajarse paralelamente o sustituir a otros métodos que se utilizan actualmente con el mismo fin, pero que son poco accesibles (30). Y con ésto apoyar los estudios actuales sobre muchas plantas a las que se les han descubierto propiedades antitumorales, las cuales representan la alternativa más factible para combatir este mal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la actividad citostática de plantas usadas medicinalmente en el departamento de Alta Verapaz por un bioensayo *in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Montar el bioensayo *in vitro* de la tumorigénesis de papa (*Solanum tuberosum*).

5.2.2 Determinar el efecto citostático de los extractos de *Acalypha arvensis*, *Cornutia grandifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Neurolaena lobata* y *Polymnia maculata* contra tumores inducidos en papa por *A. tumefaciens*

6. HIPOTESIS

Por lo menos una de las cinco plantas seleccionadas *Acalypha arvensis*, *Cornutia grandifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Neurolaena lobata* y *Polymnia maculata*, posee efecto citostático sobre tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo

El universo de trabajo estuvo conformado por cinco plantas (*A. arvensis*, *C. grandifolia*, *E. semialatum*, *N. lobata* y *P. maculata*).

La muestra estuvo representada por dos extractos de cada una de las plantas con dos diferentes solventes (agua y etanol al 95 %).

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos

Asesor: Lic. Armando Cáceres

Estudiante: Lilian Patricia Díaz Salguero

7.2.2 Recursos Materiales

7.2.2.1 Reactivos y Medios de Cultivo

- Hipoclorito de sodio
- Etanol al 95 %
- Dimetilsulfóxido
- Agua destilada estéril
- Lugol
- Agar D-1
- Agar nutritivo al 0.5 %
- Caldo nutritivo
- Extracto de levadura

- Sacarosa

7.2.2.2 Equipo

- Aparato de percolación
- Rotavapor
- Desecadora
- Cajas de Petri descartables (100 x 15 mm)
- Tubos de ensayo
- Pipetas volumétricas de 1 y 2 ml
- Pipeta automática de 0 a 50 μ m
- Cuchillo o navaja
- Erlen. Maeyer de 250 ml con tapón de rosca
- Cubetas plásticas
- Pinzas
- Horador de 15 mm de diámetro
- Autoclave
- Campana microbiológica
- Mechero
- Estereoscopio
- Papel filtro Whatman No. 1
- Membranas Millipore 0.22 μ
- Algodón
- Gaza estéril
- Parafilm

7.2.2.3 Otros

- Cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* Bs., que se obtuvo de la Universidad Autónoma de Panamá.

- Discos de papa
- Extractos de las hojas de *A. arvensis*, *C. grandifolia*, *E. semialatum*, *N. lobata* y *P. maculata*.

7.3 Procedimiento

7.3.1 Recolección e identificación de las plantas.

Las plantas fueron colectadas en los municipios de Fray Bartolomé de las casas, San Cristóbal Verapaz, San Pedro Carchá y Cobán, en el departamento de Alta Verapaz.

Posterior a su recolección fueron colocadas en una secadora solar que permitió el secado homogéneo a temperaturas menores a 40 grados centígrados. De cada planta se tomaron muestras representativas para su identificación botánica, las que quedaron en el herbario de la Facultad de Agronomía y en el herbario del Laboratorio y Droguería Farmaya.

7.3.2 Extracción

El procedimiento de preparación de los extractos etanólicos se realizó de la siguiente manera:

7.3.2.1 Se trituró la planta ya seca para obtener partes iguales.

7.3.2.2 Al fondo de un percolador se colocó un tapón de

algodón, sobre éste se puso un papel filtro del diámetro del fondo.

7.3.2.3 En la salida con rosca del percolador se puso una manguera de hule (gruesa) de aproximadamente 1 cm. de diámetro y 10 cm. de largo. Se colocó en el extremo libre de la manguera, una pinza o llave de paso.

7.3.2.4 Se colocó la materia seca vegetal previamente pesada, hasta llegar a 3 cm. del extremo superior del percolador, presionando a manera de usar la mayor cantidad posible.

7.3.2.5 Sobre la materia seca vegetal se colocó un círculo de papel filtro de aproximadamente 10 cm de diámetro, sobre este se colocaron tapones de hule como contrapeso.

