



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN

CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE CHAYOTE [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] CON FINES TERAPÉUTICOS

M. en C. SANDRA SALAZAR AGUILAR

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Microencapsulación de extractos de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] con fines terapéuticos** realizada por la alumna: **Sandra Salazar Aguilar** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS

ASESOR



DR. JORGE CADENA INIGUEZ

ASESOR



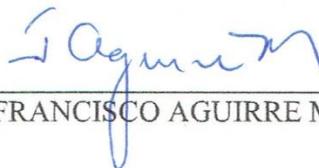
DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR



DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

ASESOR



DR. JUAN FRANCISCO AGUIRRE MEDINA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2016

RESUMEN

MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE CHAYOTE [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] CON FINES TERAPÉUTICOS

Sandra Salazar Aguilar, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

La microencapsulación es una técnica que se ha implementado, entre otras cosas, para evitar que compuestos con actividad biológica sufran oxidación y que sean más estables. Estudios realizados con extractos de los frutos de diferentes grupos varietales de chayote (*Sechium edule*), mostraron actividad antiproliferativa y citotóxica sobre diferentes líneas celulares cancerígenas, por lo tanto, la mejora genética de estos genotipos es relevante para ser usados como fuente de principios activos para la medicina complementaria. Bajo esta perspectiva el cultivar de *Sechium edule*, Perla Negra, es un material biológico recientemente obtenido. Por lo que el presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar la actividad biológica del extracto en metanol, fracciones del mismo y las microesferas cargadas con el extracto del fruto del cultivar Perla Negra, sobre la línea celular cancerígena HeLa. Los resultados mostraron que el extracto tiene una actividad antiproliferativa con un IC_{50} de $1.85 \mu\text{g mL}^{-1}$, sin afectar las células normales. Algunas fracciones y la mezcla de todas ellas (pool) inhibieron más del 80% de la proliferación con una concentración de $2.11 \mu\text{g/mL}$. Mediante CCF y HPLC, se determinó que el extracto contiene terpenos como: Cucurbitacinas B, D, E e I y flavonoides como Rutina, Florizidina, Mirecetina, Quercetina, Naringenina, Floretina, Apigenina y Galangina. Con respecto a la microencapsulación, mediante el método de coacervación y con sonicación se obtuvieron microesferas. Las pruebas de liberación indicaron que la mayor concentración liberada fue de $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las 24h. Las microesferas tuvieron un efecto antiproliferativo sobre Hela, con un

IC₅₀ estadístico de 8 µg mL⁻¹, sin afectar a las células normales. Se concluye que Perla Negra tuvo un efecto antiproliferativo 632 veces mayor que su progenitor *amarus silvestrys* (IC₅₀1170 µg mL⁻¹); las fracciones y el pool mostraron un efecto aun mayor que el extracto completo. Las microesferas también inhibieron la proliferación de HeLa. Por lo tanto, el efecto biológico mostrado por el extracto de Perla Negra sugiere su uso como agente anticancerígeno potencial.

Palabras clave: Actividad antiproliferativa, actividad biológica, extracto en metanol, microesferas de Perla Negra, caracterización fitoquímica

ABSTRACT
MICROENCAPTULATION OF EXTRACTS OF CHAYOTE [*Sechium edule*
(Jacq.) Swartz] THERAPEUTIC PURPOSES

Sandra Salazar Aguilar, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2016

Microencapsulation is a technique that has been implemented, inter alia, to prevent biologically active compounds suffer oxidation and are more stable. Studies with extracts of fruits of different varieties groups chayote (*Sechium edule*) showed antiproliferative and cytotoxic activity on various cancer cell lines, therefore, the genetic improvement of these genotypes is relevant for use as a source of active ingredients for complementary medicine. In this perspective, cultivar *S. edule*, Perla Negra, is a biological material obtained recently. So the present study was conducted in order to evaluate the biological activity of methanol extract, fractions thereof and microspheres loaded with cultivate fruit extract Perla Negra on the cancer cell line HeLa. The results showed that the extract has antiproliferative activity with an IC_{50} of $1.85 \mu\text{g mL}^{-1}$, without affecting normal cells. Some fractions and the mixture of these (pool) inhibited more than 80% proliferation at a concentration of $2.11 \mu\text{g mL}^{-1}$. By TLC and HPLC, it was determined that the extract contains terpenes such as: Cucurbitacins B, D, E and I and flavonoids as Routin, Florizidin, Mirecetin, Quercetin, Naringenin, Floretin, Apigenin and Galangin. Regarding the microencapsulation, coacervation method by sonication and microspheres were obtained. Release tests indicated that the highest concentration released was $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ to 24h. The microspheres had an antiproliferative effect on Hela with a statistical IC_{50} $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, without affecting normal cells. So it is concluded that Perla Negra had a biological effect 632 times greater than its parent *amarus silvestryis* (IC_{50} $1170 \mu\text{g mL}^{-1}$); they pool the fractions and showed

an even greater effect the complete extract and the microspheres also inhibited proliferation HeLa. Therefore, the biological effect shown by Perla Negra extract suggests their use as potential anticancer agent.

Key words: Antiproliferative activity, biological activity, methanol extract, microspheres Perla Negra, phytochemical characterization

Los enemigos de un hombre de conocimiento

“Cuando un hombre empieza a aprender, nunca sabe lo que va a encontrar. Su propósito es deficiente; su intención es vaga. Espera recompensas que nunca llegarán, pues no sabe nada de los trabajos que cuesta aprender. Y sus pensamientos se dan de topetazos y se hunden en la nada. Lo que se aprende no es nunca lo que uno creía. Cada paso del aprendizaje es un atolladero y su propósito se convierte en un campo de batalla”.

“Así ha tropezado con el primero de sus enemigos naturales **¡EL MIEDO!** Un enemigo terrible: traicionero y enredado como los cardos. Se queda oculto en cada recodo del camino, acechando, esperando. Y si el hombre, aterrado en su presencia, echa a correr, su enemigo habrá puesto fin a su búsqueda. Por lo tanto debe desafiar a su miedo, y pese a él debe dar el siguiente paso en su aprendizaje, y el siguiente, y el siguiente. Debe estar lleno de miedo, pero no debe detenerse. ¡Esa es la regla! Y llega un momento en que su primer enemigo se retira. El hombre empieza a sentirse seguro de sí. Su propósito se fortalece. Aprender no es ya una tarea aterradora. Cuando llega ese momento gozoso, el hombre puede decir sin duda que ha vencido a su primer enemigo natural”.

