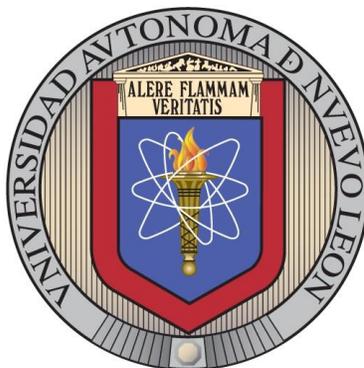


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS
DE SEMILLA Y HOJA DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) DE ORIGEN
REGIONAL (ÉBANO, SAN LUIS POTOSÍ) COMPARADA CON LA
COMERCIALIZADA EN LA INDIA.

POR:

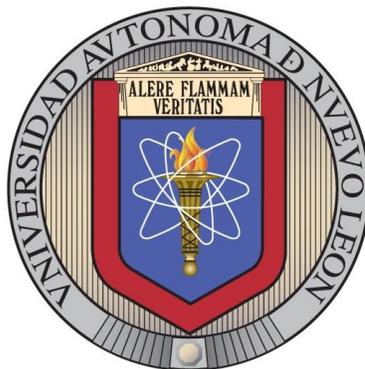
M.B.C. JOAQUÍN AVALOS SOTO

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

ABRIL 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS
DE SEMILLA Y HOJA DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) DE ORIGEN
REGIONAL (ÉBANO, SAN LUIS POTOSÍ) COMPARADA CON LA
COMERCIALIZADA EN LA INDIA.

Por:

M.B.C. JOAQUÍN AVALOS SOTO

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

San Nicolás de los Garza, N.L.

ABRIL 2014

ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS
DE SEMILLA Y HOJA DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) DE ORIGEN
REGIONAL (ÉBANO, SAN LUIS POTOSÍ) COMPARADA CON LA
COMERCIALIZADA EN LA INDIA.

Comité de Tesis

Presidente: Dra. María Eufemia Morales Rubio

Vocal: Dra María Julia Verde Star

Vocal: Dra. Catalina Rivas Morales

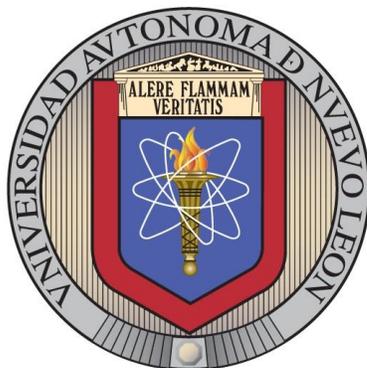
Vocal: Dr. Jaime Fco. Treviño Neávez

Secretaria: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

San Nicolás de los Garza, N.L.

ABRIL 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS
DE SEMILLA Y HOJA DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) DE ORIGEN
REGIONAL (ÉBANO, SAN LUIS POTOSÍ) COMPARADA CON LA
COMERCIALIZADA EN LA INDIA.

Por:

M.B.C. JOAQUÍN AVALOS SOTO

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina U.A. de C. en Torreón Coah. y los laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango en Gómez Palacio Dgo, bajo la dirección de:

Dra. María Eufemia Morales Rubio
Director Interno

Dr. Luis Benjamín Serrano Gallardo
Director Externo

Dr. Javier Moran Martínez
Asesor Externo

Abril 2014

DEDICATORIA

A mis padres Estela Soto Arévalo y Joaquín Avalos Reyes, gracias por todo su apoyo, gracias por su confianza y amor.

A mi esposa Blanca Anai Cabrales Acosta, gracias mi amor por tu apoyo y tolerancia y cuidar a nuestros hijos cuando estaba lejos de ustedes sin tu apoyo no hubiera llegado hasta aquí.

A mis hijos, Joselin Anai y José Joaquín, mi razón para seguir superándome y ser mejor día a día. Joselin que nació en el 2010 cuando inicie el Doctorado y José Joaquín en el 2012 a mitad del mismo, los amo hijos y todo lo que hago es para que ustedes estén mejor.

A la Maestra Maru Cedillo Gómez, que desde el 2001 que ingrese a UJED FCQ conocí a un gran ser humano, a una gran maestra, amiga, compañera de trabajo y excelente profesionista. Gracias maestra por inculcarme la responsabilidad y deseo de ser mejor cada día, pero sobre todo gracias por su confianza.

A mis hermanos Heber Avalos y Perla Avalos, gracias por su apoyo. Y también a todos mis amigos que me han apoyado en todo y para todo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Eufemia, mi respeto y admiración a su sencillez y humildad. Gracias por todo su apoyo en los momentos buenos pero sobre todo en los momentos cuando estaba en apuros, no solo me llevo de la UANL el grado de Doctor si no la fortuna de haberla conocido durante estos tres años.

Dr. Luis Benjamín Serrano, mi Doc gran amigo desde la Licenciatura, Maestría y Doctorado. Gracias por todo en verdad muchas gracias.

Dr. Javier Morán, gracias por todo su apoyo, gracias por su motivación y sinceridad.

Dra. Julia Verde Star, muchas gracias Doctora, excelente sus pláticas y experiencias en la UANL, platicar con Ud. son palabras mayores. Mi admiración por su trayectoria académica y política en la universidad.

Dra. Catalina, Dra. Azucena y Dr. Jaime, gracias por sus buenos consejos, para la culminación de esta etapa en mi vida.

M.C. Gerardo, M.C. Alejandro y M.C. Irais gracias amigos por todo su apoyo con los ensayos de citotoxicidad con las líneas celulares, que experiencia aquella vez Gera que fuimos por las células a Guadalajara, igual Alejandro por las células donadas por la UNAM.

A mi hermano el Dr. Miguel Téllez, gracias compadre por apoyarme en todo y no rajarse.

A mi amiga la Dra. Carmen Vega, gracias por hacerme tan divertido los viajes a Mty no tanto a Miguel, Gracias por si amistad.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número 372733.

Agradezco a la Universidad Juárez del Estado de Durango por su apoyo con el convenio de colaboración académica para la conclusión de mis estudios de Doctorado.

Al Instituto de Química de la UNAM por la donación de las líneas celulares para este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Universidad Autónoma de Coahuila y Universidad Juárez del Estado de Durango en sus distintos departamentos:

- Departamento de Química
(Laboratorio de Fitoquímica y Química analítica)
- Departamento de Investigación
- Departamento de Biología Celular y Ultra-estructura
- Departamento de Etnofarmacología

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	5
3. HIPÓTESIS.....	7
4. OBJETIVOS	8
4.1 OBJETIVO GENERAL	8
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
5. ANTECEDENTES.....	9
5.1 Usos medicinales de las Plantas	9
5.2 Compuestos químicos de las plantas (Metabolitos secundarios)	11
5.3 Análisis fitoquímico	12
5.3.1 Aislamiento de metabolitos secundarios.....	13
5.3.2 Extracción con solventes	13
5.3.3 Identificación química	14
5.4 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Neem).....	16
5.4.1 Clasificación taxonómica A. Juss	17
5.4.2 Composición química <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Neem).....	17
5.4.3 Usos en medicina tradicional de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Neem).....	18
5.5 Bioensayos de Toxicidad.....	19
5.5.1 Bioensayo con <i>Artemia salina</i>	20
5.5.1.1 Taxonomía de <i>Artemia salina</i>	21

5.5.2 Bioensayos de citotoxicidad con Líneas Celulares.....	22
5.5.2.1 Líneas celulares.....	24
5.5.2.1.1 Línea celular MCF-7 Cáncer de mama.....	25
5.5.2.1.2 Línea celular HaCaT Queratinocitos humanos.....	25
5.5.2.1.3 Línea celular CaLo Cáncer cervicouterino.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Lugar, área de trabajo y periodo de estudio.....	27
6.2 Material biológico.....	27
6.2.1 Vegetal.....	27
6.2.2 Líneas celulares.....	27
6.2.3 Huevecillos de <i>Artemia salina</i>	27
6.3 Desengrasado de Semilla.....	28
3.4 Obtención de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i>	29
6.5 Identificación parcial de los componentes de los extractos.....	31
6.5.1 Detección de glúcidos.....	31
6.5.2 Detección de gomas y mucilagos.....	31
6.5.3 Detección de lípidos y ceras.....	31
6.5.4 Detección de cumarinas.....	32
6.5.5 Detección de flavonoides.....	32
6.5.6 Detección de antocianinas.....	33
6.5.7 Detección de taninos.....	33
6.5.8 Detección de antraquinonas.....	33
6.5.9 Detección de Terpenos y Esteroides.....	34
6.5.10 Detección de saponinas.....	34

6.5.11 Detección de alcaloides	34
6.5.12 Detección de leucoantocianos.....	35
6.6 Toxicidad de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> A. Juss sobre <i>A. salina</i>	35
6.7 Determinación de citotoxicidad del extracto y particiones en líneas celulares	36
6.8 Particiones de los extractos crudos de hoja y semilla de neem	38
6.9 Análisis estadístico	39
6.9.1 Análisis Probit.....	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Recolección e identificación del material vegetal de estudio.....	40
7.1.1 Material vegetal originario de la India.....	40
7.1.2 Material vegetal originario de México.....	40
7.2 Rendimiento de los Extractos.....	41
7.3 Identificación parcial de los compuestos en los extractos.....	41
7.4 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	43
7.5 Determinación de citotoxicidad del extracto en líneas celulares	44
7.6 Determinación de citotoxicidad de las particiones en líneas celulares.....	46
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	53
LITERATURA CITADA.....	55
ANEXOS	66

INDICE DE FIGURAS

Figura No	Contenido	Página
1	Estructura básica de una cumarina	14
2	Núcleo básico de los flavonoides	14
3	Estructura de la molécula de antociano	14
4	Estructura general de una antraquinona	15
5	Estructura de triterpenos	15
6	Estructura general de los esteroides	15
7	Estructura general de las saponinas	15
8	Árbol del Neem	16
9	Flores de Neem	16
10	Frutos en forma de aceituna de Neem	16
11	Estructura química azadiractina	17
12	Nauplios de <i>Artemia salina</i>	21
13	Línea celular MCF-7	25
14	Línea celular HaCaT	26
15	Diagrama desengrasado de semilla de <i>A. indica</i>	28
16	Semilla con cáscara, semilla y cascara de neem	29
17	Diagrama de la obtención de los extractos etanólicos	30
18	Diagrama del ensayo de letalidad sobre <i>A. salina</i>	36
19	Diagrama de ensayos de toxicidad con líneas celulares	38
20	Gráfica Probit curva dosis respuesta	39

INDICE DE TABLAS

Tabla No	Contenido	Página
1	Rendimientos de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> de origen México comparada con la de la India	41
2	Identificación parcial de compuestos presentes en los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> de origen México comparada con la de la india	42
3	Determinación de la DL ₅₀ con el bioensayo de letalidad de <i>A. salina</i> de los extractos de origen México comparada con los de la India	43
4	Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular MCF 7 (Cáncer de mama)	44
5	Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular HaCat (Queratinocitos humanos)	45
6	Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino)	45
7	Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular MCF7 (Cáncer de Mama)	46
8	Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular HaCat (Queratinocitos humanos)	47
9	Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de <i>A. indica</i> de origen México e India sobre la Línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino)	47

ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
Cel	Células
DL ₅₀	Dosis Letal Media
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
h	Horas
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
DMSO	Dimetil Sulfóxido
Nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
RF	Ratio of Front
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetranolium bromide

RESUMEN

En este trabajo se evaluó y comparó la actividad tóxica, citotóxica y fitoquímicos presentes de los extractos etanólicos y sus particiones de semilla y hoja de *Azadirachta indica* (Neem) de origen Mexicano (Ébano, SLP) comparada con la comercializada en la India (Coimbatore, Tamil Nadu). Se emplearon tres líneas celulares MCF7 (Cáncer de Mama), HaCaT (Queratinocitos Humanos) y CaLo (Cáncer cervicouterino). Los extractos se clasificaron en: Semilla de neem, cáscara de semilla de neem, hoja de neem y semilla con cáscara de neem. Se determinó la toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina* siendo la de mayor actividad el extracto de semilla de neem de la India con una DL_{50} de 476 $\mu\text{g/mL}$; los extractos que presentaron mayor actividad citotóxica sobre las distintas líneas celulares fueron: Extracto de hoja de neem de la india con una IC_{50} 22.03 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea MCF7, extracto de semilla de neem de la India con una IC_{50} 32.17 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea CaLo y extracto de hoja de neem de México con una IC_{50} 135.76 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea HaCaT. De los extractos de hoja y semilla se obtuvieron dos particiones hexánica y clorofórmica, la mayor actividad se presentó en la partición hexánica de hoja de neem de la India con una IC_{50} 25.17 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular MCF7, partición clorofórmica de semilla de neem de la India con una IC_{50} 30.93 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular CaLo y partición clorofórmica de hoja de neem de la India con una IC_{50} 98.09 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular HaCaT. A pesar de que esta planta tiene muchos reportes sobre actividad biológica, los resultados obtenidos en estas líneas celulares no han sido publicados. En este estudio se demostró que los extractos etanólicos de *A. indica* originarios de la India mostraron mayor actividad tóxica y citotóxica que los extractos de origen México, la partición hexánica de hoja de neem de la India fue la que presentó mayor actividad citotóxica sobre MCF7 y es promisorio como fitofármaco.