7.3.2.6 Se agregó etanol al 95 % hasta llegar al nivel del papel filtro.

7.3.2.6 Se dejó durante 24 horas, luego se abrió la llave de paso y se liberó el extracto, el cual se depositó en un recipiente. Durante los siguientes cuatro días se extrajo el extracto y se agregó etanol al 95 %.

7.3.2.7 Obtenido el extracto se colocó en un rotavapor par su concentración.

7.3.2.8 Posteriormente el extracto se colocó en una desecadora conteniendo cloruro de calcio para su solidificación.

7.3.3 El procedimiento para la preparación de los extractos acuosos fue el siguiente:

7.3.3.1 A la materia seca vegetal en estudio se le determinó su peso.

7.3.3.2 Se le agregó agua hirviendo de manera que se cubriera completamente, se dejó en reposo durante 2 horas.

7.3.3.3 Pasadas las dos horas se pasó por una gaza (tamizaje) posteriormente se pasó por un papel filtro.

7.3.3.4 Se depositaron 125 ml en Erhlen Meyer de 250 ml, se cubrieron con parafilm y se cerraron con el tapón de rosca.

7.3.3.5 Se colocaron en la refrigeradora hasta que pudieran ingresar a la liofilizadora.

7.3.3.6 En la liofilizadora se mantuvieron a -70°C y a 200 lb. de presión hasta transformarse en polvo (liofilizado).

7.3.4 Preparación del cultivo de *Agrobacterium*

tumefaciens

El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera:

Se agregó 0.5 g de sacarosa, 0.8 g de caldo nutritivo y 0.1 de extracto de levadura a 100 ml de agua desmineralizada contenidos en un Erlhen Meyer de 250 ml, se tapó con un tapón, seguidamente se esterilizó en autoclave durante 12 minutos, luego se dejó enfriar y se agregó una asada del cultivo puro de *Agrobacterium tumefaciens* cepa B6, mantenida en agar D-1. Se dejó incubar a 30°C durante 48 horas.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

7.3.5 Actividad antibiótica de los extractos acuosos y etanólicos de las plantas (31).

Previo a la realización del bioensayo de tumorigénesis de la papa, se realizó el estudio de la actividad antibiótica de los extractos de *Alcalypha arvensis*, *Cornutia grandifolia*, *Eupatorium semialatum*, *Neurolaena lobata* y *Polymnia maculata* sobre *Agrobacterium tumefaciens*, con el fin de evitar falsos positivos de actividad citostática. Para esto se utilizaron los extractos acuosos y etanólicos de las plantas anteriormente mencionadas y se hizo el ensayo de la actividad antimicrobiana (Método Mitscher et al, 1,972) de la siguiente manera:

7.3.5.1 A 9 ml de agar Müller Hinton se le agregó 1 ml del extracto vegetal de cada planta (dilución 1:10), se vertió en una caja de Petri para su confrontación microbiana. Para comprobar que el medio estaba libre de contaminaciones, se

incubó a 35°C durante 24 hrs. y se observó el crecimiento bacteriano, las cajas libres de contaminación se almacenaron a 4°C en bolsas plásticas hasta su utilización.

7.3.5.2 Preparación del inóculo

Se purificó el microorganismo (*A. tumefaciens*), se inoculó en un tubo con 8 ml de agar Tripticasa Soya en Slant, se incubó a 35°C durante 24 hrs. Se tomó una asada y se inoculó en tubo con 5 ml de caldo Tripticasa Soya, se incubó a 35°C durante 24 hrs.

7.3.5.3 Demostración de la actividad antimicrobiana

Se inoculó en las cajas con extracto crudo una asada de cada uno de los microorganismos con los que se confrontó *A. tumefaciens* (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*). Siguiendo el patrón de 8 partes iguales con una zona clara en el centro de la caja, se dejó reposar durante 5 a 10 minutos y se incubó a 35°C durante 24 hrs.

7.3.5.4 Interpretación de resultados

Se observó la aparición de un crecimiento homogéneo en las zonas de inoculación y se interpretó de la siguiente manera:

- Si hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, actividad negativa.
- Si hubo alteraciones morfológicas, actividad parcial.
- Si hubo crecimiento de algunas colonias a lo largo del inóculo, resistencia.
- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación,

contaminación.