“Una vez que un hombre ha conquistado el miedo, está libre de él por el resto de su vida. Y así ha encontrado a su segundo enemigo: **¡LA CLARIDAD!** Esa claridad de mente, tan difícil de obtener, dispersa el miedo, pero también ciega. Fuerza al hombre a no dudar nunca de sí. Le da la seguridad de que puede hacer cuanto se le antoje, porque todo lo que ve lo ve con claridad. Y tiene valor por que tiene claridad, y no se detiene en nada porque tiene claridad. Pero todo eso es un error; es como si viera algo claro pero incompleto. Si el hombre se rinde a esa ilusión de poder, ha sucumbido a su segundo enemigo y será torpe para aprender. Se apurará cuando debía ser paciente, o será paciente cuando debería apresurarse. Y tonteará con el aprendizaje, hasta que termine incapaz de aprender nada más”.

“Por lo tanto debe hacer lo que hizo con el miedo: debe pensar, sobre todo, que su claridad es casi un error. Y vendrá un momento en que comprenda que su claridad era solo un punto delante de sus ojos. Este será el verdadero poder. Sabrá entonces que el poder tanto tiempo perseguido es suyo por fin. Puede hacer con él lo que se le antoje. Su aliado está a sus órdenes. Su deseo es la

regla. Ve claro y parejo todo cuanto hay alrededor. Pero también ha tropezado con su tercer enemigo... **¡EL PODER!**”

“El poder es el más fuerte de todos los enemigos. Y naturalmente, lo más fácil es rendirse; después de todo, el hombre es de veras invencible. Él manda, empieza tomando riesgos calculados y termina haciendo reglas, porque es el amo del poder. Un hombre en esta etapa apenas advierte que su tercer enemigo se cierne sobre él. Y de pronto, sin saber, habrá sin duda perdido la batalla. Su enemigo lo habrá transformado en un hombre cruel, caprichoso. Por lo tanto tiene que desafiar a su tercer enemigo, con toda intención. Tiene que llegar a darse cuenta de que el poder que aparentemente ha conquistado no es nunca suyo en verdad. Debe tenerse a raya a todas horas, manejando con el tiempo y con fe todo lo que ha aprendido. Si puede ver que, sin control sobre sí mismo, la claridad y el poder son peores que los errores, sabrá cómo y cuándo usar su poder. Y así habrá vencido a su tercer enemigo”.

“El hombre estará, para entonces, al fin de su travesía por el camino del conocimiento, y casi sin advertencia tropezará con su último enemigo... **¡LA VEJEZ!** Este enemigo es el más cruel de todos, el único al que no se puede vencer por completo; el enemigo al que solamente podrá ahuyentarse por un instante. Este es el tiempo en que un hombre ya no tiene miedos, ya no tiene claridad impaciente; un tiempo en que todo su poder está bajo control, pero también el tiempo en el que siente un deseo constante de descansar. Si se rinde por entero a su deseo de acostarse y olvidar, su enemigo lo reducirá a una débil criatura vieja. Su deseo de retirarse vencerá toda su claridad, su poder y su conocimiento. Pero si el hombre se sacude el cansancio y vive su destino hasta el final, puede entonces ser llamado hombre de conocimiento, aunque sea tan solo por esos momentitos en que logra ahuyentar al último enemigo, el enemigo invencible y entonces esos momentos de claridad, poder y conocimiento son suficientes”.

Fragmento del libro “Las enseñanzas de don Juan”

Carlos Castañeda

DEDICATORIA

A mi Familia; mi Madre Taide Aguilar, mis hermanos Genaro, Fernando, María Luisa y Lourdes y mis sobrinos Ricardo, Armando, Noemí, María Fernanda, Sebastián y Alejandro, por ser el motor que me ha impulsado a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por permitirme llegar hasta aquí.

A CONACyT, por la beca otorgada para la realización de este proyecto de investigación.

En primera instancia quiero agradecer a mi Consejero Particular: Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas, Dr. Jorge Cadena Iñiguez, Marcos Soto Hernández, Dr. Edelmiro Santiago Osorio y Dr. Juan Francisco Aguirre Medina por la asesoría, orientación, dedicación y paciencia brindada a lo largo de mi estancia en el Colegio y para la culminación del presente trabajo.

Al M. en C. Rubén San Miguel y al Sr. Domingo González por el apoyo gran brindado para llevar a cabo todo lo referente a la parte de Fitoquímica e identificación de compuestos.

A la M.C. Rocío Rivera y al M.C. Luis Martínez, por su valiosa ayuda para realizar los bioensayos.

A las integrantes del Laboratorio de Hepatopoyesis de la FES Zaragoza (Chío, Lupita, Itzen), gracias por todas esas pláticas constructivas para que este trabajo fuera siempre mejor.

A Fabiola Espinosa por compartir esta etapa de mi vida.

A la Dra. Susanita Ramírez, porque aunque nuestros caminos estén separados, siempre van paralelos. Gracias por recordarme que siempre se puede.

A Claudia de la Rosa y Rosa Ambrosio, por todos los ratos llenos de carcajadas, que hacían más relajada la estancia en los largos días de jornada de laboratorio.

Y a todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron para la realización de este trabajo.

Sandra Salazar Aguilar

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE CUADROS	xvii
1. REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. Microencapsulación	1
1.1.1. Componentes, morfología y materiales para la microencapsulación.....	1
1.2. Métodos de microencapsulación.....	2
1.2.1. Procesos Físicos	3
1.2.2. Procesos Químicos.....	4
1.3. Procesos físico-químicos	5
1.3.1. Polimerización interfacial	5
1.3.2. Microencapsulación molecular o inclusión de complejos	5
1.4. Caracterización	5
1.4.1. Morfología	5
1.4.2. Tamaño de partícula.....	6
1.4.3. Eficiencia de carga.....	6
1.4.4. Solvente residual.....	6
1.5. Perfil de liberación.....	6
1.6. Áreas donde se ha implementado la microencapsulación.....	7
1.7 Quitosano	8
1.7.1 Propiedades físico-químicas del quitosano.....	8
1.8. Enfermedades de interés de salud pública	11

1.8.1. Cáncer	12
1.8.2. Muerte celular	13
1.8.3. Apoptosis	13
1.9. Tratamientos contra el cáncer	14
1.10. Fitoterapia como alternativa antineoplásica.....	17
1.11. Familia Cucurbitaceae	18
1.11.1. Género <i>Sechium spp</i>	19
1.12. Origen y taxonomía del chayote (<i>Sechium edule</i>)	19
1.12.1. Descripción Botánica	20
1.12.2. Importancia del chayote (<i>Sechium edule</i>).....	21
1.13. Estudios Farmacológicos con chayote (<i>Sechium edule</i>)	22
1.13.1. Estudios de <i>Sechium spp.</i> respecto a su actividad biológica.....	22
1.14. Materiales mejorados de <i>Sechium spp</i>	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo General.....	26
4.2. Objetivos Específicos.....	26
5. HIPÓTESIS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Material Vegetal.....	28
6.2. Obtención del extracto en metanol	28
6.3. Caracterización Química del extracto en metanol	28
6.3.1. Análisis colorimétrico	29
6.3.2. Análisis cromatográfico	29
6.3.3. Cromatografía en columna.....	30
6.4. Cultivo de líneas celulares	31
6.5. Dilución del extracto y preparación de microesferas.....	32
6.6. Evaluación de la actividad biológica	32
6.7. Identificación de compuestos en las fracciones que mostraron actividad biológica	33