ABSTRACT

This study evaluated and compared the toxic and cytotoxic activity and secondary metabolites present in ethanol extracts and their partitions of seeds and leaves of *Azadirachta indica* (Neem) of Mexican origin (Ébano, SLP) compared to from India (Coimbatore, Tamil Nadu); three cell lines: MCF7 (Breast Cancer), HaCaT (Human Keratinocytes) and CaLo (Uterine Cervical Cancer) were used. The extracts were classified as: neem seed, seed coat, neem leaf and neem seed with coat. Toxicity of extracts on *Artemia salina* was determined, the most active extract was seed of neem from India with an LD₅₀ of 476 µg/mL, the extracts that showed higher cytotoxic activity on different cell lines were: leaf extract neem from India with IC₅₀ 22.03 µg/mL on line MCF7, neem seed extract from India with an IC₅₀ 32.17 µg/mL on line CaLo and neem leaf extract of Mexico with an IC₅₀ 135.76 µg/mL on line HaCaT. Of leaf and seed extracts were obtained two partitions hexane and chloroform, the highest activity was in hexane partition of neem leaf from India with an IC₅₀ 25.17 µg/mL on MCF7 cell line, chloroform partition of seed neem from India with an IC₅₀ 30.93 µg/mL on cell line CaLo and chloroform partition neem leaf from India with an IC₅₀ 98.09 µg/mL on HaCaT cell line. Although this plant has many reports of biological activity, the results obtained in these cell lines have not been published. This study showed that ethanol extracts of *A. indica* from India showed higher toxic activity and cytotoxic than extracts of Mexico origin. Hexane partition of neem leaf from India, showed higher activity on MCF7 and is promising as phytomedicine.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha incrementado el interés por el uso de plantas medicinales como una alternativa para obtener nuevos fármacos, debido a su gran variedad y complejidad de sus metabolitos secundarios (Saxena S. *et al.*, 2006).

Desde sus orígenes las plantas con propiedades benéficas para la salud humana han acompañado al hombre, existe evidencia que desde hace 60,000 años las usaba con fines medicinales. Se desconoce cómo se empezaron a utilizar, alrededor del año 2800 a.C., se encuentra el primer documento escrito que registra el uso de plantas medicinales perteneciente a la cultura de los sumerios. El primer tratado sobre el tema de las plantas es el Pen Tsao atribuido al emperador chino Shen Nung donde se describen y clasifican 366 hierbas con aplicaciones medicinales. Los egipcios también utilizaron las plantas con fines curativos, documentado en el Papiro de Ebers que comprende una gran lista de plantas medicinales que aun en fechas actuales siguen siendo empleadas como es el caso del Opio y el Aloe (Barquero A.A. 2007). Otros documentos se han escrito a lo largo de la historia como es el caso de la Medicina griega de Hipócrates, Avicena en la medicina árabe y Paracelso en la medicina centroeuropea, que fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas medicinales (Bermúdez A. *et al.*, 2005).

Existen documentos que prueban que las plantas se utilizan para tratar diversas enfermedades desde hace miles de años. Muchas de las drogas convencionales provienen de fuentes vegetales: hace cien años, la mayor parte de las pocas drogas efectivas derivaban de las plantas (Vickers y Zollman, 1999).

A lo largo de la historia, México ha sido una región de interés a nivel mundial por sus recursos naturales. La extraordinaria riqueza florística ubica a México en el cuarto lugar mundial, el amplio territorio que incluye áreas subtropicales, zonas templadas, desérticas y frías, ideal para el desarrollo de varias especies de plantas. El número de plantas medicinales en México asciende aproximadamente a 4,500 de especies de las cuales solo el 11% se ha estudiado químicamente, el 2.6% de forma biodirigida y solo el 1.9% con estudios farmacológicos y toxicológicos (Kakuko *et al.*, 2005).

El neem es tradicionalmente empleado en la India, su uso y propiedades se encuentran descritas en el antiguo sánscrito desde hace 4000 años, en la India se refieren al Neem como la “farmacia de la aldea” o la “botica del pueblo” debido a sus muchos fines medicinales para curar y prevenir distintas enfermedades (Conrick, 1994).

Los productos de plantas medicinales tienen una larga historia de uso en la India, China y otras regiones del mundo aunque no en todos los casos se han realizado investigaciones científicas que validen su uso (Khillare y Shrivastav, 2003).

El neem fue introducido en México en 1989 por la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo en el Municipio de Marín, actualmente se encuentra distribuido en más de 15 estados en la República Mexicana. (Leos y Salazar, 1992).

Existe actividad comprobada de que el neem presenta en las hojas y semillas efectos analgésicos, antihelmínticos antipiréticos, antisépticos, antisifilíticos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagógicos, emolientes y purgantes así mismo se ha demostrado que los extractos de neem poseen propiedades antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiviral (Firenzuoli *et al.*, 2007) y antiproliferativa contra la línea celular cancerígena PC-3 (Cáncer de Próstata). (Suresh K. *et al.*, 2005).

No existe antecedente sobre una investigación comparativa de la actividad citotóxica y fitoquímica de los extractos etanólicos de semillas y hoja de *A. indica* Neem de origen local Ébano, SLP contra la que se comercializa en la India sobre las líneas celulares mencionadas.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales cuentan en su biometabolismo con diferentes productos químicos que les ayudan a la misma planta a sobrevivir. En este caso, los metabolitos secundarios son uno de ellos. Estos están presentes en diferentes concentraciones o proporción, dependiendo de las partes de la planta, así como las condiciones ambientales, altura, suelo, temperatura, lugar de origen, nutrientes.

En nuestro país existe una gran tradición en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades, en la mayoría de los casos no existe un sustento científico que valide su uso terapéutico o que demuestre su toxicidad. Según las OMS (2003) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos y cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Nuevos compuestos naturales son aislados, caracterizados y publicados sin realizarles alguna prueba de actividad biológica, información que permanece desconocida por años. Sin acompañamiento de datos biológicos, el descubrimiento de nuevos constituyentes de plantas medicinales no es más que Fitoquímica pura (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin *et al.*, 1988).

El estudio y la investigación de los metabolitos secundarios ayudan a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (Willimason *et al.*, 1996; Domínguez 1988).

Existe un vacío en el conocimiento de la composición química de las plantas, lo que ha estimulado la investigación de nuevos compuestos químicos con actividad biológica, para ello el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios, en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas como la son los bioensayos de toxicidad (*Artemia salina*) y citotóxicos *in vitro* empleando líneas celulares (Lagarto P.A *et al.*, 2001; EPA 2002), así como métodos *in vivo* (empleando organismos como ratas, conejos y ratones) y técnicas analíticas, cromatografía, análisis espectrales de resonancia magnética nuclear, análisis infrarrojo y la espectrometría de masas en sus diferentes variantes.

En este estudio se muestra una investigación comparativa sobre la actividad citotóxica y fitoquímica de los extractos etanólicos de Semillas de *Azadirachta indica* Neem de origen local Ébano, SLP, comparada con la que se comercializa en la India.

El conocimiento de los constituyentes químicos presentes en las plantas que son consideradas medicinales pero cultivadas en regiones geográficamente y con condiciones ambientales distintas es muy importante ya que nos permitirá comparar los grupos fitoquímicos presentes y la actividad citotóxica de sus extractos y de esta manera validarlo de forma científica.

3. HIPÓTESIS

Existe diferencia en la actividad tóxica, citotóxica y fitoquímicos de los extractos de la semilla y hoja de *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss.) de origen local (Ébano, SLP), comparada con la comercializada de India, siendo la de origen hindú la que presenta mayor actividad biológica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar los fitoquímicos presentes y la actividad tóxica y citotóxica de los extractos de la semilla y hoja de *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss.) de origen local Ébano, SLP con la que se comercializa en la India.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Importar la semilla y hoja de la India, obtener la semilla y hoja de México, secar, pulverizar, desengrasar y elaborar los extractos etanólicos por el método de maceración.
2. Realizar un tamizaje sobre los principales componentes desde el punto de vista fitoquímico de los extractos de la semilla de *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss.) que se produce en Ébano, SLP, comparada con la que se comercializa de la India.
3. Determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de los extractos etanólicos de *Neem* de ambas localidades mediante el bioensayo de letalidad sobre *Artemia salina*.
4. Determinar los efectos citotóxicos de los extractos etanólicos de *Neem* de ambas localidades sobre las líneas celulares MCF-7 (Cáncer de mama) HaCaT (Queratinocitos Humanos) y CaLo (Cáncer cervicouterino).
5. Realizar particiones de los extractos etanólicos con mayor actividad y evaluar los efectos citotóxicos sobre las líneas celulares

5. ANTECEDENTES

5.1 Usos medicinales de las Plantas

En las antiguas civilizaciones la gente atribuía el poder curativo de las plantas a la intervención de los Dioses, no se sabe a ciencia cierta cómo se empezaron a utilizar pero existen pruebas que el hombre de Neandertal que vivió hace 60,000 años en el actual país de Irak usaba las plantas con fines medicinales.

Antes del nacimiento de la escritura todos los conocimientos se transmitían de forma oral, el primer documento escrito que registra el uso de las plantas medicinales aparece en una tablilla de arcilla perteneciente a la cultura de los Sumerios alrededor del año 2800 a.C. Posteriormente el primer tratado sobre plantas medicinales fue el Pen Tsao que se le atribuye al emperador Chino Shen Nung que reinó en el siglo XXVIII a.C. donde se describen y clasifican 366 hierbas con aplicaciones medicinales de aquella época. Los egipcios también utilizaron las plantas con fines curativos. El primer documento impreso más interesante es el Papiro de Ebers que comprende una gran lista de plantas medicinales que aún se utilizan hoy en día como el opio y el aloe (Barquero A.A. 2007). En la época contemporánea existe gran interés en la investigación de sustancias de plantas y prueba de ello es que diferentes compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en este campo (Domingo D. *et al.*, 2003).

La medicina tradicional es el resultado de las prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas y tiempos frecuentemente inexplicables usadas en el mantenimiento de la salud así como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. El nacimiento de la fitoterapia data de finales del siglo XIX y a principios del XX se relaciona con dos figuras claves en el desarrollo de la Microbiología, Pasteur y Fleming. Las plantas constituyen un valioso recurso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, la población depende de la medicina tradicional para recibir atención primaria. Según la OMS (2002) en muchos países desarrollados, del 48% al 75% de la población ha recurrido alguna vez a una u otra

forma de medicina alternativa o complementaria, en Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina alternativa como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales y en el continente africano hasta un 80% la emplea para satisfacer sus necesidades sanitarias. Según las OMS (2003) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos y cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la Etnobotánica que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas (Ford, 1978; Martín, 2001; Gómez-Veloz, 2002). La herbolaria es la aplicación de la botánica en la medicina, es decir el uso de hierbas contra las enfermedades que aquejan al hombre. Las investigaciones en esta área han permitido el aislamiento de principios activos de las plantas y el desarrollo de fármacos (Etkin N.L 1998).

Las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) que producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos (Balandrin M. *et al.*, 1993). La biodiversidad del reino vegetal en el mundo se estima entre 400,000 y 500,000 especies de plantas superiores a las cuales solamente a un 10% se les han realizado estudios fitoquímicos y un menor porcentaje se han sometido a pruebas farmacológicas (Hostettmann y Wolfender, 1997).

México ha sido una región de interés a nivel mundial por sus recursos naturales. La extraordinaria riqueza florística ubica a México en el cuarto lugar mundial, el amplio territorio que incluye áreas subtropicales, zonas templadas, desérticas y frías es ideal para el desarrollo de varias especies de plantas. El número de plantas medicinales en México asciende aproximadamente a 4,500 de especies de las cuales solo el 11% se ha estudiado químicamente, el 2.6% de forma biodirigida y solo el 1.9% con estudios farmacológicos y toxicológicos (Kakuko *et al.*, 2005).

5.2 Compuestos químicos de las plantas

Los vegetales a través del metabolismo secundario sintetizan los metabolitos secundarios, que en su gran mayoría integran los principios activos de las plantas medicinales químicamente pueden ser isoprenoides, derivados fenólicos y alcaloides (Kuklinski C. 2000). Los extractos vegetales crudos son mezclas complejas que están constituidas por cientos de compuestos (Bruneton J, 1991). Algunos ejemplos de metabolitos secundarios son: terpenos, aceites esenciales, saponinas, fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, alcaloides, entre otros.

Nuevos compuestos naturales son aislados, caracterizados y publicados sin realizarles alguna prueba de actividad biológica, información que permanece desconocida por años. Sin acompañamiento de datos biológicos, el descubrimiento de nuevos constituyentes de plantas medicinales no es más que Fitoquímica pura (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin *et al.*, 1988).

El estudio y la investigación de los metabolitos secundarios ayudan a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (Willimason *et al.*, 1996; Domínguez 1988).

Todavía hay un vacío en el conocimiento de la composición química de las plantas, lo que ha estimulado la investigación de nuevos compuestos químicos con actividad biológica, para ello el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios, en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica. Algunas de las técnicas analíticas útiles son la cromatografía, los análisis espectrales de resonancia magnética nuclear, análisis infrarrojo y la espectrometría de masas en sus diferentes variantes (Harvey A, 1999).

5.3 Análisis fitoquímico

La investigación de los metabolitos secundarios ayuda a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (Willimason *et al.*, 1996). Algunos de estos compuestos han sido de gran beneficio para el desarrollo de medicamentos y son una rica fuente de precursores de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica (Mishra *et al.*, 2011). La desaparición de la selva tropical como fuente de compuestos químicos con utilidad farmacológica, lleva a la rápida extinción de muchas especies vegetales, lo que motiva a promover y apresurar los estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies utilizadas en la medicina popular (Elvin-Lewis, 2001; Etkin, 1998).

En la investigación fitoquímica, se utilizan métodos de separación, principalmente cromatográficos, y métodos espectroscópicos para la elucidación estructural. La espectroscopia es una técnica que mide la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopia ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopia de resonancia magnética nuclear). Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética. El aislamiento e identificación de los constituyentes vegetales en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica. Algunas de las técnicas analíticas útiles son la cromatografía, los análisis espectrales de resonancia magnética nuclear, análisis infrarrojo y la espectrometría de masas en sus diferentes variantes (Harvey, 1999).