- Si no hay crecimiento, actividad positiva.

7.3.6 Bioensayo

7.3.6.1 Se sumergieron las papas en un recipiente conteniendo hipoclorito de sodio al 6 por ciento (Cloro Magia Blanca) por 20 minutos, se removieron y se dejaron otros 10 minutos.

7.3.6.2 Se extrajeron cilindros del centro de cada papa con un horador estéril de 1.5 cm de diámetro.

7.3.6.3 Se cortaron de cada cilindro 1 cm de los extremos con un bisturí o cuchillo estéril y se descartaron, luego se cortaron discos de 0.5 cm de grosor de cada cilindro.

7.3.6.4 Se transfirieron los discos a cajas de Petri conteniendo agar nutritivo al 1.5 %. Cada caja debía contener 5 discos y por cada extracto de muestra se hicieron 5 cajas.

7.3.6.5 Preparación del inóculo. Se disolvieron un total de 100 mg del extracto de planta en ml de dimetilsulfóxido para los extractos etanólicos o con 2 ml de agua para los extractos acuosos; de esta solución se tomaron 0.5 ml que se agregaron a un tubo de ensayo estéril conteniendo 1.5 ml de agua estéril, posteriormente 2 ml del cultivo de A.

tumefaciens de 48 horas fueron agregados asépticamente. Se preparó un tubo para cada una de las 5 cajas de cada uno de los extractos de cada planta.

7.3.6.6 El control negativo (de actividad citostática) se realizó de la siguiente manera: en un tubo de ensayo estéril se agregaron 0.5 ml de dimetilsulfóxido, 1.5 ml de agua desmineralizada estéril y 2 ml del cultivo de *A. tumefaciens* de 48 horas.

7.3.6.7 Durante los siguientes 30 minutos de cortados los discos de papa, se agregaron 50 μ l de cada inóculo, incluyendo el control. Se sellaron las cajas con parafilm y se invirtieron después de dos días de incubación.

7.3.6.8 A los 11 y 21 días después de la inoculación, se contaron los tumores con la ayuda de un estereóscopo.

7.3.6.9 Los resultados se expresaron por el número de tumores observados en cada disco de papa.

7.4 Diseño experimental

Cada ensayo consistió en grupos de 5 cajas de Petri con medio de cultivo por cada extracto (5 corridas por extracto), a las cuales se les colocaron cinco discos de papa a cada una y luego se sometieron a diferentes tratamientos.

7.4.1 Definición de grupos

Grupo No. 1: consistió en 5 cajas de Petri con medio de cultivo y 5 discos de papa cada una, que sirvieron como controles, a los cuales sólo se les inoculó *Agrobacterium tumefaciens* y el diluyente con las papas (dimetilsulfóxido).

Grupo No. 2: consistió en 5 cajas de Petri con medio de cultivo y 5 discos de papa para cada una, se preparó un tubo de inóculo conteniendo el extracto y la bacteria para cada una de las cajas.

7.4.2 Unidades de medida

Se tomó el número de tumores observados en cada disco de papa.

7.4.3 Diseño estadístico

Debido a la variabilidad entre los resultados, se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman.

7.4.4 Análisis de resultados

Ho: los grupos son iguales

Ha: al menos 1 grupo es diferente

Cuando se tienen 11 grupos a comparar y el tamaño de muestras es grande, el valor estadístico es X^2 con 11-1 (10) grados de libertad (alfa=0.05).

$$X^2_{gl=10} = 18.31$$

Si X^2 calculado y corregido para errores es mayor o igual a 18.31, Ho se rechaza y se concluye que existe diferencia significativa entre los grupos (p menor a 0.05).

Tanto a los 11 como a los 21 días existe diferencia significativa, por lo que se procedió a realizar comparaciones de cada tratamiento con el control.

Ho: grupo = control

Ha: grupo no es = control

Si el rango medio de cada extracto es mayor o igual al comparador entonces Ho se rechaza

K= grupos= 11

N= # de muestras por grupo = 25

de comparaciones= 10 $q_{(alfa=0.05,10)} = 2.72$

$$\text{Comparador} = q_{(alfa,c)} \sqrt{\frac{K(K+1)}{6N}}$$

$$\text{Comparador} = 2.72 \sqrt{\frac{11(11-1)}{6(25)}} = 2.55$$

tumores y no se observaba pudrición. Con estos resultados se llegó a decidir que ésta se usaría para los ensayos.