6.8. Producción de microesferas conteniendo el extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra	33
6.8.1. Preparación del quitosano	34
6.8.2. Fase dispersa (fase orgánica: quitosano mas extracto)	34
6.8.3. Fase continua (fase acuosa: inclusión del agente entrecruzante).....	34
6.8.4. Lavado y secado de microesferas	35
6.9. Caracterización de las microesferas.....	35
6.10. Pruebas de liberación	36
6.11. Análisis estadístico.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1. Rendimiento del extracto	37
7.2. Pruebas preliminares cromogénicas.....	37
7.3. Pruebas preliminares cromatográficas	37
7.4. Fraccionamiento en Cromatografía en Columna	38
7.5. Actividad biológica del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra	40
7.6. Actividad biológica de las fracciones del extracto en metanol del cultivar Perla Negra.....	43
7.7. Identificación de compuestos con CCF y HPLC	46
7.8. Caracterización de productos obtenidos de la microencapsulación del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra	52
7.9. Caracterización de las microesferas mediante el MEB.....	54
7.10. Pruebas de liberación y eficiencia de carga	56
7.11. Evaluación de las microesferas sobre HeLa y linfocitos	58
8. CONCLUSIONES	61
9. LITERATURA CITADA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias Morfológicas de las micro y nanopartículas.	2
Figura 2. Métodos de producción de micropartículas (modificado de Madene <i>et al.</i> , 2006)	3
Figura 3. Estructura química de a) quitina y b) quitosano (Tomado de Lopretti <i>et al.</i> , 2007)	9
Figura 4. Principales tipos de cáncer a nivel mundial Organización Mundial de Salud (2015) (http://www.cdc.gov/spanish/cancer/international/statistics.htm)	12
Figura 5. División celular de células cancerosas	13
Figura 6. Procesos de muerte celular A) necrosis: proceso pasivo, por medio de agentes físicos, químicos o biológicos y B) apoptosis: proceso activo, muerte celular genéticamente programada (Modificada de Kumar <i>et al.</i> , 2010).....	14
Figura 7. Formación de los metabolitos secundarios mediante el proceso de fotosíntesis	17
Figura 8. Características morfológicas de <i>Sechium edule</i> . A) zarcillo, B) tallo, C) inflorescencia, D) hoja y E) fruto	21
Figura 9. Grupos varietales de <i>Sechium edule</i> , descritas por GISeM. (Cadena-Iñiguez, <i>et al.</i> , 2007) 21	
Figura 10. Frutos en madurez hortícola del chayote (<i>Sechium edule</i>) cultivar Perla Negra	24
Figura 11. Prueba preliminar para alcaloides y terpenoides, se observa en A) la reacción colorimétrica de un precipitado color marrón (positiva para alcaloides) y en B) la intensificación de color, de café oscuro a negro, confirmando la presencia de terpenoides	37
Figura 12. Cromatografías de capa fina observadas bajo la luz ultravioleta de onda corta (superiores), onda larga (medias) y reveladas (inferiores) mostrando, de izquierda a derecha, las placas para la detección de alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenoides, taninos y saponinas.	38
Figura 13. Cromatografías de las fracciones con seguimiento para terpenos, obtenidos en el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra.	39
Figura 14. Cromatografía en capa fina de flavonoides presentes en fracciones del extracto de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra.	39
Figura 15. A) Inhibición de la proliferación de la línea celular Hela en presencia del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra con las concentraciones donde <i>Sechium edule</i> grupo varietal <i>amarus sylvestris</i> (progenitor) mostro actividad biológica. B) efecto antiproliferativo de <i>amarus sylvestris</i> sobre Hela, L929 y P388 (Cadena- Iñiguez <i>et al.</i> , 2013)	41

Figura 16. Porcentaje de proliferación de Hela estimulada con extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de n=9. * Diferencia significativa respecto al control y prueba de Tuley ($P \leq 0.05$)	41
Figura 17. Porcentaje de proliferación de linfocitos, estimulados con concentraciones del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de n=9	42
Figura 18. Efecto de inhibición celular de diferentes concentraciones del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra vista en el microscopio de luz (10X). Donde se aprecian oquedades como evidencia de la inhibición de la proliferación y células muertas flotando en el medio en las concentraciones más altas.	42
Figura 19. Concentración Inhibitoria media (IC_{50}) experimental y ajustada sobre la proliferación en la línea celular cancerígena (HeLa) tratada con el extracto en metanol de cultivar Perla Negra	43
Figura 20. Inhibición de proliferación de células HeLa estimuladas con las fracciones del extracto y el pool de las fracciones del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de n=9. * Diferencia significativa con base en el control y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).....	44
Figura 21. Identificación de cucurbitacinas en las fracciones con actividad biológica del cultivar Perla Negra, mediante CCF, incluidos los estándares de cucurbitacinas B, D, E e I.....	46
Figura 22. Cromatogramas de las fracciones con actividad biológica del extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra obtenidos mediante HPLC	47
Figura 23. Identificación de la presencia de flavonoides en la fracción del extracto en metanol del cultivar de <i>Sechium edule</i> Perla Negra mediante Cromatografía en Capa Fina.....	50
Figura 24. Cromatogramas de HPLC de la fracción de flavonoides que mostraron actividad biológica, obtenida del extracto metanólico del cultivar Perla Negra mediante cromatografía en columna, donde se confirma la presencia de ocho tipos de flavonoides (flavonoles, flavonas y flavononas) y otros no identificados	51
Figura 25. Microcápsulas observadas en el microscopio óptico (10X). Sin sonicación A) microcápsulas sin extracto, B) microcápsulas con extracto. Con sonicación, C) microesferas sin extracto; D) microesferas con extracto).....	53
Figura 26. Detalle de microcápsulas y microesferas en un microscopio de luz (40X). A)Microcápsula sin extracto. B1 y B2)Microcápsula con extracto en enfoque diferentes. C)Microesfera sin extracto D1 y D2) Microesfera con extracto en diferentes enfoques.	53