5.3.1 Aislamiento de metabolitos secundarios

Cualquier molécula biológica es un “producto natural”, pero este concepto es reservado usualmente a los metabolitos secundarios, pequeñas moléculas producidas por un organismo pero que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo. El concepto de metabolitos secundarios incluye moléculas o productos biológicos derivados del metabolismo como un resultado a limitación de nutrientes, mecanismos de defensa y moléculas reguladoras. El aislamiento de los metabolitos secundarios difiere del aislamiento de las macromoléculas biológicas más abundantes como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, debido a que los metabolitos secundarios son moléculas más pequeñas y químicamente más diversas, además de encontrarse en cantidades muy pequeñas, por lo que los métodos de aislamiento deben variar y tomarse en cuenta (Cannell, 1998). Valencia (1995) menciona que las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos, las formas de aislar los principios activos presentes en las plantas son muy diversas entre los que describe: precipitación disolvente- disolvente, extracción líquido-líquido; para su caracterización recomienda reacciones coloridas, métodos cromatográficos, electroforéticos y de espectrofotometría.

5.3.2 Extracción con solventes

El primer paso de la extracción es liberar y solubilizar los metabolitos secundarios a través de la extracción acuosa o con solventes. Esto puede ser hecho por una serie de extracciones, usando solventes de polaridad variable y creciente, los cuales actúan como el primer paso del fraccionamiento o usando un solo solvente “universal” como el etanol, el cual disuelve la mayoría de los productos naturales al mismo tiempo que los libera de la matriz celular. Los materiales insolubles tales como la fibra y otros precipitados, pueden ser removidos mediante filtración o centrifugación (Cannell, 1998).

5.3.3 Identificación química

Para las mezclas de productos naturales que han sido extraídos con solventes, las pruebas químicas más comunes son las colorimétricas, que dan una indicación visual de la presencia de varios grupos funcionales, cuando un reactivo reacciona con un metabolito y se produce un compuesto colorido (Cannell, 1998).

Las técnicas más comunes para la detección de grupos funcionales son: Glúcidos, Gomas, mucilagos, lípidos, ceras, cumarinas, flavonoides, antoncianinas, leucoantocianos, antraquinonas, taninos, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides.

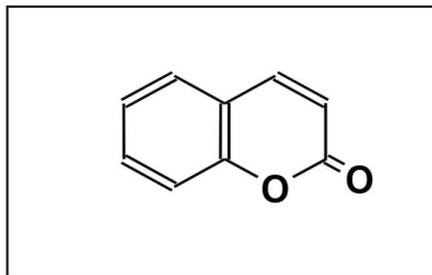


Figura 1. Estructura básica de una cumarina

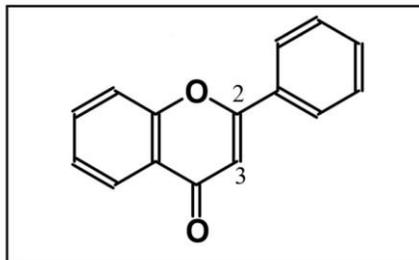


Figura 2. Núcleo básico de los flavonoides

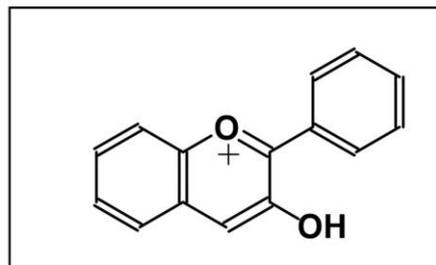


Figura 3. Estructura de la molécula de antociano

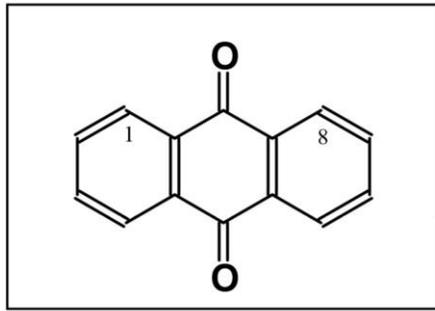


Figura 4. Estructura general de una antraquinona

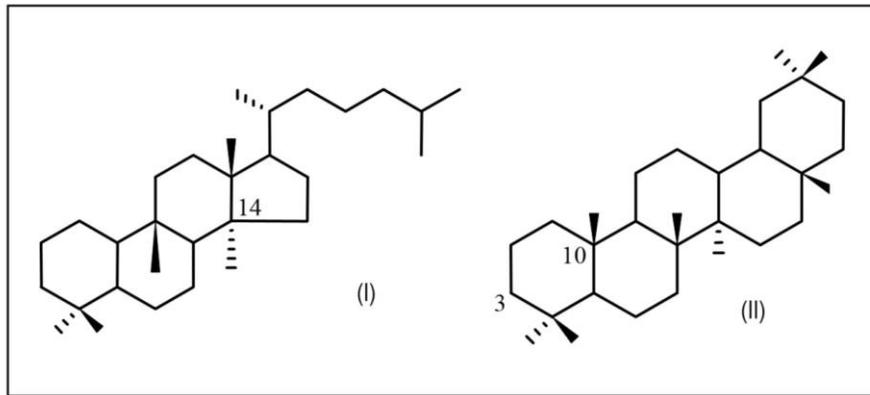


Figura 5. Molécula de triterpenos

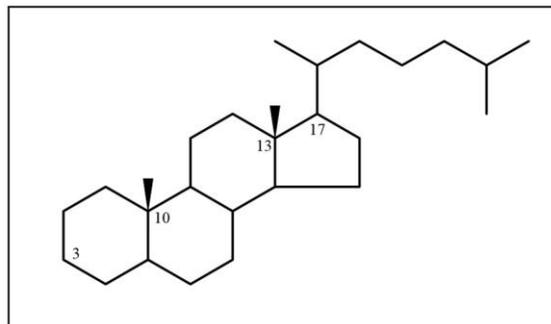


Figura 6. Estructura general de los esteroides

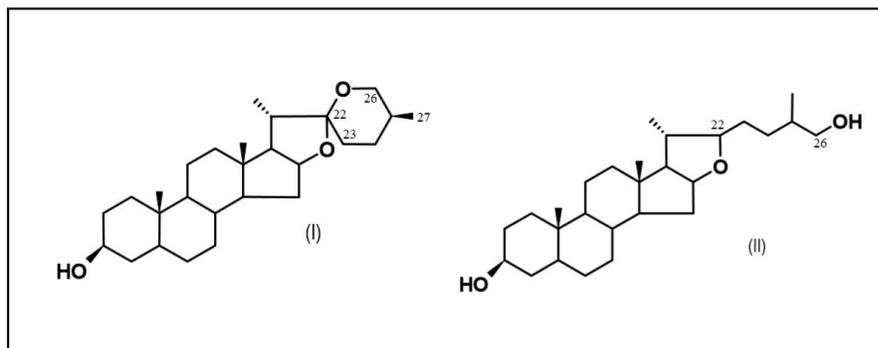


Figura 7. Estructura general de las saponinas

5.4 *Azadirachta indica* A. Juss (Neem)

Azadirachta indica A. Juss pertenece a la familia Meliaceae y es conocida comúnmente como margosa y paraíso de la india en español y como Neem en inglés e hindú, es un árbol de tamaño mediano a grande (Figura 8), caracterizado por su tronco corto y recto, de hojas alargada y pinadas. Las flores aparecen en panículas estrechas y ramificadas de 5 a 15 cm de largo, las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos de cáliz redondeados y de un color pálido (Figura 9), florece entre marzo y mayo. Los frutos tiene forma de aceituna (drupas) de 1.0 a 2.0 cm de largo, lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduran (Figura 10). Los frutos maduran en junio a agosto (López y Angulo, 2007).



Figura 8. Árbol del Neem



Figura 9. Flores de Neem



Figura 10. Frutos en forma de aceituna del Neem

5.4.1 Clasificación taxonómica *A. Juss*

Reino: Plantae

División: Spermatophyla

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Geraniales

Familia: Meliaceae

Género: *Azadirachta*

Especie: *A.indica* A. Juss

(Wren R.C. 1994)

5.4.2 Composición química *Azadirachta indica* A. Juss (Neem).

Los principales compuestos que han sido aislados son triterpenos y tetranortriterpenoide como ejemplo de ellos es la azadiractina (Figura 11) y limonoides entre otros (López y Angulo, 2007).

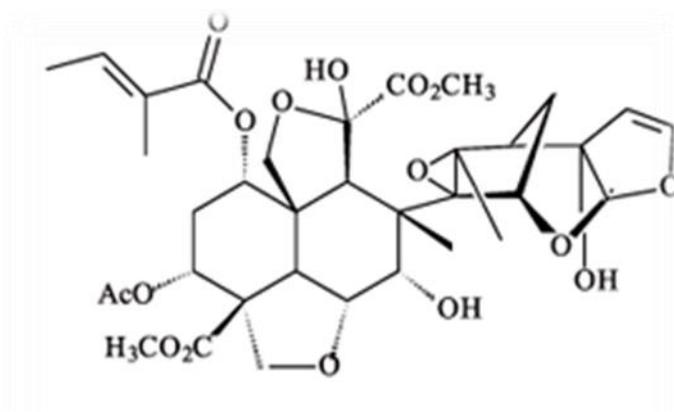


Figura 11. Estructura química de la azadiractina

5.4.3 Usos en medicina tradicional de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem).

El neem es tradicionalmente empleado en la India, su uso y propiedades se encuentran descritas en el antiguo sánscrito desde hace 4000 años, en la India se refieren al Neem como la “farmacia de la aldea” o la “botica del pueblo” debido a sus muchos fines medicinales para curar y prevenir distintas enfermedades (Conrick, 1994).

El árbol de neem es una planta increíble que ha sido declarado el "Árbol del siglo 21 ", de las Naciones Unidas (ONU 2012). La Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. publicó un informe en 1992 titulado " Neem: Un árbol para resolver problemas globales" (NAS 1992).

Las hojas, semillas, flores y aceites del árbol poseen efectos analgésicos, antihelmínticos antipiréticos, antisépticos, antisifilíticos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagógicos, emolientes y purgantes. Se ha demostrado que los extractos de Neem poseen propiedades antibacteriana, antidiabética, antifúngica y antiviral (Firenzuoli F *et al.*, 2007) y antiproliferativa contra la línea celular cancerígena PC-3 (Cáncer de Próstata) (Suresh K. *et al.*, 2005).

La investigación científica de las plantas utilizadas en medicina tradicional con un enfoque multidisciplinario se ha incrementado en todo el mundo, una gran variedad de especies se han estudiado y se ha acumulado suficiente evidencia científica sobre sus propiedades farmacológicas (Dahanukar y Kulkarini, 2000). Con este conocimiento, la industria farmacéutica a partir de los ingredientes activos aislados de las plantas ha logrado sintetizar aproximadamente el 25 % de los medicamentos más exitosos del mercado, por ejemplo la aspirina y el tamoxifén (Tripathi, 2003).

5.5 Bioensayos de Toxicidad.

Un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, permite realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones de concentración-respuesta bajo condiciones controladas, al llevar a cabo bioensayos es necesario llevar cabo estandarizaciones de referencia. El principal objetivo de este estudio es evaluar el nivel de estímulo necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. Existen métodos alternativos como el bioensayo *in vitro* para determinar la toxicidad en larvas de *Artemia salina* (Lagarto P.A *et al.*, 2001; EPA, 2002).

Se han publicado estudios que sugieren evaluar como primer paso, realizando un rastreo toxicológico mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando diversas especies (Guilhermino *et al.*, 2000), lo cual permite determinar de manera preliminar la toxicidad de nuevos y diferentes químicos con la ventaja de que es económico y por lo tanto se reduce el sacrificio de animales de experimentación (Kazuko *et al.*, 2005).

El Dr. Jerry L. McLaughlin y colaboradores dan comienzo con la introducción de algunos bioensayos primarios como el de la *Artemia salina*, comenzando así la época caracterizada por los “screenings” y el “fraccionamiento” (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin *et al.*, 1988). Este fraccionamiento consiste en la aplicación de técnicas de separación y aislamiento sobre un determinado extracto, con el objeto de hacer un seguimiento de la actividad biológica de las fracciones y compuestos puros obtenidos, para finalizar en la identificación de o los principios activos responsables de la actividad demostrada por el extracto original.

5.5.1 Bioensayo con *Artemia salina*

La evaluación de la actividad tóxica de las plantas medicinales juega un papel importante para el establecimiento de los criterios de seguridad y efectividad promovidos por la Organización Mundial de la Salud (Vidal *et al.*, 2009; Kumar, 2003). Para la seguridad y eficacia de las fitomedicinas y productos herbolarios, además de las pruebas fitoquímicas y farmacológicas deberían documentarse estudios de su toxicidad (Bilia *et al.*, 2000). La prueba *in vitro* de toxicidad con nauplios de *Artemia salina*, es un ensayo de mucha utilidad en la búsqueda de nuevas drogas antitumorales. Se considera como una prueba general de toxicidad y un complemento de valoración farmacológica de extractos de plantas (Meyer *et al.*, 1982; Molina Salinas *et al.*, 2006). Tiene la ventaja de ser un bioensayo sencillo, rápido y altamente sensible. Consiste en la determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal Media) de los extractos de las plantas, aquellos que presentan una DL₅₀<1000 mg/L, es muy probable que contengan uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para repetir bioensayos a concentraciones menores. Permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros; y además comparar varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales. También puede ser utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos (McLaughlin *et al.*, 1998).

Con este bioensayo, es posible determinar los componentes activos a partir de pequeñas cantidades de muestra en términos de concentración (µg/mL), con un intervalo de confianza del 95% (Balandrin *et al.*, 1993). La biología y la fisiología de los nauplios de *Artemia salina* se han estudiado extensamente, debido a que éstas son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas, se considera que una planta es tóxica cuando la DL₅₀ es menor a 200 µg/mL (McLaughlin *et al.*, 1998).