Previo a la realización del bioensayo fue necesario probar la actividad antimicrobiana de los extractos, tanto acuosos como etanólicos para determinar si estos inhibían el crecimiento bacteriano, se probó con *Agrobacterium tumefaciens*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogens*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida albicans* con las cuales no mostraron ninguna actividad. Este estudio serviría para saber si los extractos inhibían el crecimiento de *A. tumefaciens* y de esta manera evitar falsos positivos de actividad citostática.

Para la realización del bioensayo se preparó una dilución 1:100 de cada extracto con su solvente respectivo, dimetilsulfóxido para los etanólicos y agua para los acuosos.

Luego de la incubación de las cajas se pudo observar que a los 11 días, como indica la técnica, en casi todos los discos de los extractos y el control se evidenciaba el crecimiento de pequeños tumores. En la mayoría de las cajas no había contaminaciones y los discos se encontraban en muy buen estado, de color blanquecino y con muy poca humedad. Esto indicaba que el procedimiento se había realizado correctamente.

La tabla 1 y 2 indica el número de tumores que se pudo contar en los discos de papa control, se observó un máximo de 67 y 97 a los 11 y 21 días respectivamente.

Tabla 1
 Número de tumores en disco de papa control a los 11 días de incubación.

No. Corrida	No. Discos				
	1	2	3	4	5
1	40	23	20	20	15
2	8	15	21	10	15
3	8	28	15	10	33
4	23	24	11	30	67
5	62	15	36	39	18

Tabla 2
 Número de tumores en discos de papa control al los 21 días de incubación.

No. Corrida	No. Discos				
	1	2	3	4	5
1	47	27	22	24	17
2	10	19	31	23	34
3	18	37	29	16	41
4	45	33	21	36	97
5	67	37	43	41	19

Se puede observar que a los 11 días de incubación todos los extractos tuvieron diferencia significativa con relación al control ($p < 0.05$). Tabla 3

Tabla 3
Medianas frente al comparador 11 días de incubación.

Plantas		Rango medio	Comparador
<i>A. arvensis</i>	(acuoso)	3.28	> 2.55
<i>A. arvensis</i>	(etanólico)	4.72	> 2.55
<i>E. semialatum</i>	(acuoso)	5.68	> 2.55
<i>E. semialatum</i>	(etanólico)	5.68	> 2.55
<i>C. grandifolia</i>	(acuoso)	3.50	> 2.55
<i>C. grandifolia</i>	(etanólico)	5.68	> 2.55
<i>N. lobata</i>	(acuoso)	5.68	> 2.55
<i>N. lobata</i>	(etanólico)	5.68	> 2.55
<i>P. maculata</i>	(acuoso)	5.68	> 2.55
<i>P. maculata</i>	(etanólico)	5.68	> 2.55

A los 21 días sólo hay diferencia significativa con relación al control en los extractos acuosos de *E. semialatum* y en los extractos etanólicos de *E. semialatum*, *A. arvensis*, *C. grandifolia*, *N. lobata* y *P. maculata* $p < 0.05$. (tabla 4).

Tabla 4

Medianas frente al comparador 21 días de incubación.