Figura 27. Morfología y tamaño de microcápsulas con extracto de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra, observadas en el microscopio de luz (imágenes superiores) y en el Microscopio Electrónico de Barrido (imágenes inferiores) donde se observa el intervalo de tamaños y los agrupamientos formados.	54
Figura 28. Morfología de las microesferas con extracto de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra. A) Algunas formaciones de conglomerados, y las microesferas dispersas, B) detalle de las microesferas. C y D) estructura interna y externa de microesferas vacías.	55
Figura 29. Tamaño de las microesferas con extracto de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra, visto en un Microscopio Electrónico de Barrido	55
Figura 30. Gráfica de liberación del extracto en metanol <i>Sechium edule</i> Cultivar Perla Negra contenido en las microesferas. Barras indican la desviación estándar de n=6.	56
Figura 31. Curva de calibración de diferentes concentraciones conocidas de extracto en metanol de Perla Negra (línea azul), donde se observa la intercepción de las concentraciones obtenidas mediante las lecturas de absorbancia (líneas rojas).	57
Figura 32. Inhibición de la proliferación de células HeLa, como efecto de la aplicación de microesferas cargadas con extracto en metanol de Perla Negra. Las barras indican el error estándar de n=9. *Diferencia significativa respecto al control y pruebas de Tukey ($P \leq 0.05$)	58
Figura 33. Regresión lineal simple para determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de las microesferas cargadas con extracto en metanol de Perla Negra con efecto antiproliferativo en HeLa.	58
Figura 34. Proliferación de linfocitos estimulados con microesferas cargadas con extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra, las barras indican el error estándar de n=9.	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Quitosano usado como excipiente y agente encapsulante para diferentes fármacos (Agnihotri <i>et al.</i> , 2004)	10
Cuadro 2. Costos del diagnóstico y tratamiento de las diferentes fases del Cáncer Cervicouterino (Gutiérrez. Delgado <i>et al.</i> , 2008)	16
Cuadro 3. Disolventes y reactivos utilizados para el rastreo de los grupo de metabolitos secundario que pudiera contener el extracto en metanol de <i>Sechium edule</i> cultivar Perla Negra.....	30
Cuadro 4 Rendimiento (mg) de cucurbitacinas en nueve fracciones del extracto en metanol del fruto del cultivar de <i>Sechium edule</i> , Perla negra, con actividad biológica sobre HeLa .	50
Cuadro 5. Rendimiento (mg) de los flavonoides encontrados en la F18 obtenida del extracto en metanol del cultivar de <i>Sechium edule</i> , Perla Negra, mediante CC, la cual mostró actividad antiproliferativa sobre HeLa	51

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual se busca recubrir, contener, inmovilizar o preservar compuestos químicos, biológicos y/o bioactivos, los cuales se pueden encontrar en estado sólido, líquido o gaseoso; con la finalidad de evitar que sus propiedades fisicoquímicas cambien por oxidación, ya sea por luz u oxígeno, que reaccionen con otras sustancias químicas o bien protegerlas del medio, con la finalidad de prolongar su vida útil (Pedraz y Orive, 2004; López *et al.*, 2009; Lopretti *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009; Cabané *et al.*, 2011; Castañeda *et al.*, 2011; López, 2010). En compuestos de actividad biológica (ADN, fármacos, proteínas, enzimas, etcétera.) se busca recubrirlos bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, formando partículas de tamaño micrométrico (Lopretti *et al.*, 2007).

1.1.1. Componentes, morfología y materiales para la microencapsulación

Los microencapsulados se forman de dos componentes, el **compuesto a encapsular**: es el compuesto de interés, puede estar en cualquier estado de la materia y tener o no efectos farmacológicos (principio activo) y el **material encapsulante**: compuesto que se encarga de formar la capa de protección para el compuesto de interés, puede ser de naturaleza orgánica y/o inorgánica. Un aspecto importante es que no debe haber reacción entre estos dos componentes (Tecnología, 2003; Sáez *et al.*, 2004; Parra, 2010; Castañeda *et al.*, 2011).

La morfología de las macropartículas mediante esta técnica son de cuatro tipos: las microcápsulas, donde el principio activo está envuelto por una película o capa fina del material encapsulante. Las microesferas: donde se forma una matriz del material encapsulante y el compuesto de interés se encuentra inmerso en ésta (Lopretti *et al.*, 2007). Si estas tienen un tamaño menor a 1 μm se les designa nanocápsulas o nanoesferas (Figura 1) y la obtención del tipo de micropartícula dependerá del método, material encapsulante y sustancia a encapsular que se usen para su fabricación (Sáez *et al.*, 2004).

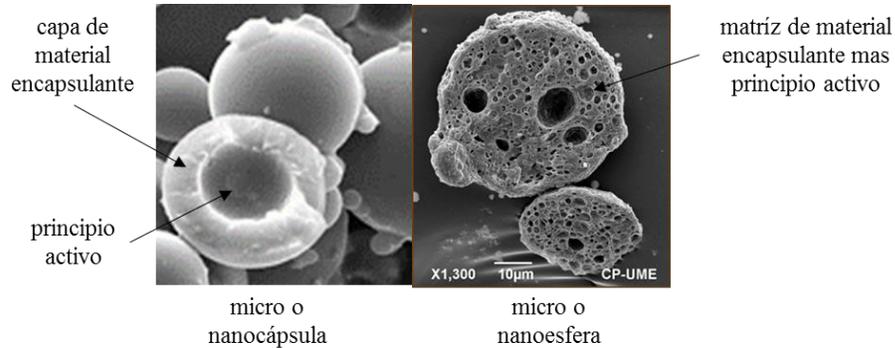


Figura 1. Diferencias Morfológicas de las micro y nanopartículas.

En cuanto a los materiales de recubrimiento, se usan: Lípidos (aceites, ceras, grasas y parafinas). Polímeros: que son los más usados por su gran diversidad ya que se encuentran polímeros naturales de origen animal o vegetal (agar, alginato, almidón, carragenina, dextranos, etilcelulosa, goma arábica, metilcelulosa, nitrocelulosa, quitosano, sacarosa), semisintéticos (etilcelulosa) y sintéticos (poliésteres) y Proteínas (albúmina, colágeno, gluten, caseína, gnetina) (Sáez *et al.*, 2004; Parra, 2010; Martín *et al.*, 2009; Castañeda *et al.*, 2011). Se debe tener cuidado eligiendo el tipo de material encapsulante, pues debe existir compatibilidad con el compuesto a encapsular, ya que influye en la estabilidad de la emulsión, el tamaño de la partícula y las propiedades de flujo (López *et al.*, 2009).