5.5.1.1 Taxonomía de *Artemia salina*

Filo: Artrópoda

Subfilo: Crustácea

Clase: Branchiopoda

Subclase: Sarsostraca

Orden: Anostraca

Familia: Artemiidae

Género: *Artemia*

A. salina (Linnaeus, 1758)

(Alireza et al., 2010)



Figura 12. Nauplios de *Artemia salina*

5.5.2 Bioensayos de citotoxicidad con Líneas Celulares

Los ensayos de citotoxicidad, son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Arencibia *et al.*, 2003).

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar. Más aún: si el método es aplicable a técnicas de barrido o tamizaje de alta eficiencia (HTS) y las células pueden ser usadas para más experimentos se habrá adquirido una herramienta excepcional (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2000). Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, el uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. Segundo, los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa, y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT);(3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi-metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y (23-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)- 2H-tetrazolio-5-carboxanilido) (XTT), los cuales al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración.

El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (Putnam *et al.*, 2002; Bernas *et al.*, 2002). Dicho método fue desarrollado por Mosmann (1983) como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas es preciso y rápido.

Así mismo otro colorante utilizado en los ensayos de citotoxicidad, resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resofurina (rosado altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos. Este colorante es poco tóxico para las células (no así otras técnicas descritas), y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, es sensible y altamente reproducible. Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y/o fluorescencia en 530 nm 590 nm, ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas. Por ello, los métodos de reducción de resazurina y MTT reconocidos como sistemas de medida indirecta de masa celular, son útiles para evaluar la viabilidad y supervivencia en tratamientos de citotoxicidad (Drumond *et al.*, 2000; Lieberman *et al.*, 2001; Rolón *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2010).

5.5.2.1 Líneas celulares

Una línea celular se define como un grupo de células de un tipo único (Humano, Animal o Vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente *in vitro* y que se usan en investigación (INC, 2010).

En el campo del cáncer, los ensayos *in vitro* son principalmente de dos tipos:

- Ensayos moleculares
- Ensayos celulares

Los moleculares tienen como objetivo actuar directamente a nivel subcelular y son particularmente muy eficientes. Los ensayos celulares pueden dividirse en dos tipos: (a) los ensayos de citotoxicidad, y (b) otros tipos de ensayos incluidos los ensayos morfológicos, (Atta-ur- R. *et al.*, 2001).

Los ensayos de evaluación *in vitro*, empleando líneas celulares derivadas de neoplasias humanas, se han convertido en una de las principales herramientas de apoyo para realizar evaluación citotóxica de extractos vegetales, y al ser un modelo experimental *in vitro*, es una alternativa al empleo de animales de laboratorio que ha permitido en los últimos años la búsqueda de nuevos principios activos, siendo una técnica sensible y sencilla, que genera resultados reproducibles y válidos, adaptable a un alto número de muestras de distinto origen (Lieberman M.M. *et al.*, 2001; Reed JC. *et al.*, 2005), que permite reducir tiempo, costos de investigación y costos éticos relacionados con el uso de animales de laboratorio, por otra parte son útiles para diferentes tipos de estudios relacionados con mecanismos celulares y moleculares (Prieto S.O. *et al.*, 2009; Freshney I.R., 2000).

El Instituto Nacional de Cáncer (INC) en Bethesda, Maryland, ha utilizado de forma amplia pruebas de extractos de plantas. Sin embargo la citotoxicidad algunas veces conduce a compuestos que no muestran actividad *in vivo*, resultando altamente costoso, ya que la citotoxicidad *in vitro* no se correlaciona con la actividad *in vivo*. Por estas razones las muestras *in vivo* fueron remplazadas por un sistema *in vitro* el cual comprende cerca de 60 líneas celulares de tumores cancerígenos humanos (Atta-ur- R. *et al.*, 2001)

5.5.2.1.1 Línea celular MCF-7 Cáncer de mama

MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama aislado en 1970 a partir de una mujer de 69 años de raza blanca. MCF-7 (Figura 13) es el acrónimo de la Fundación del Cáncer de Michigan - 7, en referencia al instituto en Detroit, donde se estableció la línea celular en 1973 por Herbert Soule y compañeros de trabajo. La Fundación del Cáncer de Michigan se conoce ahora como el Instituto Bárbara Ann Karmanos Cancer (Soule HD, *et al.*, 1973).

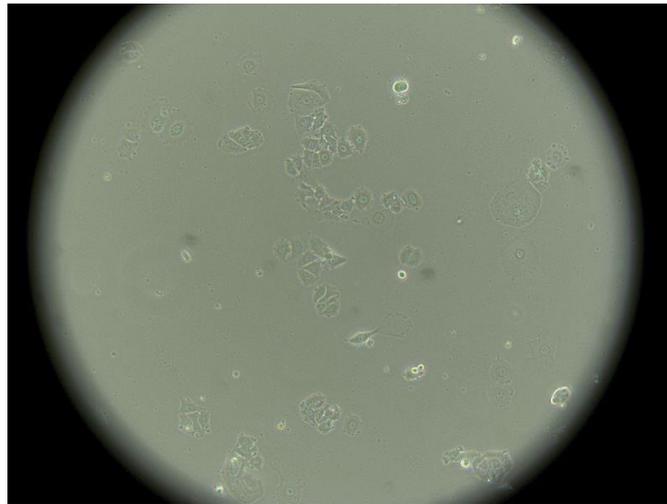


Figura 13. Línea Celular MCF-7

5.5.2.1.2 Línea celular HaCaT Queratinocitos humanos

HaCaT es una línea celular de queratinocitos humanos utilizada en la investigación científica. Las células HaCaT (Figura 14) se utilizan por su alta capacidad de diferenciarse y proliferar *in vitro*. Su uso en la investigación permite la caracterización de los recursos humanos queratinocitos utilizando un modelo que es reproducible y se ocupa de cuestiones tales como la vida útil de cultivo a corto y variaciones entre las líneas de células que de otra manera se encontrarían. Estas células han permitido la caracterización de varios procesos, y comparaciones de actividades citotóxicas de distintos extractos vegetales para su validación. (Schoop, VM, *et al.*, 1999)

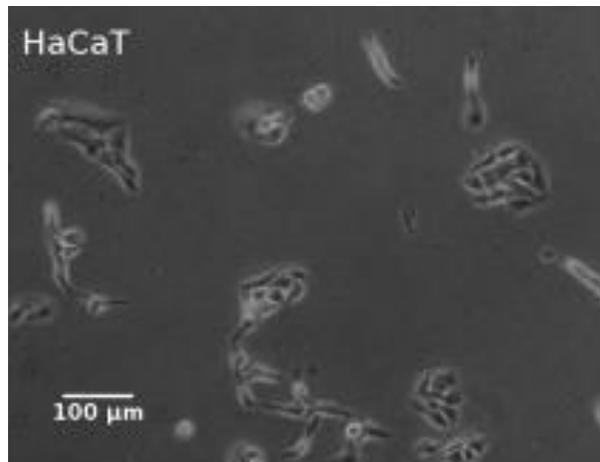


Figura 14. Línea Celular HaCaT

5.5.2.1.3 Línea celular CaLo Cáncer cervicouterino

La línea celular CaLo fue derivada para su uso en la investigación del cáncer. Estas células proliferan anormalmente rápido, aún comparadas con otras células cancerígenas. Debido a su adaptabilidad para crecer en cajas de cultivo, las células CaLo en ocasiones son difíciles de controlar. Han probado ser muy persistentes ya que contaminan otros cultivos celulares en el mismo laboratorio, interfiriendo con otras investigaciones biológicas y forzando a los investigadores a invalidar muchos de los resultados de sus estudios. El grado de contaminación de las células CaLo entre otros tipos celulares es desconocido ya que pocos investigadores examinan la identidad o pureza de linajes celulares previamente establecidos. Ha sido demostrado que entre el 10 e incluso 20% de los linajes celulares *in vitro* están contaminados con esta línea celular (Scherer, W, *et al.*, 1973).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar, área de trabajo y periodo de estudio

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en Monterrey NL, Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED en Gómez Palacio Durango y en el Laboratorio de Etnofarmacología del Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la UA de C. en un periodo comprendido de Agosto del 2010 a Julio del 2013.

6.2 Material biológico

6.2.1 Vegetal

A) *Hoja y semilla de neem* de origen hindú.

B) *Hojas y semillas de neem* de origen mexicano.

6.2.2 Líneas celulares

Línea celular **MCF-7** (Cáncer de mama)

Línea celular **HaCaT** (Queratinocitos humanos)

Línea celular **CaLo** (Cáncer cervicouterino)

Donadas por el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

6.2.3 Huevecillos de *Artemia salina*

Para el bioensayo de letalidad de *A. salina*, se adquirieron huevecillos en Estados Unidos (Brine Shrimp Eggs, San Francisco Bay Brand INC)

Métodos

6.3 Desengrasado de Semilla

Las semillas fueron desengrasadas con hexano, se pesaron 30 gramos de semillas pulverizadas en una licuadora convencional (Osterizer), se colocaron en un frasco volumétrico de 250mL adicionando 200 mL de hexano. Se mezcló durante 15 min, se deja reposar durante 24 h. Usando tela de organza, la mezcla se filtró para recuperar la semilla desengrasada, nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente por 2 h (Figura 15) (Coventry E. *et al.*, 2001)



Figura 15. Diagrama de desengrasado de semilla

3.4 Obtención de los extractos etanólicos de *A. indica*

Los extractos de neem de Origen Mexicano e India se clasificaron en cuatro tipos de cada país: semilla, cáscara de semilla, hoja y semilla con cáscara (Figura 16). El material vegetal se colocó en un desecador con aireación por un periodo de cinco días a 45 ° C, una vez seco se molió en un molino mecánico (Wiley) obteniendo un polvo fino (Navarro *et al.*, 2006).



Figura 16. Semilla con cascara de Neem, Semilla y cascara de neem

Para la obtención de los extractos etanólicos se pesaron en una balanza analítica (Ohaus) 30 g de material vegetal seco triturado y se adicionaron 300 mL de metanol (CTR Scientific) grado reactivo en un matraz Erlenmeyer, se tapó con papel parafilm y se agitó a baja velocidad en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) y temperatura ambiente por 24 h, el macerado se filtró en papel filtro (Whatman International LTD. England) de poro grueso en matraz kitazato con bomba de vacío (Auto Science), repitiendo el proceso tres veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión.

El filtrado del macerado se destiló en un Rotaevaporador (LEV211-V) para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en una estufa de aire caliente (Riossa) a temperatura menor a 50° C (Figura 17). Los extractos secos se almacenaron

en refrigeración a 4° C en frasco ámbar hasta su utilización (Navarro *et al.*, 2006; Nostro y Germano, 2000; Rodríguez *et al.*, 2010). El cálculo del rendimiento de la extracción se obtuvo de la siguiente fórmula (García *et al.*, 2010).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P}{PI} \times 100$$

Dónde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer

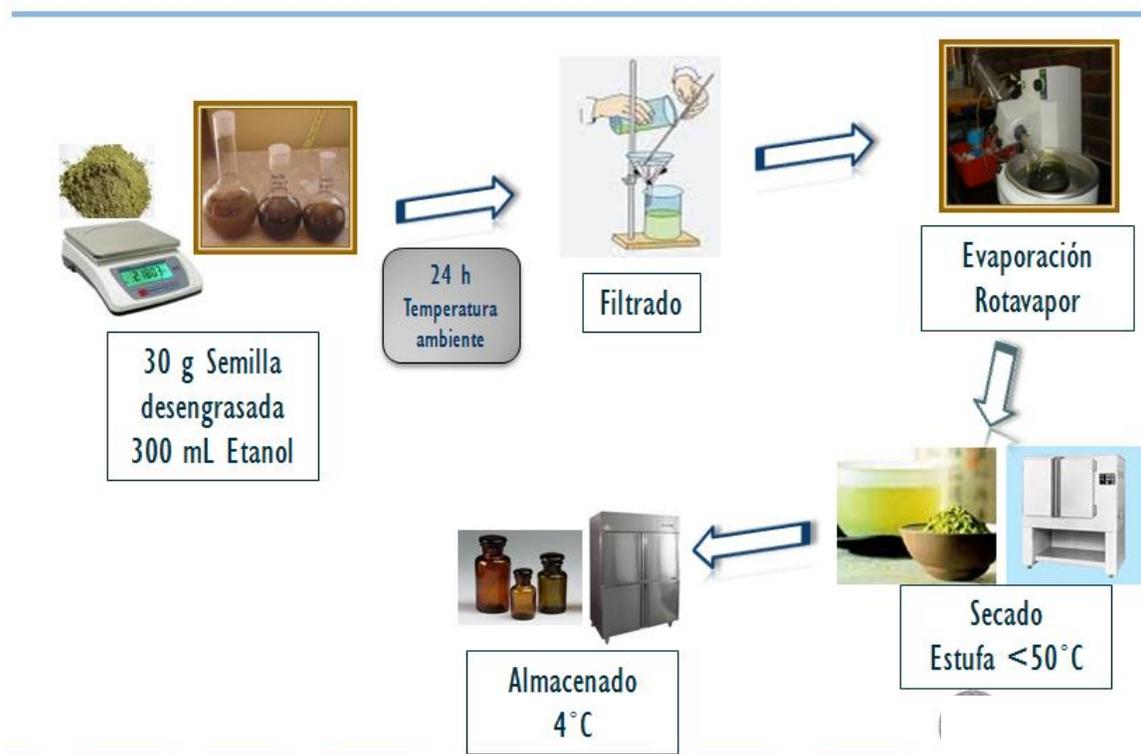


Figura 17. Diagrama de la obtención de los extractos etanólicos

6.5 Identificación parcial de los componentes de los extractos

Para la determinación inicial de los principales principios activos presentes en los extractos etanólicos de *A. indica* A. Juss, se realizaron pruebas químicas de identificación. Las soluciones de los extractos se prepararon a una concentración de 50 mg/mL disueltos en etanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos para las reacciones con el propósito de identificar los grupos químicos: Glúcidos, Gomas, mucílagos, lípidos, ceras, cumarinas, flavonoides, antocianinas, leucoantocianos, antraquinonas, taninos, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides. (Harborne JB, 1998)

6.5.1 Detección de glúcidos

Este amplio grupo fitoquímico se determinó mediante la reacción de Molish: a 0.5 mL de extracto se añadieron 2 gotas de una solución etanólica de α -naftol al 10% y 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado resbalando por las paredes, formándose dos capas. Es reacción positiva cuando se presenta un anillo de color violeta en la interfase. (Galisteo Moya, 1997)

6.5.2 Detección de gomas y mucílagos

Estos grupos fitoquímicos se caracterizan por ser insolubles en etanol de 96°, la detección se realizó añadiendo un exceso de alcohol a 1mL del extracto. La aparición de un precipitado floculante confirmó la existencia de este tipo de compuesto en el extracto analizado. (Galisteo Moya, 1997)

6.5.3 Detección de lípidos y ceras

A 1 mL de extracto se añadió 1 mL de reactivo de Serger (solución de molibdato sódico a 1% en H₂SO₄) preparado en el momento de hacer la prueba. La reacción se considera positiva cuando la capa inferior se colorea de gris azulado. (Galisteo Moya, 1997)

6.5.4 Detección de cumarinas

Se añadió 1 mL de solución metanólica del extracto en un tubo de ensayo, el cual se cubrió con un trozo de papel filtro previamente impregnado con una solución diluida de KOH. Se calienta al baño maría durante 10-15 min. La presencia de cumarinas volátiles se pone de manifiesto por la fluorescencia azulada del papel de filtro a la luz UV. (Galisteo Moya, 1997).