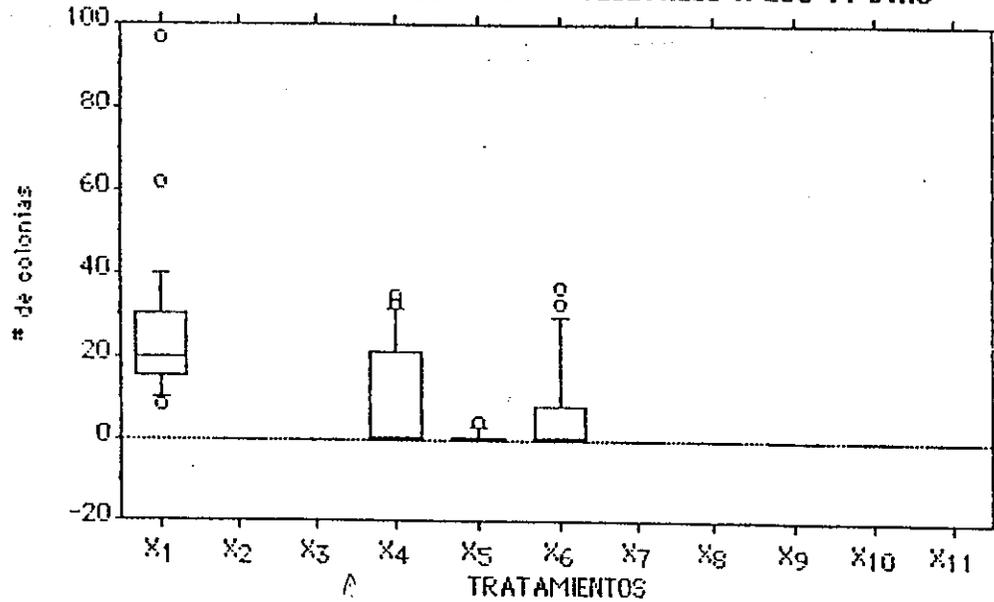
Plantas		Rango medio	Comparador
<i>A. arvensis</i>	(acuoso)	1.62	< 2.55
<i>A. arvensis</i>	(etanólico)	4.78	> 2.55
<i>E. semialatum</i>	(acuoso)	5.78	> 2.55
<i>E. semialatum</i>	(etanólico)	6.84	> 2.55
<i>C. grandifolia</i>	(acuoso)	1.50	< 2.55
<i>C. grandifolia</i>	(etanólico)	6.58	> 2.55
<i>N. lobata</i>	(acuoso)	2.38	< 2.55
<i>N. lobata</i>	(etanólico)	5.78	> 2.55
<i>P. maculata</i>	(acuoso)	2.30	< 2.55
<i>P. maculata</i>	(etanólico)	7.82	> 2.55

En la tabla 5 se observan los rangos que demuestran el menor y mayor número de tumores obtenidos tanto a los 11 como a los 21 días de incubación. También se encuentran las medianas de todos los grupos, estas complementan las gráficas 1 y 2 en las que se presentan las cajas de Tuckey para demostrar que tan separados están los resultados obtenidos de la mediana de cada grupo.

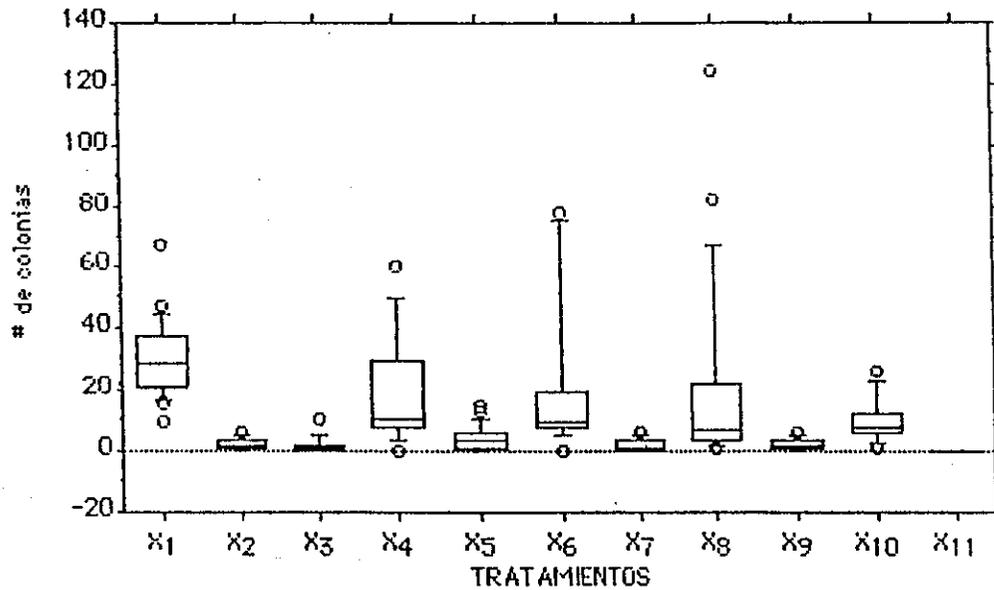
Tabla 5
 Medianas y rangos de control de extractos acuosos y etanólicos a los 11 y 21 días de incubación