1.2. Métodos de microencapsulación

Existen diferentes métodos de microencapsulación, agrupándose en tres procesos (Yáñez *et al.*, 2002): A) Procesos físicos: la temperatura y la presión son componentes esenciales para la formación de micropartículas; B) Procesos químicos: por su naturaleza química los componentes se atraen electrostáticamente o bien por algún cambio de pH estos forman las micropartículas; C) Procesos físico-químicos: se emplean características físicas y químicas de los componentes para la formación de micropartículas (Tecnología, 2003; Yáñez *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2009 (Figura 2).

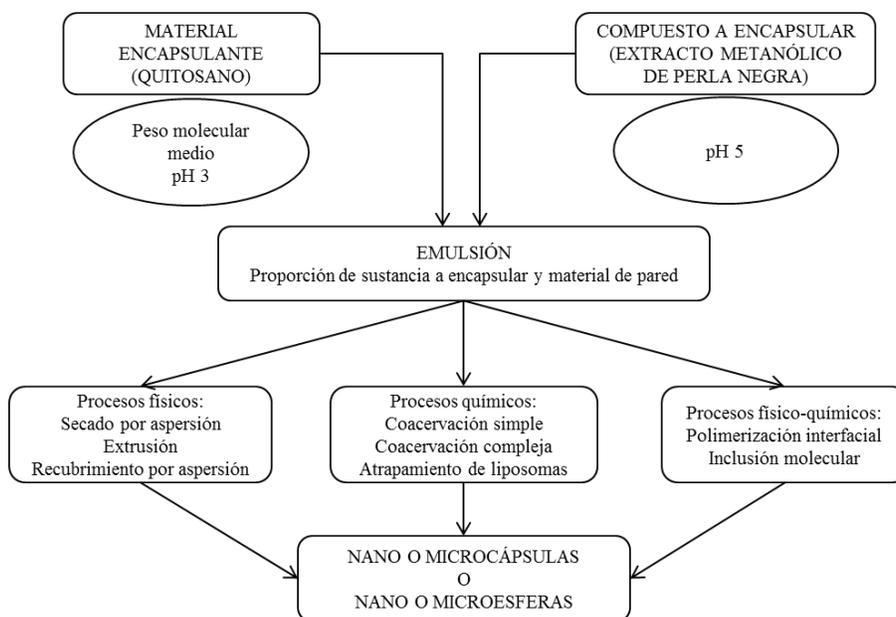


Figura 2. Métodos de producción de micropartículas (modificado de Madene *et al.*, 2006)

1.2.1. Procesos Físicos

1.2.1.1. Secado por Aspersión

Es el proceso más usado por ser barato y fácil. En este método se busca que un fluido se transforme en un material sólido, mezclando la sustancia de interés y el material encapsulante. La mezcla se introduce en un secador de aspersión, dentro del cual circula aire caliente (150-200 °C) lo que produce la rápida evaporación del disolvente, formando gotas minúsculas, obteniendo así las microcápsulas (Ré, 1998; Martín *et al.*, 2009). Este proceso consta de la atomización, la mezcla de pulverización y el aire, la evaporación y la separación del producto (Ré, 1998).

1.2.1.2. Extrusión

Consiste en forzar a través de moldes el material de recubrimiento fundido con el material central disperso, por ejemplo, una cápsula se forma por endurecimiento del material protector al entrar en contacto con un líquido deshidratante (Sandoval *et al.*, 2004).

1.2.1.3. Aspersión por enfriamiento o congelamiento

Es un proceso parecido al de secado por aspersión, aquí se utiliza aire frío para la obtención de la encapsulación. Se realiza la mezcla del material encapsulante (lípidos o grasas sensibles al calor) y la sustancia con la reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido de pared (Yáñez *et al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2004).

1.2.2. Procesos Químicos

1.2.2.1. Coacervación

Se forma la mezcla de la sustancia de interés, el material encapsulante y un material activo. Posteriormente un cambio de pH, temperatura o fuerza iónica provoca una fase de separación o coacervación de la cobertura y atrapamiento del material activo disperso. Finalmente la cobertura es solidificada por medios térmicos o entrecruzamiento (Sandoval *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009).

1.2.2.2. Atrapamiento de liposomas

Los liposomas son vesículas microscópicas de fosfolípidos dispersos en un medio acuoso. Son selectivamente permeables a iones. Se elaboran con moléculas anfifílicas que poseen sitios hidrofóbicos. En la fase acuosa, se coloca en material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico. El enrollamiento de la capa lipídica forma una cápsula estable debido a que no existe interacción de los lípidos con el agua (Sandoval *et al.*, 2004). Existen diferentes tipos de liposomas, como: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas (Martín *et al.*, 2009).

La formación de un solo compartimiento de vesículas es formado por la sonicación (aplicación de la energía del sonido para agitar las partículas de una muestra), mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en un buffer de fosfatos. Los liposomas son usados con éxito en la encapsulación de vacunas, enzimas y vitaminas para la liberación en el cuerpo (Yáñez *et al.*, 2002).

1.3. Procesos físico-químicos

1.3.1. Polimerización interfacial

En este proceso se produce una membrana que será el material encapsulante y que a su vez formara las microcápsulas. Esta se forma mediante la polimerización de un monómero en la interface de dos sustancias inmiscibles. Se realiza una dispersión de una solución acuosa de un reactivo soluble al agua, en una fase orgánica para producir una emulsión aceite-agua. Posteriormente se agrega un complejo soluble en aceite a la dispersión anterior para que en la interface de estas se forme una membrana polimérica que forma a su vez las microcápsulas. Finalmente estas se separan mediante centrifugación y pueden transferirse a un medio acuoso formando una suspensión acuosa (Yáñez *et al.*, 2002 y Martín *et al.*, 2009).

1.3.2. Microencapsulación molecular o inclusión de complejos

En esta técnica se busca que una pequeña molécula quede dentro de otra, para que esta última proteja a la sustancia de interés. En este caso la molécula que se usa como material encapsulante es la β -ciclodextrina, ya que por su naturaleza química esta posee un centro hidrofóbico y una superficie hidrofílica. Por lo que los complejos se forman en el centro de esa molécula en un medio acuoso facilitando su precipitación y separación y puede secarse mediante aspersion. Esta técnica es frecuentemente utilizada para proteger productos sensibles al calor (aceite de ajo y vitaminas A, E y K) (Sandoval *et al.*, 2004; Madene *et al.*, 2006).

1.4. Caracterización

Para corroborar que la creación de los microencapsulados fue adecuada se deben revisar mediante diferentes parámetros que forman parte de un control de calidad. Estos son:

1.4.1. Morfología

Se observan características geométricas como forma, superficie, si presenta poros y homogeneidad. Un aspecto importante es observar que se no encuentren aglutinadas. Si esto sucede se afectaría su modo de aplicación y el efecto esperado de las mismas, inclusive la liberación del principio activo (Sáez *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009; López, 2010). Esto se puede realizar mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (Sáez *et al.*, 2004).