6.5.5 Detección de flavonoides

A 1 mL del extracto se le adicionó 2 ó 3 gotas de HCl concentrado y un fragmento de cinta de magnesio. Dependiendo del tipo de flavonoide presente aparecerá una coloración diferente (Galisteo Moya, 1997).

- Anaranjado » Flavonas
- Rojo » Flavanonas
- Rojo Azulado » Flavonoles
- Violeta » Flavonoles y xantonas

6.5.6 Detección de antocianinas

A un mL de extracto se le adicionaron 2 mL de HCl al 37% QP. Se calentó a baño maría durante 30 min con objeto de producir la hidrólisis de los heterósidos. Una vez transcurrida la reacción se enfría el tubo y se le añade alcohol isoamílico, agitando vigorosamente para favorecer la extracción de las geninas. La aparición de color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianos (Galisteo Moya, 1997).

6.5.7 Detección de taninos

Se añadió a 1 mL del extracto, 2 ó 3 gotas de solución acuosa de Fe Cl_3 al 1 % de formaldehído, hirviéndose durante varios minutos. La aparición de un precipitado indicaría la presencia de taninos catéquicos. Se filtra y si al añadir unas gotas de Fe Cl_3 al 1 %, aparece un color azul, indicaría la presencia de taninos pirogálicos (Ali Tahir, 1991).

6.5.8 Detección de antraquinonas

Se determina mediante la reacción de Bornträger. A 1 mL de extracto se le añadió 1 mL de NaOH 1N, agitando para que se mezclen las fases. Tras dejar en reposo la reacción es positiva si en la fase acuosa aparece una coloración rojiza debida a las sales de los compuestos 1,8- dihidroxiantraquinónicos (Galisteo Moya, 1997).

6.5.9 Detección de Terpenos y Esteroides

Estos grupos fitoquímicos se ensayan mediante la reacción de Liebermann-Burchard. Se parte de 1 mL del extracto, al que se adiciona 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado dejándolo resbalar suavemente por las paredes del tubo. La presencia de un anillo rojizo en la interfase es indicativa de la existencia de triterpenos y siendo característica de los esteroides la coloración verdosa en fase superior (Galisteo Moya, 1997).

6.5.10 Detección de saponinas

Este ensayo se basa en el poder afrógeno de estos compuestos. Para detectarlas se realizó una redisolución del residuo seco al 10 % en agua a ebullición y se deja enfriar. Se agitó vigorosamente durante 1 min, en tubos de ensayo de 15 mm de diámetro exterior, con la consiguiente formación de espuma. La reacción se considera positiva cuando dicha espuma persiste transcurridos 30 min (± 1 min) (Galisteo Moya, 1997).

6.5.11 Detección de alcaloides

Se ensayan de manera independiente sobre 1 mL del extracto, dando lugar a precipitados de distinta coloración:

- Reactivo de Bouchardat » precipitado rojo ladrillo
- Reactivo de Mayer » precipitado blanco amarillento
- Reactivo de Hager » precipitado amarillo limón
- Reactivo de Dragendorff » precipitado castaño rojizo

6.5.12 Detección de leucoantocianos

Se basa en la propiedad de estas sustancias de transformarse en antocianidinas, compuestos de color rojo en presencia de un ácido fuerte. Para ello se calentaron 2 mL del extracto etanólico en presencia de HCl concentrado, apareciendo color rojo a naranja en caso de reacción de reacción positiva. (Galisteo Moya. 1997)

6.6 Toxicidad de los extractos etanólicos de *A. indica* A. Juss sobre *A. salina*

Se valoró la actividad tóxica de los extractos etanólicos de *A. indica* con nauplios de *Artemia salina* por el método descrito por Meyer *et al.*,(1982), modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006) (Figura 18). Para la eclosión de los huevecillos de *A. salina*, se colocaron en agua de mar artificial (40 g de sal de agua de mar (Instant Ocean®, Aquarium System), 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson). Se aforaron en un litro de agua bidestilada (Quimicrón). Se pesaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) y se depositaron en un recipiente de vidrio de color negro dividido con 100 mL de agua de mar artificial, se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación.

Uno de los compartimentos se iluminó con una lámpara de 20 watts de luz blanca. Después de 48 h de incubación se tomaron 10 nauplios con micropipeta (LabMate Soft) para transferirlos a una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 100 μ L de la suspensión de nauplios/pozo más 100 μ L de las diluciones de los extractos diluidos en agua de mar. Se utilizaron 50, 100, 250, 500 y 1000 μ g mL⁻¹ de extracto en cinco repeticiones. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentración de 400 ppm (Vega-Menchaca *et al.*, 2013) y agua de mar como control negativo. Después de 24 h y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Labomed), se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración, y se calculó la Dosis letal media (DL₅₀) del extracto utilizando el método estadístico Probit de Finney (Anderson *et al.*,1991).

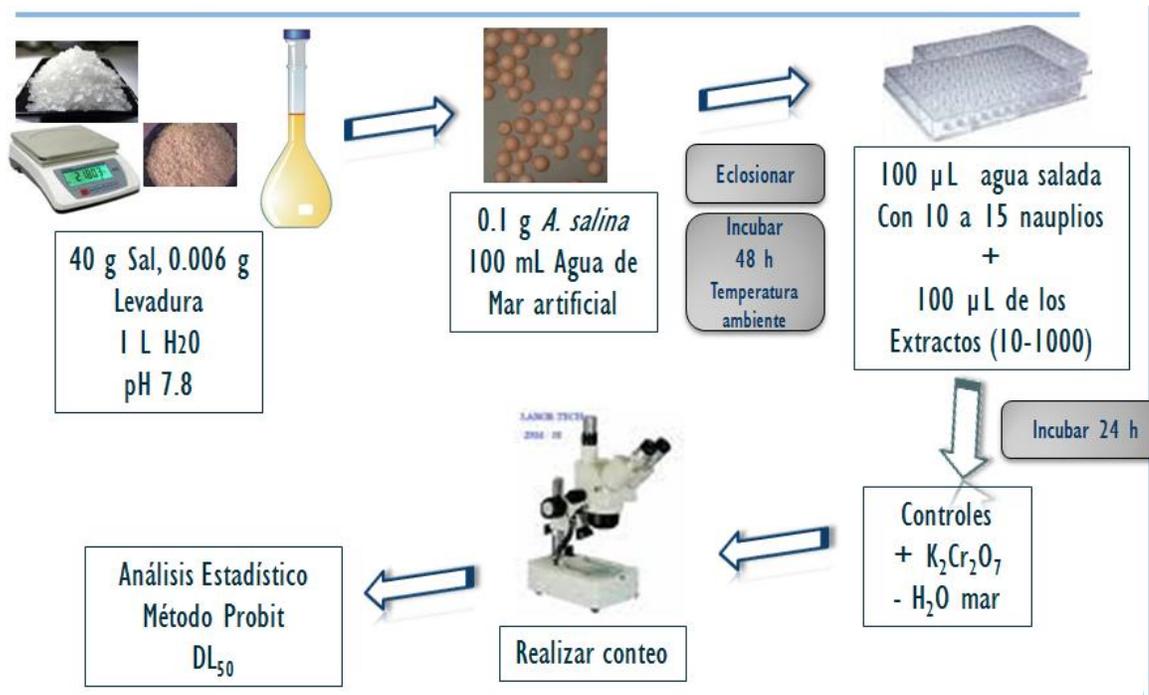


Figura 18. Diagrama del ensayo de letalidad de los extractos sobre *A. salina* en microplaca

6.7 Determinación de citotoxicidad del extracto y particiones en líneas celulares

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos se emplearon las líneas celulares MCF-7 (Cáncer de mama), HaCat (Queratinocitos Humanos) y CaLo (Cáncer cervicouterino). Las células se propagaron en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro, Herndon Sigma[®]) suplementado con 2 mL de glutamina (Sigma[®]-Aldrich, St. Louis, USA), gentamicina 50 mg (Sigma[®]-Aldrich, St. Louis, USA) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, SIGMA[®]). Se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) de la línea celular, realizando la exclusión con azul de tripano (Sigma[®]-Aldrich, St Louis, USA) para comprobar su viabilidad se colocaron 3,000 células/pozo en un volumen de 100 µL de medio DMEM en microplacas de 96 pozos (Corning Inc. Costar[®]), posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ en incubadora de cultivo (*Lab-line* Mod 485).

Los extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0.001 µg/mL. Posteriormente se prepararon diluciones de los extractos en DMEM a una concentración final de 3.12, 6.25, 12.0, 25.0, 50.0 y 100.0 µg/mL, se adicionaron 100 µL/pozo de cada dilución, el ensayo se realizó por cuadruplicado.

El DMSO se utilizó como control negativo y Taxol como control positivo se evaluó individualmente para citotoxicidad de forma similar a los extractos, las placas se incubaron durante 72 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C. Luego de 72 h se adicionaron 20 µL MTT (sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma[®]-Aldrich, St Louis, USA). Al cabo de 4 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C se decantó el medio, se adicionaron 200 µL/pozo de DMSO y se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISA (Dynatech[®]MR5000) a 560 nm y 630 nm como referencia (Figura 19).

El porcentaje de células muertas se determinó a partir del promedio de las absorbancias obtenidas de controles tratados y no tratados. Se graficaron los valores de concentración de los extractos contra el porcentaje de viabilidad para obtener la IC₅₀. Los valores de absorbancia mostraron una relación lineal con el número de células viables. Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS 17.0 (Kakuko *et al.*, 2005; Umeh *et al.*, 2005; Hamid., 2004; NCCLS, 2001).

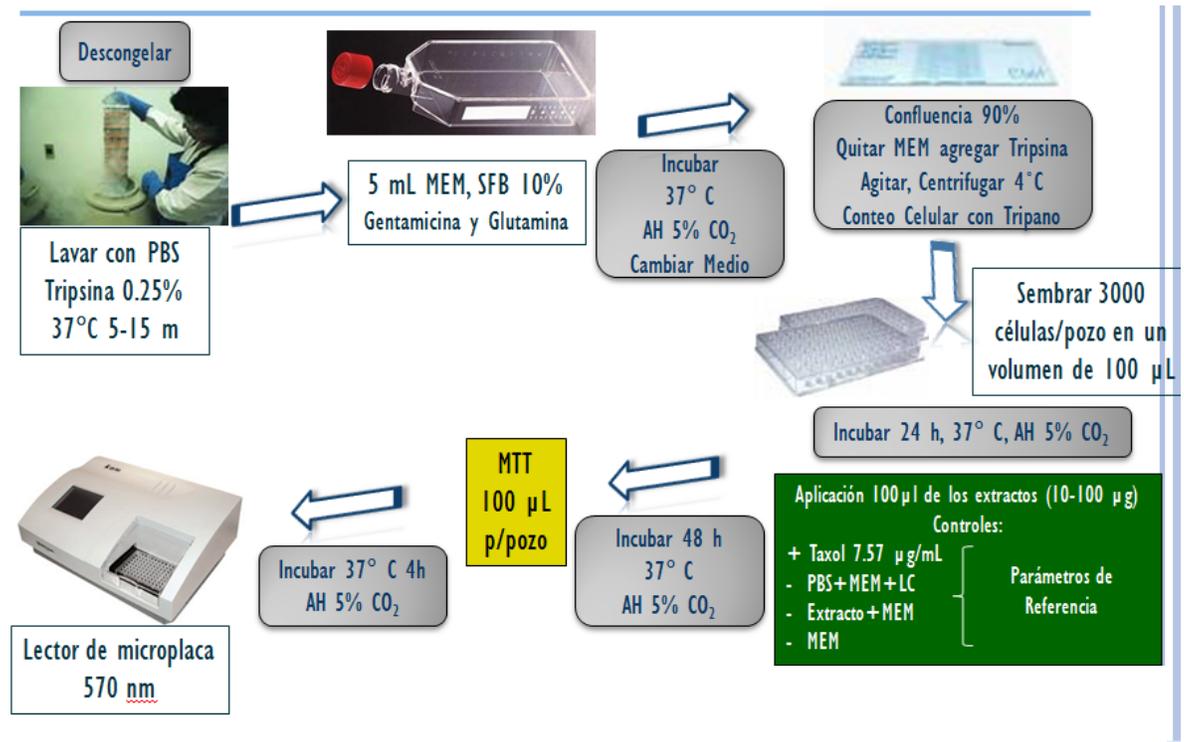


Figura 19. Diagrama de la prueba de citotoxicidad con la línea celular MCF7 (Cáncer de mama), HaCaT (Queratinocitos Humanos) y CaLo (Cáncer cervicouterino)

6.8 Particiones de los extractos crudos de hoja y semilla de *A. indica*

Por ser los extractos que presentaron mayor bioactividad de los cuatro extractos se procedió a realizar la partición del mismo sometándolo a calentamiento en un vaso de precipitado con 50 mL de hexano agitándolo constantemente hasta su punto de ebullición de 50 °C durante aproximadamente 5 min, posterior al calentamiento se separó, la fracción soluble en hexano y se llevó al rota-evaporador, con la fracción insoluble en hexano se repitió este procedimiento. Una vez que se obtuvo el mayor contenido de compuestos solubles en hexano, a la fracción insoluble se adicionaron 50 mL de cloroformo repitiendo el procedimiento.