Plantas	11 días		21 días	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango
Control	20	8-67	29	10-97
<i>A. arvensis</i> (acuoso)	0	0-35	11	0-60
<i>A. arvensis</i> (etanólico)	0	0-4	4	0-15
<i>E. semialatum</i> (acuoso)	0	0-37	10	0-78
<i>E. semialatum</i> (etanólico)	0	0-0	0	0-6
<i>C. grandifolia</i> (acuoso)	0	0-0	2	0-6
<i>C. grandifolia</i> (etanólico)	0	0-0	0	0-11
<i>N. lobata</i> (acuoso)	0	0-0	7	1-124
<i>N. lobata</i> (etanólico)	0	0-0	2	0-6
<i>P. maculata</i> (acuoso)	0	0-0	8	1-26
<i>P. maculata</i> (etanólico)	0	0-0	0	0-0

GRAFICA 2
EVALUACION DE 10 EXTRACTOS VEGETALES A LOS 11 DIAS



GRAFICA 1
EVALUACION DE 10 EXTRACTOS VEGETALES A LOS 21 DIAS



En donde el extracto acuoso de las plantas en estudio está representado así:
 X2. *A. arvensis*; X4. *E. semialatum*; X6. *C. grandifolia*;
 X8. *N. lobata*; X10. *P. maculata*.
 Y los extractos etanólicos así:
 X3. *A. arvensis*; X5. *E. semialatum*; X7. *C. grandifolia*;
 X9. *N. lobata*; X11. *P. maculata*

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Numerosas plantas cultivadas de manera silvestre en Alta Verapaz han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales como remedios muy eficaces para aliviar enfermedades. Es así como se ha podido comprobar que popularmente las cinco plantas en estudio, nativas todas de Alta Verapaz han demostrado en estudios previos su actividad antiespasmódica e hipoglicémiante (*N. lobata*, *E. semialatum*, *A. arvensis*), cicatrizante (*P. maculata*), antirrábica y para curar el cáncer de ovario (*C. grandifolia*) entre otras. La determinación de la actividad antitumoral es un procedimiento nuevo que contribuye a validar científicamente el uso popular que se les ha dado.

El ensayo consistió en cinco corridas por extracto, las cuales se realizaron durante cinco días de la semana haciendo cada día una planta con sus dos extractos. El ensayo se terminó en dos semanas, luego de las cuales se hizo una lectura a los 11 y 21 días. En total se hicieron 25 tratamientos por extracto, ya que se prepararon 5 cajas por extracto y en cada caja se colocaron 5 discos de papa.

A los 11 días de incubación se pudo observar que los controles presentaban un crecimiento tumoral mayor que los extractos, existiendo diferencia significativa comparada con el control ($p < 0.05$).

Analizados los datos obtenidos por extracto, se pudo observar en general, que los extractos acuosos no

presentaban diferencia significativa, lo que indica que no hay actividad citostática demostrable, a excepción de *E. semialatum* que fue la única en la que se observó diferencia significativa, ($p < 0.05$). *A. arvensis*, *C. grandifolia*, *N. lobata*, *P. maculata* no presentaron diferencia significativa a los 21 días, ($p > 0.05$).

En cuanto a los extractos etanólicos llama la atención *C. grandifolia*, en la que no se observaron tumores y los discos permanecieron intactos, se menciona esto ya que en los demás extractos, los discos cambiaron su aspecto, especialmente los de *N. lobata*, en la que en todos los discos se formó una membrana de color café. En todos los extractos etanólicos se observó diferencia significativa, ($p < 0.05$), que indica una probable actividad citostática. Este es el caso de *A. arvensis*, *E. semialatum*, *C. grandifolia*, *N. lobata* y *P. maculata*.

Anteriormente se tuvo mucho problema por la contaminación con mohos y bacterias, en los últimos ensayos se observó que lavar las papas con agua y jabón antes de sumergirlas en el cloro hacía desaparecer casi totalmente este problema.