1.4.2. Tamaño de partícula

Tamaño de la partícula: este dependerá del método, material y sustancia a encapsular. También del tamaño dependerá la vía de administración del microencapsulado (Sáez *et al.*, 2004). En algunos métodos como: secado por aspersión, se obtienen microcápsulas de menos de 100 µm (Martín *et al.*, 2009) o bien de 20-200 µm (López, 2010), en la coacervación, microesferas de hasta de 4 µm. En la gelificación externa: macropartículas de entre 400µm y 1mm y gelificación interna de aproximadamente 50 µm (Martín *et al.*, 2009).

1.4.3. Eficiencia de carga

Se refiere a la cantidad de principio activo encapsulado, expresada en porcentaje con respecto a la cantidad utilizada cuando se comienza el proceso.

$$E M= [(PA \text{ total} - PA \text{ extraíble})/PA \text{ total}] \cdot 100$$

Dónde: EM= eficiencia de microencapsulación; PA= principio activo

La carga es el contenido del principio activo en las macropartículas, lo que determina cual será la dosis requerida, para su elaboración (López, 2010; Sáez *et al.*, 2004).

1.4.4. Solvente residual

Son los compuestos químicos volátiles necesarios para la fabricación de los microencapsulados, debido a que no se pueden eliminar al 100% deben estar en concentraciones mínimas aceptables, para evitar toxicidad de las macropartículas hacia el medio donde serán liberadas.

1.5. Perfil de liberación

Se hace *in vitro* para conocer el potencial de liberación controlada (Sáez *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009). Las microesferas o microcapsulas son introducidas en solución buffer y se ponen en agitación, a diferentes intervalos de tiempo se va tomando lectura de las soluciones con ayuda de un espectrofotómetro y mediante este procedimiento se calcula la forma de liberación de los compuestos microencapsulados.

1.6. Áreas donde se ha implementado la microencapsulación

La técnica de microencapsulación se ha implementado en la industria alimentaria: microencapsulando ácido ascórbico utilizado como suplemento vitamínico y antioxidante, la finalidad es la protección de la calidad de alimentos (Pulido y Beristain, 2010; Lupo-Pasin *et al.*, 2012); agroquímica, cosmética, para protección de pigmentos naturales que son inestables al exponerlos al medio, plásticos (Parra, 2010), médica: en microencapsulación de células (Pedraz y Orive, 2004; Cabané *et al.*, 2011), de medicamentos como el tramadol (López-Hernández *et al.*, 2010), entre otros; metalúrgica: microencapsulación de extractantes (compuestos activos que atrapan metales pesados) para disminuir contaminación con metales pesados (Araneda y Valenzuela, 2009); textil: las telas pueden adquirir características muy particulares ya que las micropartículas que se incrustan en la tela puede contener perfume o bien bactericidas, repelentes de mosquitos o acaricidas (Tecnología, 2003) y química (Castañeda *et al.*, 2011) entre otras.

En el área farmacéutica, se utiliza con finalidad de que los fármacos sean eficientes y estables, ya que estos deberán ser administrados de forma adecuada dependiendo del fin terapéutico que se persigue (Hernández *et al.*, 2010).

Además la microencapsulación ofrece las siguientes ventajas:

- Protección de la degradación del fármaco desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o absorción.
- Disminución de la frecuencia de su aplicación o administración
- Incremento del beneficio terapéutico
- Disminución de la dosis total requerida para un tratamiento y mejor aprovechamiento de la dosis aplicada.
- Disminución de efectos secundarios o dañinos
- Puede atravesar las barreras biológicas (piel, mucosas gastrointestinal o respiratoria o la barrera hematoencefálica).
- Alcanzar el órgano, tejido o grupo celular donde la molécula debe ejercer su acción;
- Alcanzar compartimentos intracelulares;
- Controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción (Sáez *et al.*, 2007; Irache, 2008).

Los sistemas de transporte basados en materiales sólidos poliméricos presentan mayores ventajas en cuanto a estabilidad y reproducibilidad y favorecen la penetración de los “fármacos” en zonas corporales de difícil acceso (Roman *et al.*, 2008). Aunque los liposomas, también son sistemas de liberación, estos presentan limitaciones tecnológicas como: pobre estabilidad y reproducibilidad y baja eficiencia en el atrapamiento de fármacos (Tiyaboonchai, 2003). Por lo tanto, se encuentran diferentes materiales encapsulantes, pero un polímero con características favorables para su uso como material encapsulante es el quitosano.

1.7 Quitosano

El quitosano es un derivado de la quitina, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, aislado de exoesqueletos de diferentes especies de crustáceos (camarones, gambas, langostinos y cangrejos). La obtención de quitosano es a partir de la desacetilación parcial de la quitina, sustituyendo el grupo acetilo por grupo amino, mediante álcalis fuerte. Es un polímero lineal catiónico, de alto peso molecular $\beta(1-4)-2$ acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa y $\beta(1-4)-2$ -amino-2-desoxi- β -D-glucosa, dejando libre el grupo amino del carbono 2 (Figura 3) (Lárez, 2003; Agnihotri *et al.*, 2004; Lopretti *et al.*, 2007; Paños *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2008; Expósito, 2010; Mármol *et al.*, 2011).

1.7.1 Propiedades físico-químicas del quitosano

Son dadas por el grado de desacetilación en el que se encuentre el quitosano, puede variar de 30 hasta 95% y entre menor grado de desacetilación mayor viscosidad y viceversa (Veiga y Ruiz, 2004). Esta característica también repercute en su peso molecular promedio y su carga. Su valor de pKa 6.3, lo hace insoluble en soluciones acuosas por encima de pH 7, sin embargo a pH 6 los grupos amino de la glucosamina le dan un carácter protonado, que lo hace soluble en ácidos diluidos (Paños *et al.*, 2008), como el ácido fórmico, acético, tartárico y ácido cítrico (Mármol *et al.*, 2011). Además le proporciona propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción y también actividad antimicrobiana, antiolesterolémica, antioxidante (Expósito, 2010), antiviral y antifúngica (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