6.9 Análisis estadístico

En el ensayo de letalidad con *A. salina*, la DL_{50} se calculó con el paquete estadístico Probit. La CMI se obtuvo con el Paquete estadístico STATA versión 11.0 (Corporation, Texas, USA) calculando la tendencia de los datos con Probit. Los valores de IC_{50} (citotoxicidad) del extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (número de células) mediante el análisis de regresión lineal utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.

6.9.1 Análisis Probit

Este método se basa en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal. El modelo es aplicable solo para aquellos fenómenos de los que se dispone de la “ecuación Probit” (Figura 20) (Ferrán, 2001). El resultado es una curva con estas características:

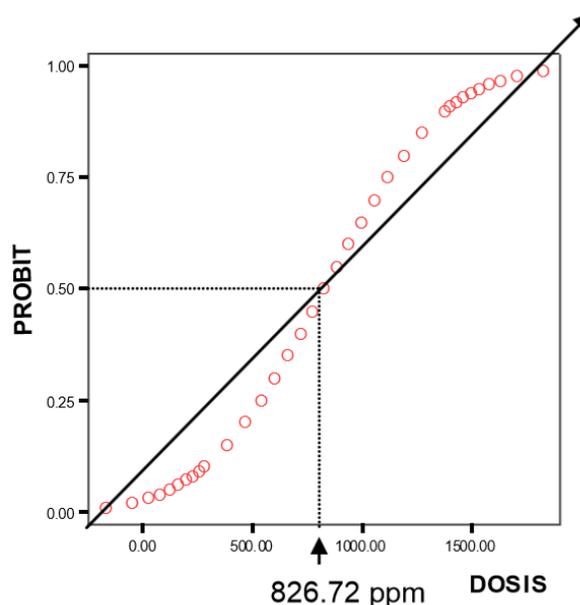


Figura 20. Grafica Probit curva dosis respuesta (Mercado-Fernández 1998)

7. RESULTADOS

7.1 Recolección e identificación del material vegetal de estudio

7.1.1 Material vegetal originario de la India

Las *hojas y semillas de neem* fueron importadas de Coimbatore, Tamil Nadu, India, en las coordenadas 11° 0' 0 N 76° 58' 0 E, con una altitud de 379 m sobre el nivel del mar. con la autorización del Certificado Fitosanitario de Importación SEMARNAT Folio No. 09/2012-01773 y Permiso Sanitario de Importación COFEPRIS SSA No de Autorización 123301109A0907.

7.1.2 Material vegetal originario de México

Las *hojas y semillas de neem* de origen mexicano se recolectaron en la zona rural Ébano, SLP en las coordenadas 22° 13' 0 N 98° 23' 0E con una altura sobre el nivel del mar de 50 m.

Un ejemplar de cada especie de origen mexicano fue montado en prensa botánica y se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su identificación, el de origen hindú tenía su certificado de importación y autenticidad.

La elección de la planta fue debido a que existe actividad comprobada que ésta presenta en las hojas y semillas efectos analgésicos, antihelmínticos antipiréticos, antisépticos, antisyfílicos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagógicos, emolientes y purgantes así mismo se ha demostrado que los extractos de neem poseen propiedades antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiviral (Firenzuoli *et al.*, 2007).y antiproliferativa contra la línea celular cancerígena PC-3 (Cáncer de Próstata). (Suresh K. *et al.*, 2005)

7.2 Rendimiento de los Extractos

Se prepararon ocho distintos extractos de hoja y semilla de neem, cuatro de origen Mexicano y cuatro de origen de la India, en la Tabla 1 se muestra el rendimiento de los extractos etanólicos de ambos países.

Tabla 1: Rendimientos de los Extractos etanólicos de *A. indica* de origen México comparada con la de la India

Extracto	Rendimiento %	
	México	India
Semilla de neem	5.58	7.35
Cáscara de neem	3.91	4.23
Hoja de neem	7.13	12.15
Semilla con cáscara de neem	6.48	7.2

7.3 Identificación parcial de los compuestos en los extractos

Se realizaron pruebas coloridas para la determinación parcial de los grupos funcionales en los ocho extractos etanólicos de ambos países, en las pruebas fitoquímicas realizadas a lo extractos de *A. indica* se identificaron compuestos del metabolismo secundario, fenoles, terpenos, esteroides y alcaloides. Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 2. Los principales compuestos que han sido aislados del neem son triterpenos y tetranortriterpenoide como ejemplo de ellos es la azadiractina y limonoides entre otros. (López y Angulo, 2007).

Tabla 2: Identificación parcial de compuestos presentes en los extractos etanólicos de *A. indica* de origen México comparada con la de la India

	Grupo fitoquímico	Resultados	Cascara de neem		Semilla con cascara		Semilla de neem		Hoja de neem	
			Mx	Ind	Mx	Ind	Mx	Ind	Mx	Ind
Compuestos del metabolismo primario	Glúcidos		+	+	+	+	+	+	-	-
	Gomas y mucílagos		-	-	-	-	-	-	-	-
	Lípidos y ceras		+	+	+	+	+	+	+	+
Compuestos fenólicos	Cumarinas		-	-	-	-	-	-	-	-
	Flavonoides	Flavonas	+	+	+	+	+	+	-	-
		Flavonoles	-	-	-	-	-	-	-	-
		Flavononas	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antocianinas		+	+	+	+	+	+	-	-
	Leucoantocianos		+	+	+	+	+	+	-	-
	Antraquinonas		-	-	-	-	+	+	+	+
Taninos		-	-	-	-	-	-	-	-	
Terpenos y esteroides	Triterpenos		+	+	+	+	+	+	-	-
	Esteroles		-	-	-	-	-	-	+	+
	Saponinas		+	+	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Alcaloides	Drangendorff	+	+	+	+	+	+	+	+

Leyenda: (Mx) México, (Ind) India, (+) Positivo, (-) Negativo.

7.4 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de letalidad sobre *A. salina* para cada uno de los extractos de ambos países. Los extractos etanólicos que mostraron mayor actividad tóxica sobre *A. salina* fueron: extracto de semilla de neem origen de la India DL_{50} 476 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y extracto de semilla de neem origen México DL_{50} 624 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 3: Determinación de la DL_{50} con el bioensayo de letalidad de *A. salina* de los extractos de origen México comparada con los de la India

Extracto	DL_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	México	India
Semilla de neem	624	476
Cáscara de semilla de neem	>1000	>1000
Semilla con cáscara de neem	>1000	897
Hoja de neem	683	578

Interpretación: $DL_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$: Extracto no tóxico, $DL_{50} < 1000$ y $> 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ Extracto activo, $DL_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ Extracto tóxico, $DL_{50} < 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Extracto altamente tóxico (Lagarto P.A. *et al.*, 2001).

7.5 Determinación de citotoxicidad del extracto en líneas celulares

Las Concentraciones Inhibitorias Medias (IC_{50}) de los extractos de ambos países sobre la línea MCF-7 (Cáncer de mama) se muestran en la Tabla 4 siendo el extracto de hoja de neem de la India el que presentó mayor actividad con una IC_{50} 22.03 $\mu\text{g/mL}$, seguido por la semilla del mismo origen con una IC_{50} 50.17 $\mu\text{g/mL}$ y la hoja de neem mexicano con una IC_{50} 77.78 $\mu\text{g/mL}$, los resultados se obtuvieron al comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos a partir de las unidades de absorbancia, estableciendo las diferencias de respuesta para la viabilidad celular y obtener de esta forma la IC_{50}

Tabla 4: Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular MCF 7 (Cáncer de mama)

Extracto	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	
	México	India
Hoja neem	77.78	22.03
Semilla neem	106.74	50.17
Semilla con cáscara de neem	124.21	90.88
Cáscara de neem	127.28	85.43

En la tabla 5 se muestran las Concentraciones Inhibitorias Medias (IC_{50}) de los extractos de ambos países sobre línea HaCaT (Queratinocitos Humanos) siendo el extracto de hoja de neem de México el que presentó mayor actividad con una IC_{50} 135.76 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 5: Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular HaCat (Queratinocitos humanos)

Extracto	IC ₅₀ µg/mL	
	México	India
Hoja neem	135.76	155.23
Semilla neem	181.06	174.98
Semilla con cáscara de neem	260.20	239.87
Cáscara de neem	195.48	211.13

Las Concentraciones Inhibitorias Medias (IC₅₀) de los extractos de México y la India sobre línea CaLo (Cáncer cervicouterino) se encuentran en la Tabla 6 siendo el extracto de semilla de neem de la India el que presentó mayor actividad con una IC₅₀ 32.17 µg/mL, seguido por la hoja del mismo origen con una IC₅₀ 40.03 µg/mL y la semilla de neem de origen mexicano con una IC₅₀ 41.74 µg/mL y hoja del mismo origen con una IC₅₀ 57.68 µg/mL.

Tabla 6: Actividad citotóxica de los extractos etanólicos de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino)

Extracto	IC ₅₀ µg/mL	
	México	India
Hoja neem	57.68	40.03
Semilla neem	41.74	32.17
Semilla con cáscara de neem	84.21	70.88
Cáscara de neem	117.28	95.43

En base a los resultados obtenidos, los extractos crudos de hoja y semilla de neem originarias de la India y México fueron los que presentaron mayor bioactividad, por lo que se procedió a realizar la partición de los mismos con los solventes: hexano y cloroformo

7.6 Determinación de citotoxicidad de las particiones en líneas celulares

Los resultados de las particiones se muestran en las tablas 7, 8 y 9 los que mostraron mayor actividad son los siguientes: Partición hexánica de hoja de neem de la India, con una IC_{50} 25.17 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular MCF7 (Cáncer de mama), partición clorofórmica de hoja de neem de la India con una IC_{50} 98.09 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular HaCaT (Queratinocitos humanos) y partición clorofórmica de semilla de neem de la India con una IC_{50} 30.93 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino).

Tabla 7: Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular MCF7 (Cáncer de Mama)

Extracto	Partición	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	
		México	India
Hoja neem	Hexánica	50.05	25.17
	Clorofórmica	67.98	30.60
Semilla neem	Hexánica	81.04	44.53
	Clorofórmica	37.98	42.04

Tabla 8: Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular HaCat (Queratinocitos humanos)

Extracto	Partición	IC ₅₀ µg/mL	
		México	India
Hoja neem	Hexánica	115.65	105.09
	Clorofórmica	102.01	98.09
Semilla neem	Hexánica	151.60	133.81
	Clorofórmica	135.97	108.33

Tabla 9: Actividad citotóxica de las particiones hexánica y clorofórmica del extracto etanólico de *A. indica* de origen México e India sobre la Línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino)

Extracto	Partición	IC ₅₀ µg/mL)	
		México	India
Hoja neem	Hexánica	43.61	40.33
	Clorofórmica	39.00	51.02
Semilla neem	Hexánica	45.46	36.79
	Clorofórmica	43.19	30.93

DISCUSION

La etnobotánica se ha definido como el estudio de las interrelaciones entre el hombre primitivo y las plantas o “la totalidad de la gente con las plantas en una cultura y la interacción directa de la gente con esas plantas” (González-Chávez, 2008).

Desde hace décadas, el empleo de plantas medicinales y de los productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales debemos destacar en muchos casos el conocimiento preciso de la composición química y del hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, así como en la determinación fitoquímica.

La mayor actividad biológica del neem según estudios científicos se encuentra presente en las hojas y semillas, y produce efectos analgésicos, antihelmínticos antipiréticos, antisépticos, antisifilíticos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagógicos, emolientes y purgantes así mismo se ha demostrado que los extractos de neem poseen propiedades antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiviral (Firenzuoli *et al.*, 2007) y antiproliferativa contra la línea celular de cáncer PC-3 (Cáncer de Próstata) (Suresh K. *et al.*, 2005). En este trabajo se obtuvieron resultados relevantes con otras líneas celulares.

En el presente trabajo se realizaron pruebas de tamizaje fitoquímico para la determinación parcial de los grupos funcionales en los ocho extractos etanólicos de ambos países, en las pruebas fitoquímicas realizadas a los extractos de *A. indica* se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, terpenos,

esteroides y alcaloides, similares para ambas regiones geográficas. Los principales compuestos que han sido aislados del neem son triterpenos y tetranortriterpenoides como ejemplo de ellos es la azadiractina y limonoides entre otros. (López y Angulo, 2007) en este trabajo se confirmó la presencia de los mismos. Biswas (2002) en su estudio dice que los limonoides son responsables de la actividad biológica de las semillas de neem. Mehrotra *et al.* (2010) con las especies Amla y Neem encontraron al menos dos componentes activos de flavonoides, Harborne *et al.*, (2001), mencionan que el 40% de las plantas producen alcaloides, coincidiendo con ambos autores los resultados obtenidos en este trabajo. Jafari (2013) menciona que la mayoría de las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas anteriores sobre el neem, se han centrado en limonoides y otros triterpenoides como componentes activos. Sin embargo, los compuestos fenólicos en particular los glucósidos de flavonoles están presentes en esta planta en niveles altos y al parecer están involucrados de manera significativa en los efectos medicinales de esta planta.