Con los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada, ya que en los cinco extractos etanólicos y uno acuoso no hubo crecimiento tumoral, presentaron probable actividad citostática.

10. CONCLUSIONES

10.1 La papa inmadura (verde, tierna) presenta mayor susceptibilidad para el crecimiento de tumores que la papa madura. La papa roja (Red Russet), no se cultiva en Guatemala.

10.2 A los 11 días de incubación en todos los extractos acuosos y etanólicos de *A. arvensis*, *C. grandifolia*, *E. semialatum*, *N. lobata* y *P. maculata* no hubo crecimiento tumoral considerable, presentando diferencia significativa comparada con el control ($p < 0.05$).

10.3 En todos los extractos acuosos a excepción de *E. semialatum* se observó crecimiento tumoral, presentando diferencia significativa comparada con el control ($p < 0.05$).

10.4 El extracto acuoso de *N. lobata* mostró el rango más amplio de crecimiento tumoral a los 21 días de incubación.

10.5 Los extractos etanólicos mostraron crecimiento tumoral a los 21 días de incubación presentando diferencia significativa considerable ($p < 0.05$).

10.6 Los discos de papa tratados con *N. lobata* extracto acuoso fueron los únicos que cambiaron su aspecto.

10.7 Con los resultados obtenidos se puede concluir que el ensayo es sencillo y fácil de manejar.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Utilizar papa inmadura (tierna, verde) en el ensayo, ya que tiene más susceptibilidad a la formación de tumores.

11.2 Hacer el ensayo comparándolo con controles positivos y negativos de actividad citostática.

11.3 Como control positivo podrían utilizarse extractos de *Catharanthus roseus* (chatía) que ha demostrado actividad citostática (vincristina y vinblastina).

11.4 Estandarizar el período de incubación a los 11 días para evitar la contaminación que se presenta a los 21 días.

11.5 Efectuar ensayos que confirmen la actividad citostática de los extractos etanólicos de *Cornutia grandifolia*, *Polymnia maculata* y *Eupatorium semialatum* a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

11.6 Determinar la citotoxicidad de los extractos vegetales en estudio.

11.7 Realizar estudios fitoquímicos de las plantas ensayadas para confirmar el principio activo y evidenciar su estructura molecular.

12. REFERENCIAS

1. Cassady JM, Chang CJ, McLaughlin JL, Recents advances in the isolation of structural elucidation of antineoplastic agents of higher plants. *Nat Prod Med Agen* 1981;93-124.
2. Wagner H., Hikino H. Farnsworth NR., Recents developments in the chemistry of plant-derived anticancer agents. *Econ Med Plan Res* 1988;2:119-191.
3. Ferrigni NR, *et al.* Modification an evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. *J Nat Prod* 1982;45:679-686.
4. Anderson WAD. *Patología*. Trad. Korin D. 8a ed. Buenos Aires, Argentina:Editorial Médica Panamericana,1986. (p 595-645).
5. Robins SL. *et al.* *Patología Humana*. Trad. Vela Treviño H. 3a ed. México: Interamericana, 1985. (p 85-135).
6. Litter M. *Farmacología Experimental y Clínica*. 7a ed. Argentina: El Ateneo, 1986. (p 834-898).
7. McLaughlin JL. Crown Gall tumours on Potato disc and Brine Shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. *Met Plan Bioch* 1991;1:6;2-30.
8. MacRae WD, *et al.* Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol* 1988;22:143-172.
9. Sarasola AA, Rocca de Sarasola MA. *Fitopatología; curso moderno*. Argentina:Hemisferio Sur, 1978. (p 4-16)
10. INCAP. Laboratory Guide for identification of plant

pathogenic bacteria. Guatemala 1986.

11. Brock TD, *et al*, Microbiología. Trad. Longi G, *et al* 4a ed, México:Prentice-Hall, 1987. (p 470-471).

12. Magic and Medicine of plants. The Reader's Digest Association. Pleasantville, N.Y.,1986. (p 32-34, 377)

13. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy. Philadelphia:Lea and Febinger, 1988. (p 186-189).

14. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa General de Desarrollo Científico y Tecnológico. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografía No. 30. Guatemala,1986.