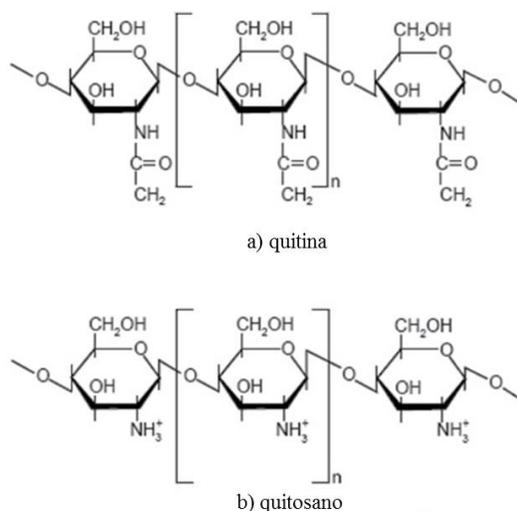


Figura 3. Estructura química de a) quitina y b) quitosano (Tomado de Lopretti *et al.*, 2007)

Dadas las propiedades de este compuesto las áreas de aplicación son diversas como: la agrícola y ganadera, biotecnológica, cosmética y médica (Lárez, 2003; Lárez, 2006; Mármol *et al.*, 2001). Sin embargo las investigaciones se han enfocado en el estudio de sus propiedades como sistema de liberación de principios activos en el campo de la agricultura, veterinaria y medicina, siendo este último donde se concentran la mayoría de investigaciones (Lemus *et al.*, 2007).

La industria farmacéutica ha realizado una diversidad de estudios con quitosano como: diluyente para la compresión directa de comprimidos, un aglutinante de granulación en húmedo, relleno en la extrusión (fabricación de comprimidos) y como biomaterial con potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos mediante nanopartículas, microesferas, membranas, esponjas y fibrillas (Baki and Ottenbrite, 2006; Expósito, 2010; Morris *et al.*, 2010), debido a su capacidad de mucoadhesión dada por las cargas positivas que posee lo que le permite adherirse electrostáticamente a la mucina (glicoproteína que contiene ácido siálico) la cual tiene cargas negativas y se encuentra presente en el tejido mucoso (Khanvilkar *et al.*, 2001).

De esta manera la interacción electrostática permite que se libere el fármaco por vía endocitosis (Tiyaboonchai, 2003), siendo la mejor vía de administración de microesferas de quitosano donde se encuentran tejidos que poseen una capa mucosa como la ocular (Enríquez *et al.*, 2006), nasal, bucal, vaginal, parodontal, pulmonar y rectal (Genta *et al.*, 1998; Tiyaboonchai, 2003; Agnihotri

et al., 2004; Baki and Ottenbrite, 2006; Patel *et al.*, 2008; Amidi *et al.*, 2010; Shaji *et al.*, 2010). En el estómago o el intestino, hay una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas (Martín *et al.*, 2009).

Las microesferas de quitosano usadas para este fin se han estudiado ampliamente en antibióticos, agentes anticancerígenos, fármacos pépticos, antígenos (vacunas) y proteínas, bajo diferentes métodos de preparación (Cuadro 1) (Agnihotri *et al.*, 2004; Paños *et al.*, 2008; Amidi *et al.*, 2010) e inclusive se han hecho complejos de quitosano con otros polímeros como la polibetaina (Racovita *et al.*, 2010). De esta manera se tiene mediante la microencapsulación usando éste polímero, una herramienta importante como apoyo para el combate de diferentes enfermedades, incluso aquellas que se denominan de interés de salud pública.

Cuadro 1 Quitosano usado como excipiente y agente encapsulante para diferentes fármacos (Agnihotri *et al.*, 2004)

Tipo de sistema	Método de preparación	Fármacos
Tabletas	Matriz	Diclofenaco sódico, pentoxifilina, ácido salicílico, teofilina
	Revestimiento	Propranolol, HCl
Capsulas	Cubierta de capsula	Insulina, ácido salicílico 5-amino
Microesferas/ macropartículas	Emulsión de entrecruzamiento	Teofilina, cisplatina, pentazocina, fenobarbital, teofilina, insulina, 5-fluorouracil, diclofenaco sódico, griseofulvin, aspirina, toxoide diftérico
		Pamidronato, subirilbifosfonato, mitoxantrona, progesterona
	Coacervación/precipitación	Prednisolona, interleucina-2, propranolol HCl
	Secado por aspersión	Cimetidina, famotidina, nizatidina, vitamina D-2, diclofenaco sódico, detopofeno, metoclopramida-HCl, albumina de suero bovino, ampicilina, Cloruro de cetilpiridinio, oxitetraciclina, betametasona
Nanopartículas	Gelación iónica	benzoato de rizatriptan (Jyotsna y Rajendra, 2010)
		Felodipina
		Hidrocortisona (Katas <i>et al.</i> , 2012)
	Método de tamizado	Clozapina
	emulsion-droplet coalescence coalescencia de las gotículas de emulsión	Ácido godopentético
Coacervación/precipitación	DNA, doxorubicina	
Gelación iónica	Insulina, ricina, albumina de suero bovino, ciclosporina A	

	Método micelar invertido	Doxorubicina
Perlas	Coacervación/precipitación	Adriamicina, nifedipina, albumina de suero bovino, sulfato de salbutamol, lidocaína-HCl, riboflavina
Capas	Solution castin fundición de solución	Dinitrato de isosorbida, gluconato de clorhexidina, tripsina, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, aciclovir, riboflavina, testosterona, progesterona, beta-oestradiol
Gel	Emulsión de entrecruzamiento	Malato de clorfeniramina, aspirina, teofilina, cafeína, lidocaina-HCl, acetato de hidrocortisona, 5-flourouracil

1.8. Enfermedades de interés de salud pública

La enfermedad es el conjunto de trastornos psíquicos y/o fisiológicos provocados por diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, que dan como resultado una alteración de la estructura-función de algún órgano o sistema. Puede ser identificada y clasificada de acuerdo con signos, síntomas y/o estudios auxiliares de diagnóstico (NOM-017-SSA2, 1994; Vélez, 2003; Núñez-Cortés y del Llano, 2012).

Las Enfermedades de Interés en Salud Pública: son aquellas que tienen alto impacto en la salud colectiva como Enfermedades infecciosas y Enfermedades de alta prevalencia, que pueden desarrollarse con otras de mayor gravedad provocando una muerte prematura y Enfermedades de alta transmisibilidad y poder epidémico que deben ser atendidas de manera inmediata para evitar su propagación y mortalidad (Consejo Nacional de Seguridad en Salud, 1998). Por lo tanto entender estas es uno de los principales objetivos de la salud pública, a través de observaciones e investigaciones bien diseñadas (UNAM, 2011).

El cáncer es considerado como una enfermedad de interés de salud pública y es la **principal causa de muerte** a escala mundial por el número de defunciones que provoca (OMS, 2014). Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas mundialmente en el 2012 (OMS, 2015). Se estima que si no se adoptan medidas para 2030, se pronostican que de 14 millones de casos registrados para el 2012 estos aumenten a 22 (OMS, 2015) o 26 millones de nuevos casos (UNAM, 2011) y el número de defunciones también aumentará. Los principales tipos de cáncer son: pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal, mamario y cervicouterino y aproximadamente el

70% de las defunciones por cáncer se han registrado en países de niveles socioeconómicos medios y bajos (OMS, 2015) (Figura 4).