Sin embargo Jianming 1999, concluye que los extractos obtenidos a partir de la cáscara de la semilla son inadecuados debido a la presencia de sustancias consideradas como fuente de interferencia, al igual que nuestros extractos de cáscara de semilla de neem en los cuales los resultados mostraron poca actividad biológica.

Eloff (1998) y Cowan (1999), recomiendan la extracción con metanol, sin embargo el proceso de extracción etanólica utilizado en el presente estudio mostró buenos resultados.

Srivastava (2012) demuestra que el aceite de neem contiene la mayoría de limonoides incluyendo azadiractina, por primera vez demuestra que el aceite contiene más del 50 % de limonoides totales de neem, por lo tanto los limonoides de neem podrían ser posibles agentes contra el cáncer

Kikuchi (2011) en su estudio demuestra a partir de extractos de semillas de *Azadirachta indica*, una potente actividad citotóxica contra las células de leucemia HL60 así mismo sus extractos exhibieron citotoxicidad débil contra una línea celular de linfocitos normal al igual que en el presente trabajo donde la actividad fue menor con las células HaCaT (queratinocitos humanos) y la mayor actividad se presentó sobre la línea celular MCF-7 (cáncer de mama).

Gunadharini (2011) en su estudio demuestra que el extracto etanólico de neem induce la apoptosis e inhibe la proliferación celular a través de la inhibición de vía PI3K/Akt tanto en las células PC - 3 y LNCaP ambas líneas de cáncer de próstata, resultados que concuerdan con esta investigación.

Con respecto al Ensayo de Letalidad sobre *A. salina* es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con potencial biológico, debido a que se ha demostrado que el crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica. (Meyer *et al.*, 1982). Dado que el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad biológica de los extractos de las plantas, incluida la toxicidad, se determinó la DL₅₀ con el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, ensayo considerado de tamizaje para sistemas biológicos (Lagarto-Parra, 2001; Bastos, 2009) el cual es un método sencillo y económico en extractos crudos (Meyer *et al.*, 1982) asegurando con

ello su efectividad y toxicidad. En este trabajo se encontró que el extracto etanólico de semilla de neem el que presentó mayor actividad con una DL_{50} de 476 $\mu\text{g/mL}$, este resultado indica que el extracto tiende a ser tóxico, según la escala de Déciga (2010)

Carballo *et al.*, (2002) demostraron la correlación establecida previamente entre el ensayo de letalidad y la citotoxicidad, en su reporte recomendaron que se realicen ambos ensayos simultáneamente lo cual se realizó en este estudio, en concordancia con estudios previos, todos los extractos se sometieron a pruebas de citotoxicidad con la tres líneas celulares

En la actualidad se han utilizado las líneas celulares en la búsqueda de extractos vegetales para determinar citotoxicidad y asociarla con la actividad antineoplásica. (Sagar SM, *et al.*, 2006)

Suresh K. *et al.*, (2005) también trabajaron con extractos etanólicos de hoja de neem, al igual que en este trabajo demostraron su actividad antiproliferativa, pero contra la línea celular cancerígena PC-3 (Cáncer de Próstata).

Considerando que un extracto crudo que presenta una IC_{50} con un valor superior de 30 $\mu\text{g/mL}$ se postula que este extracto debería ser sometido a fraccionamiento biodirigido hasta aislar los compuestos por su probable actividad antitumoral (Kalaivani, 2011; Chetan, 2010) los resultados obtenidos concuerdan con los establecido Kalaivani, 2011, por lo que los extractos de semilla de neem y hoja de neem se llevaron a partición con dos solventes Hexano y Cloroformo para evaluar nuevamente su actividad citotóxica.

Los resultados del tamizaje fitoquímico nos muestran una similitud en la composición química, mas sin embargo la actividad biológica fue diferente, probablemente debido a la concentración de dichos metabolitos, quizá debido al origen geográfico, que ocasiona que los hábitats presenten condiciones ambientales muy diferentes lo que repercute en el metabolismo de la planta.

CONCLUSIONES

- El extracto de hoja de neem originario de la India fue el que produjo mayor rendimiento 12.15%.
- Se identificaron en los extractos de neem de ambos países los siguientes metabolitos secundarios: fenoles, terpenos, esteroides y alcaloides.
- Los extractos de semilla de neem de la India mostraron mayor actividad sobre *A. salina* con una DL_{50} 476 $\mu\text{g/mL}$ y la de México con una DL_{50} 624 $\mu\text{g/mL}$.
- Las actividad citotóxica de los extractos crudos sobre las líneas celulares fue: Hoja de neem de la India IC_{50} 22.03 $\mu\text{g/mL}$ sobre línea celular MCF7 (Cáncer de mama), Hoja de neem de México IC_{50} 135.76 $\mu\text{g/mL}$ sobre línea celular HaCat (Queratinocitos humanos) y Semilla de neem de la India IC_{50} 32.17 $\mu\text{g/mL}$ sobre línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino).
- La actividad citotóxica de las particiones fue más relevante que la de los extractos crudos, la hexánica de hoja de neem de la India con una IC_{50} 25.17 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular MCF7 (Cáncer de mama), la clorofórmica de hoja de neem de la India con una IC_{50} 98.09 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular HaCaT (Queratinocitos humanos) y la clorofórmica de semilla de neem de la India con una IC_{50} 30.93 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular CaLo (Cáncer cervicouterino).

En este estudio se demostró que los extractos etanólicos de *A. indica* originarios de la India mostraron mayor actividad tóxica y citotóxica que los extractos de origen México, la citotoxicidad sobre las líneas celulares empleadas con el neem no habían sido anteriormente reportada; estos resultados nos permiten considerar a esta especie como un potencial coadyuvante en el tratamiento de esta enfermedad.

LITERATURA CITADA

1. Ali Tahir, H.M. 1991. "Estudios sobre *Lavanda multifida* L." Tesis Doctoral. Inéd. Facultad de farmacio, Universidad de Granada.
2. Alireza, A, Rastegar-Pouyani, N y P De Los Ríos-Escalante. 2010. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(3): 501-506.
3. Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. Phytochem Analysis. 1991; 2:107-11
4. Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, Van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. Br J. Radiol. 2005; 78 (934): 945-947
5. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco DL. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Revista de Toxicología. 2003; 40-52.
6. Atta-ur- Rahman, Muhammad Iqbal Choudhary, William J. Thomsen 2001. Bioassay Techniques for Drug Development Antiviral and Anticancer Assays Harwood Academic Publishers, Pp 223.
7. Balandrin M, Kinghorn AD. Plant-derived natural products in drug discovery and development. American Chemical Society. 1993; 3-10.
8. Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR. 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. Human Medicinal Agents form Plants. (A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin, eds.) ACS Symposium Series 534; American Chemical Society: Washington, D.C., Pp 2-12.

9. Barquero A.A. 2007. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Revista Química Viva 2: 1-35.
10. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2009; 8(16): 1-6
11. Bermúdez A., Oliveira-Miranda M.A., 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal. Interciencia. Caracas, Venezuela, Pp 453-459.
12. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial a Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. Cytometry. 2002; 47 (4): 236-242.
13. Bhagat M, Saxena AK. 2010. Evaluation of *Cassia occidentalis* for in vitro cytotoxicity against human cancer cell lines and antibacterial activity. Indian J Pharmacol. Aug;42(4):234-7
14. Bilia A, Riva A. Herbal Medicinal Products. Fitoterapia 2000; 71: 343-345.
15. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Curr Sci. 2002; 82: 1336-45.
16. Bruneton J, 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia, S.A. Royo, 23 – 50006 Zaragoza, España. Pp. 322
17. Cannel, Richard J. P., 1998. Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol. 4. 1-285.

18. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2002; 23;2:17.
19. Chetan A, Rajesh P, Sanjay D, Jitesh J. In vitro citotoxicity study of *Agave americana*, *Strychnos nuxvomica* and *Areca catechu* extracts using MCF-7 Cell line. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010; 1(12): 245-252
20. Conrick, J 1994. *Neem. The ultimate herb.* Hopeful Communications. Alchua, Florida, U.S.A. Pp 60.
21. Coventry E, Allan EJ. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica.* 2001; 29: 1-10
22. Cowan MM. Plant products as an antimicrobial agent. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 564-82.
23. Dahanukar S.A., Kulkarni R.A. and Rege N.N. 2000. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian Journal of Pharmacology.* 32; 81-118.
24. Déciga M, Rivero I, Arriaga M, Castañeda G, Angeles G, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007; 110 (2): 334-342.
25. Domingo D. López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista especializada Quimioterapia. S.E.D. Quimioterapia. Madrid, Hospital Universitario de la Princesa: Pp 385-393.*
26. Domínguez, X. 1988. *Métodos de Investigación Fitoquímica.* México, Limusa. Pp: 125
27. Drummond AJ, Waigh RD. The development of microbiological methods for phytochemical screening. *Recent research developments. Phytochemistry* 2000;

4: 143-152.

28. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol.* 1998; 60: 1-8.
29. Elvin-Lewis M. Should we be concerned about herbal remedies? *J Ethnopharmacol* 2001; 75: 141-164.
30. EPA 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Firth edition: País. Editorial. Pp 275.
31. Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. Estudio comparativo de los métodos de rezasurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae* 2010; 17(1): 67-74.
32. Etkin NL. Indigenous patterns of conserving biodiversity: pharmacologic implications. *Ethnopharmacology* 1998; 63(3): 233-245.
33. Ferrán, Aranaz M., 2001. SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España. 255-264.
34. Firenzuoli F., Gori L. 2007. Flavonoid composition of citrus juices molecules. Massina, Italia. Dipartimento di chimica orgánica e biología, Università di Messina, Salita Sperone. Pp 1641-1673.
35. Ford, R 1978. Introduction. En Ford R (Ed.) The nature and the status of ethnobotany. *Anthropological Papers* No 67. University of Michigan. Ann Arbor, MI, EU. Pp. 29-32.
36. Freshney RI. 2000. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique. Ed. Wiley-Liss: Nueva York, pp. 101,182, 309.
37. Galisteo Moya, M. M. 1997. "*Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Marie: Estudio farmacognóstico". Tesis Doctoral Inéd. Facultad de farmacia, Universidad de Granada.

38. García L, Verde J, Castro R, Chávez A, Oranday A, Núñez A, Rivas C. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010; 4(41): 28-36.
39. Gómez-Veloz A 2002. Plant use knowledge of the Winikina Warao: The case for questionnaires in ethnobotany. *Econ. Bot.* 56: 231-242
40. González-Chávez L. 2008. Investigación participativa en etnobotánica. Algunos procedimientos coadyuvantes en ella. *Magazine*, [Online]. Disponible en : <http://www.dimensionantropologica.inah.gob.mx/index.php?sIdArt=346&cVol=8&n..>
41. Guilhermino L, Diamantino T, Silva MC y Soares AM. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:357-362.
42. Gunadharini DN, Elumalai P, Arunkumar R, Senthilkumar K, Arunakaran J. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *J Ethnopharmacol*. 2011 Apr 12;134(3):644-50. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.015. Epub 2011 Jan 28
43. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology In Vitro*. 2004; 8(5):703-710
44. Harborne JB, Baxter H, Moss GP. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2nd Edition, Editorial Taylor and Francis, 2001.
45. Harborne JB. *Phytochemical Methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 3a Ed. Chapman & Hall, London. 1998, p. 1-32
46. Harvey A. 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacology Science* 20: 196-198.

47. Hostettmann K., Wolfender J. 1997. "Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts" *Plant Med* 63: 2-10.
48. Jafari S, Saeidnia S, Hajimehdipoor H, Ardekani MR, Faramarzi MA, Hadjiakhoondi A, Khanavi Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with, *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. *M.Daru*. 2013 May 16; 21(1):37. Epub 2013 May 16
49. Jianming D, Varoujan AY, Raghavan VGS, Jocelyn RP. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin- related limonoids in neem seed kernel. *J Agric Food Chem*. 1999; 47: 3738-42.
50. Kakuko Y, Fumiko A, Ariaki N, Hikaru O, Lozada L, López E, Estrada E, Aguilar A, Reyes R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 97(2): 293–299
51. Kalaivani T, Rajasekaran C, Suthindhiran K, Lazar M. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 2011: pp3-11
52. Kazuko A, M, Encarnación D, R y A R Cortés A. 2005. Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 36(1): 11-17.
53. Khillare B., Shrivastav T.G. 2003. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. *Elsevier Inc*. 68: 225–229.
54. Kikuchi T, Ishii K, Noto T, Takahashi A, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem). *J Nat Prod*. 2011 Apr 25;74(4):866-70. doi: 10.1021/np100783k. Epub 2011 Mar 7.
55. Kuklinski C. 2000. *Farmacognosia*. España, ediciones Omega. Pp 3,4,51,53.

56. Kumar S, Shukla Y. Herbal medicine: Current Status and the Future. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2003; 4: 281-288.
57. Lagarto, P. A.; Silva, Y. R.; Guerra, S. I.; Iglesias, B. L.. 2001. "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts" *Phytomedicine* 8 (5): 395-400.
58. Leos-Martinez, J y R. Salazar-Saenz 1992. El arbol de neem (*A. indica*) en México FA-UANL. Folleto Técnico No 03 30 p
59. Lieberman M.M., Patterson G.M., Moore R.E., In vitro bioassays for anticancer drug screening: Effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters*, **173**, 21 (2001)
60. López P.Y., Angulo E.M., Martínez R.C., Soto B.J., Chaidez Q.C. 2007. "Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22" *Bioquímica* 32 (4): 117-125.
61. Martín G 2001. *Etnobotánica: Manual de métodos*. Nordan-Comunidad. Montevideo, Uruguay. Pp. 240.
62. McLaughlin J, Lingling L, Rogers M. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inform J*. 1998; 32: 513-524.
63. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. 1988. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.
64. Mehrotra S, Srivastava AK, Nandi SP. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(22): 2393-2398.