15. Monroe EW, Mansukh CW. Structure activity relationships of plant antitumor agents related to Camptothecin and Quassinoids. Nat Prod Med Agen 1981;125-149.

16. Cuéllar A. *et al*, *Catharanthus roseus* G. Don que crece en Cuba: Aislamiento y caracterización de vinblastina y leurosina, dos alcaloides con propiedades citostáticas. Rev Cub Farm 1975;9:183-199.

17. Dieseldorff EP. Las Plantas Medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala:Tipografía Nacional, 1977. 40p.

18. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield, Charles C. Thomas Publisher. 1981. (p 128, 933-935, 949, 958).

19. Stadley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Chicago:Fieldiana Botany. 1976;24(6):28-29.

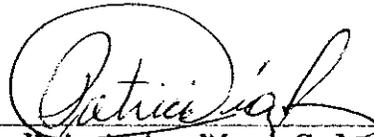
20. Moreno NJ. Glosario Botánico Ilustrado. México:CECSA,1984. 300p.

21. Standley PC, Williams LO. --- Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany;Chicago,1976;24(9):96-97.
22. Martínez NR. Efecto del extracto acuoso de las hojas de *E. semialatum* (Bacché) sobre la concentración de glucosa sanguínea en ratas normales y en diabéticas inducidas con aloxano. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1990. 58p.
23. Instituto Indigenista Nacional, Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. Guatemala Indígena. 1978;13:1-616.
24. Nelson CH. Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa:Ed Universitaria, 1986. (550p).
25. Nash DL, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany;Chicago, 1976;24(12):96-97,104,272,291-292.
26. Girón LM, et al. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by Caribs of Guatemala. J Ethnopharmacol 1987;3:323-327
27. Borges del Castillo J, et al. Panama Flora II. New sesquiterpene lactones from *N. lobata*. J Nat Prod 1982;45:762-765.
28. Gupta MP, et al. Hipoglicemic activity of *N. lobata* R. Br. J Ethnopharmacol 1984;3:323-327.
29. CONAPLAMED; Proyecto UC/Guat/89/154, informe final. Agrotecnología Relacionada con la Farmacopea tradicional de Guatemala. Guatemala. 1991.

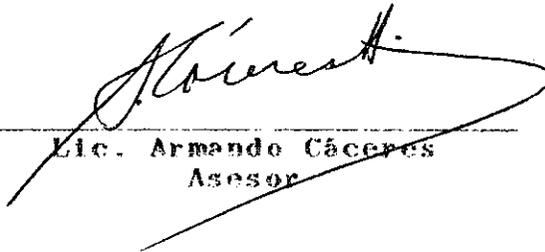
30. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy.
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Purdue
University. Workshop on simple bioassays an introduction.

McLaughlin JL. 1989. 7pp

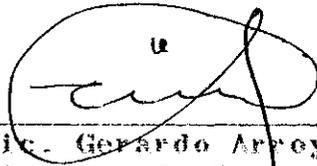
31. Mitscher A, *et al.* A modern look a folkloric use or
anti-infective agents. *J Nat Prod* 1,987;50:1025-1040.



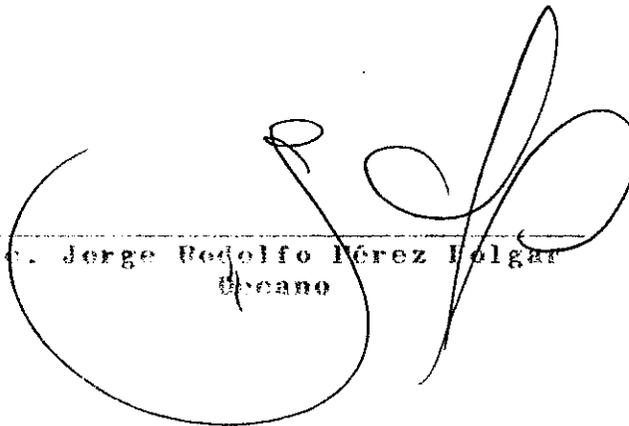
Patricia Díaz Salguero
Estudiante



Lic. Armando Cáceres
Asesor



Lic. Gerardo Arce
Director de Escuela



Lic. Jorge Rogolfo Pérez Bolívar
Docente