65. Mercado-Hernández, R. y Santoyo-Stephano, M., 1998. Apuntes de Estadística II. Capítulo III-VI. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
66. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
67. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(10): 4769-807.
68. Molina-Salinas GM, Said-Fernández S Modified microplate cytotoxicity assay whit brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline.* 2006; 3: 633-638.
69. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55-63.
70. National Academy of Science. Washington, DC: NAS; 1992. *Neem, a tree for solving global problems*[R]
71. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Disk diffusion supplemental tables M100-S10 (M2).* Wayne, Pennsylvania. 2001.
72. Navarro VM, Rojas G, Zepeda LG, Avilés M, Fuentes M, Herrera A, Jiménez E. 2006. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology* 44(4): 297-300.
73. Nostro A, Germano MP, D' Angelo V, Marino A, Canatelli MA. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30: 379-384.
74. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.

Eur J Biochem. 2000; 267 (17): 5421-5426.

75. OMS, 2002 Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005 WHO/EDM/TRM/2002. Geneva, World Health Organization.
76. OMS. 2003. “Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales”. Ginebra.
77. Prieto, S.O., F.A. Aristizabal. 2009. Perfil de sensibilidad de Hep-G2 como modelo para evaluación de actividad citotóxica de xenobióticos bioactivados vía CYP450. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 16 (2), 219-227
78. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicol In Vitro. 2002; 16 (5): 599-607.
79. Reed JC, Pellicchia M. Apoptosis based therapies for hematologic malignancies. Blood 2005; 106(2): 408
80. Rodríguez R, Morales ME, Verde MJ, Oranday A, Rivas C, Núñez MA, González GM, Treviño J. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010; 57-58.
81. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res. 2006; 99 (2): 103-107.
82. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer- Part 1 and 2. Current Oncology. 2006; 13 (1), 14-26.
83. Saxena S, Gomber C. 2006. Antimicrobial potential of *Callistemon rigidus*. Pharmaceutical Biology 44(3): 194-201.

84. Scherer, William F.; Jerome T. Syverton, George O. Gey (20). «Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses: iv. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells derived from an epidermoid carcinoma of the cervix». *The Journal of Experimental Medicine* **97** (5): pp. 695–715.
85. Schoop, Veronika M.; Mirancea, Nicolae, Fusenig, Norbert E. 1999. "Organización epidérmico y diferenciación de queratinocitos HaCaT en Organotípicos Coculture con fibroblastos dérmicos humanos" *Journal of Investigative Dermatology* **112** (3):. 343-353.
86. Soule, HD; Vázquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). "Una línea celular humana de un derrame pleural derivada de un carcinoma de mama." *Diario del Instituto Nacional del Cáncer* **51**(5):. 1409-1416
87. Suresh Kumar, PK Suresh, M.R. Vijayababu, A. Arunkumar, J. Arunakaran. Anticancer effects of ethanolic Neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). *Journal of Ethnopharmacology* 105 (2006) 246-250
88. Tripathi, K.D. 2003. *Essentials of Medical Pharmacology*, 5a. ed. Jaypee, Brothers Medical Publishers, India.
89. Umeh EU, Oluma H, Igoli J. Antibacterial Screening of Four Local Plants Using An Indicator-Based Microdilution Technique. *Afr. J. Traditional Complementary and Alternative Medicines* 2005. 2 (3): 238–243
90. Valencia C. O. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Editorial Trillas. México. D. F. 11- 31.
91. Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González A, Rivera-Guillen MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum fruscenscens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44(2):24-30

92. Vickers A, Zollman C. ABC of complementary medicine: herbal medicine. *BMJ*. 1999 Oct 16;319(7216):1050-3.
93. Vidal J, Carbajal A, Sisniegas M, Bobadilla M. Toxic activity of *Argemone subfusiformis* Ownb. and *Tagetes patula* Link against *Aedes aegypti* L. Fourth instar larvae and pupae. *Rev. Peru Biol.* 2009; 15(2): 103-109
94. Williamson EM, Okpako DT. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. England, Wiley and Sons. Pp: 503
95. Williamson EM, Okpako DT. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. England, Wiley and Sons. 1996
96. Wren RC. 1994. Nueva Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos. Editorial Grijalbo. España . Pp 196

CONSULTA ELECTRONICA

97. INC, 2010. Instituto Nacional del Cáncer. Diccionario Digital. [INTERNET]: Disponible en: <http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=44016> , Consultada el 5 de Septiembre del 2010.
98. ONU, 2012. United Nations Environment Programme Neem: The UN's tree of the 21st Century. Nairobi: United Nations Environment Programme; 2012. [Online] Available from: <http://www.unep.org/wed/tree-a-day/neem.asp>. [Accessed on 10 September, 2012]

ANEXOS

rmcf@afmac.org.mx

4 de marzo de 2014 11:12 p. m.

Para: rmcf@afmac.org.mx

Trabajo científico para publicación



CARTA CONSENTIMI...
.pdf 284 kB

[Descargar](#)



ARTICULO JOAQUIN...
.docx 23.7 kB

[Descargar](#)



ARTICULO JOAQUIN...
.doc 173 kB

[Descargar](#)

Comité Editorial Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas P R E S E N T E.-

Por este conducto y de la manera más respetuosa me permito saludarles y adjuntarles archivos referentes a artículo científico denominado "**Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares**", con el objetivo de ser evaluado para la publicación en la "Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas".

Sin más por el momento y esperando contar con su respuesta, queda de Usted:

MBC Joaquín Avalos Soto
Autor responsable



QFB Joaquín Avalos Soto (qfbjoaquin@hotmail.com)

Correo Institucional (qfbjoaquin@ujed.mx)

OAK-TREE SAFETY		OAK-TREE SAFETY	
 SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES			
SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL DIRECCIÓN GENERAL DE GESTIÓN FORESTAL Y DE SUELOS			
CERTIFICADO FITOSANITARIO DE IMPORTACIÓN			
ANT. No. 09/A7-0374/02/12		FOLIO No. 09/2012-01773	
VALIDO HASTA:		08 DE OCTUBRE DE 2012	
Con fundamento en lo dispuesto en los Artículos 1°, 2°, 7°, 19, 23, 24 y 28° de la Ley Federal de Sanidad Vegetal, 16 fracción XXVI y 120 párrafo 1° y 2° de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable, 133 y 134 del Reglamento de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable, 32 fracciones I, XII y XIII del Reglamento Interior de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales y el Manual de procedimientos para la Expedición del Certificado Fitosanitario de Importación, se expide el presente Certificado para los productos forestales descritos a continuación.			
<input checked="" type="checkbox"/> Definitiva <input type="checkbox"/> Temporal De los productos o subproductos forestales <input type="checkbox"/> Maderables <input checked="" type="checkbox"/> No Maderables			
Nombre o Razón Social: JOAQUIN AVALOS SOTO			
Reg. Fed. de Caus.: AASJ8306262Y0			
Domicilio: SAN KARIM 160, COL. SAN ANTONIO			
C.P.: 35015		Teléfono: 871 137 02 15	
Localidad: GOMEZ PALACIO		Estado: DURANGO	
Descripción del producto a importar: SEMILLAS FORESTALES NEEM, <i>Azadirachta indica</i>		Cantidad: 6 (SEIS)	
Fracción arancelaria: 1209.99.99		Unidad de medida: Kilogramos	
Aduana de entrada: MONTERREY, AEROPUERTO, NL		Destino dentro del país: GOMEZ PALACIOS, DURANGO	
País de origen: INDIA (REPÚBLICA DE LA)		País de procedencia: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
Aduana de salida (solo para importaciones temporales):		Destino fuera de México:	
REQUISITOS FITOSANITARIOS: INSPECCION OCULAR RIGUROSA EN LA ADUANA DE ENTRADA TOMA DE MUESTRAS (SOLO EN CASO DE DETECTAR LA PRESENCIA DE PLAGAS Y ENFERMEDADES) CERTIFICADO FITOSANITARIO INTERNACIONAL QUE INDIQUE QUE EL PRODUCTO VIENE LIBRE DE PLAGAS Y ENFERMEDADES LA SEMILLA NO SERÁ UTILIZADA PARA SIEMBRA, SERÁ UTILIZADA PARA INVESTIGACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUIMICO. EL PRODUCTO DEBE VENIR LIBRE DE PLAGAS Y ENFERMEDADES. EN CASO DE DETECTAR PLAGAS Y ENFERMEDADES, DEBERÁ TOMARSE UNA MUESTRA Y ENVIARSE AL LABORATORIO DE ANÁLISIS Y REFERENCIA EN SANIDAD FORESTAL DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE GESTIÓN FORESTAL Y DE SUELOS PARA SU DIAGNÓSTICO Y DICTAMEN TÉCNICO CORRESPONDIENTE. EL ENVÍO DE MUESTRA DEBERÁ REALIZARSE EN UN PERIODO NO MAYOR DE 24 HORAS DESPUÉS DE SU DETECCIÓN PARA EVITAR LA DISPERSIÓN DE PLAGAS.			
AUTORIZACIÓN			
FIRMA:			
NOMBRE: ING. GUSTAVO GONZÁLEZ VILLALOBOS			
PUESTO: DIRECTOR DE SALUD FORESTAL Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS			
EL SUSCRITO ING. GUSTAVO GONZÁLEZ VILLALOBOS, FIRMA EN SUPLENCIA POR AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL DE GESTIÓN FORESTAL Y DE SUELOS, C. DR. FRANCISCO GARCÍA GARCÍA CON FUNDAMENTO EN EL ARTÍCULO 154 DEL REGLAMENTO INTERIOR DE LA SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES, PUBLICADO EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 21 DE ENERO DE 2003.			
En la jefatura de Verificación Sanitaria Forestal en _____ y teniendo a la vista los productos arriba descritos. Se constata que se encuentran libres de plagas y enfermedades y han cumplido con los requisitos fitosanitarios aquí descritos. Se supervisó la adecuada aplicación de tratamiento profiláctico consignado como requisito para su importación.			
Producto aplicado	Dosis	Tiempo de exposición	Concesionario o empresa
NOMBRE Y FIRMA DEL VERIFICADOR:			FECHA DE EXPEDICIÓN:
			11 DE ABRIL DE 2012
ESTE DOCUMENTO NO TENDRÁ VALIDEZ SIN LA FIRMA Y SELLO DEL PERSONAL DE VERIFICACIÓN SANITARIA DE LA PROFEPA			



Comisión Federal para la Protección
contra Riesgos Sanitarios

**ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE SALUD
COMISION FEDERAL PARA LA PROTECCION
CONTRA RIESGOS SANITARIOS
COMISION DE AUTORIZACION SANITARIA**



**SALUD
DEACIP**

Monterrey No.33, Col. Roma, Del. Cuauhtémoc, CP. 06700, México D.F

PERMISO SANITARIO DE IMPORTACION		Fecha de Expedición :30 de abril de 2012		
Número de Autorización: 123301109A0907		Vigencia Desde: 30/04/2012 Hasta: 27/10/2012		
Con fundamento en el Artículo 39 fracciones XIII y XV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, en los Artículos 194 y 283 de la Ley General de Salud, Artículo 14 del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y sin interferir con las disposiciones de otras Dependencias Oficiales, se autoriza la Importación Definitiva.				
IMPORTADOR :AVALOS SOTO JOAQUIN, AV.ARTICULO 123 S/N, FRACC.FILADELFIA, GOMEZ PALACIO, C.P. , DURANGO R.F.C: AASJ8306262Y0				
Fabricantes- GENIUS NATURE HERB OFFICER S COLONY 195 PERUP PACHAPALAYAM TAMIL NADU COIMBATORE 641 010 INDIA Proveedores- MR. ESWAR IYAPPANOFFICER S COLONY 195 PERUR PACHAPALAYAM TAMIL NADU COIMBATORE 641 010 INDIA				
ADUANA:AEROPUERTO INTERNACIONAL GENERAL MARIANO ESCOBEDO, APODACA, NUEVO LEON		ORIGEN: IND		
Materia prima a Importar:		PROCEDENCIA: USA		
NOMBRE	CANTIDAD	UNIDAD	FRACCION	CANT UMT
GENIUS NATURE HERB (AZARIDACTHTA INDICA A. JUSS (NEEM)). *****	6 *****	Kilogramos *****	12119099 *****	6/KILO *****
PARA ELABORACION DE:				
Nombre	Form. Farm.	Presentación	Reg. San.	
<p>Restricciones: EN CASO DE RECONOCIMIENTO ADUANAL DEBERA PRESENTAR EN ORIGINAL ESTA AUTORIZACION. SE PROHIBE SU COMERCIALIZACION PARA USO EN PROYECTO DE INVESTIGACION DENOMINADO "ACTIVIDAD CITOTOXICA Y ESTUDIO FITOQUIMICO DE LOS EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE NEM (AZADIRACTHTA INDICA A. JUSS) DE ORIGEN REGIONAL (ÉBAO, SLP) COMPARADA CON LA COMERCIALIZADA EN LA INDIA" A REALIZARSE EN LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO.</p> <p>Observaciones: PARA PRUEBAS DE LABORATORIO.NO REQUIERE REGISTRO SANITARIO.</p>				
<p>ATENTAMENTE</p>  <p>Q.A. MARIBEL BERNAL SALDIVAR DIRECTORA EJECUTIVA DE AUTORIZACIONES DE COMERCIO INTERNACIONAL Y PUBLICIDAD</p> <p>En ejercicio de la facultad delegada por artículo sexto fracción I, del Acuerdo por el que se delegan las facultades que se señalan, en los órganos administrativos que en el mismo se indican, publicado con fecha 7 de Abril de 2010 en el DOF.</p>				

MIGE

ESTE DOCUMENTO ES DE CARACTER INDIVIDUAL E INTRANSFERIBLE, NO SERA VALIDO SI PRESENTA BORRADURAS O ENMENDATURAS DE NO SER UTILIZADO ESTE PERMISO DEBE REGRESARSE A ESTA AUTORIDAD PARA SU CANCELACION



COE 0070509