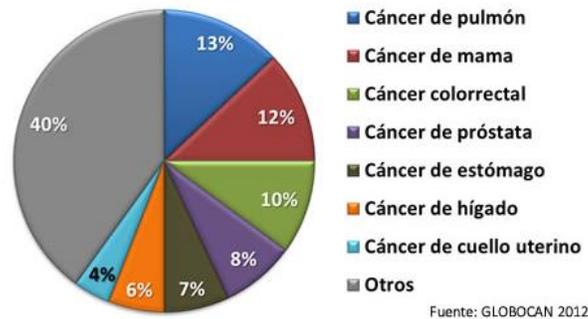


Figura 4. Principales tipos de cáncer a nivel mundial Organización Mundial de Salud (2015) (<http://www.cdc.gov/spanish/cancer/international/statistics.htm>)

En México ocupa el tercer lugar de las 20 principales causas de muerte con 73426 muertes reportadas para el 2013 (Sosa y García-Rodríguez, 2013; INEGI 2015). La incidencia de tumores malignos es alta y la frecuencia de aparición es diferente para hombres y mujeres. Los padecimientos más comunes en los hombres son cáncer de próstata, testicular y de colon, en mujeres el cáncer de mama y el cervicouterino. El cáncer del pulmón tiene incidencia en ambos sexos y la leucemia es el más común en los niños (UNAM, 2011).

1.8.1. Cáncer

La característica principal del cáncer es la multiplicación acelerada de las células anormales. Ésta es una enfermedad crónico-degenerativa, en la cual existen cambios biológicos que alteran procesos genéticos que involucran la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores de crecimiento celular (Lazcano-Ponce y Hernández-Ávila, 1997), lo que altera el ciclo celular, propiciando el crecimiento descontrolado de las células (Figura 5), las cuales se extienden más allá de sus límites habituales viajando por torrente sanguíneo e invadiendo partes adyacentes del cuerpo u otros órganos (metástasis) (Starr y Taggart, 2004).

El cáncer está asociado a la inapropiada regulación de la muerte celular programada o apoptosis, evento que protege la homeostasis tisular y asegura el estado de salud de los organismos (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001).

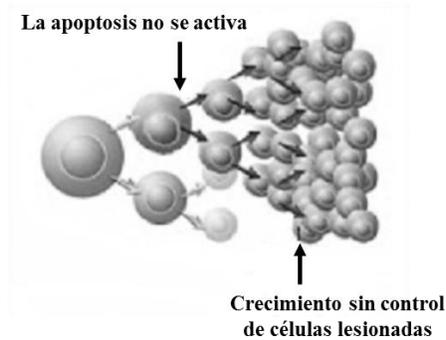


Figura 5. División celular de células cancerosas

1.8.2. Muerte celular

El proceso de muerte celular se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos: la necrosis y la apoptosis. En el primero la muerte celular se da por agentes físicos (calor, frío, radiaciones, traumatismos), químicos (sustancias tóxicas) y/o biológicos (microorganismos patológicos). En este caso la membrana celular se destruye y el contenido intracelular se escapa al exterior, lo que provoca también la muerte de células adyacentes, de esta manera enzimas lisosomales llegan a ese sitio de acción provocando un proceso inflamatorio y una cicatriz fibrosa que puede deformar el tejido u órgano afectado. Para este proceso no se requiere gasto de ATP (acción pasiva) (Figura 6) (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Jordán, 2003; Sánchez y Arboleda, 2008).

1.8.3. Apoptosis

Este proceso conocido como muerte celular programada. Se presenta en determinadas células y no necesariamente son células contiguas. Es considerada como una muerte natural fisiológica, que funciona como un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas genéticamente o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades. Es un proceso donde hay gasto de energía e inicia con señales moleculares que activan y desencadenan

la autodestrucción (Figura 6) (Arango *et al.*, 1997; Dubin y Stoppani, 2000; Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Jordán, 2003; Sánchez y Arboleda, 2008).

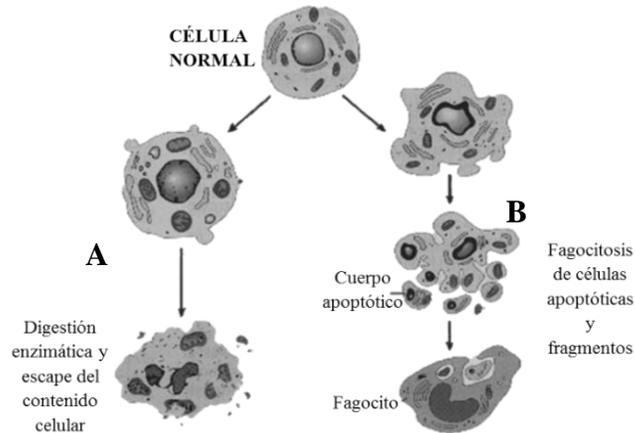


Figura 6. Procesos de muerte celular A) necrosis: proceso pasivo, por medio de agentes físicos, químicos o biológicos y B) apoptosis: proceso activo, muerte celular genéticamente programada (Modificada de Kumar *et al.*, 2010).

1.9. Tratamientos contra el cáncer

Los tratamientos utilizados para el control de esta enfermedad son las cirugías, la quimio y radioterapia; el tratamiento a seguir dependerá del tipo de cáncer y la etapa en la que se encuentre (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010), sin embargo el costo de los mismos es elevado. Como ejemplo podemos mencionar que el tratamiento para cáncer de mama en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) tiene un costo promedio por año-paciente de \$ 110,459.00, para las mujeres diagnosticadas en la etapa I \$ 74,522.00, en la etapa II \$ 102,042.00, en la etapa III \$ 154,018.00 y en la etapa IV \$ 199,274.00 (Knaul *et al.*, 2009).

Para cáncer de próstata el costo total por año de tratamiento registrado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” es de \$1,929,004.00, con gasto promedio por paciente de \$17,697.00 (\$4,462.00-40,621.00 ± \$ 9,929.00), gasto hospitalario promedio de \$24,146.00

(\$3,405 - \$59,000.00) (Márquez *et al.*, 2005). En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) los costos registrados para el control de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y de Linfomas de Hodgkin (LH) fueron: para LLA de \$ 71,655.00 para el niño de 20 kg y de \$ 95,825.90 para el de 30 kg. En LH el costo del estadio IB-IIB fue de \$ 39,342.16 para el niño de 20 kg y de \$ 52,620.14 para el de 30 kg y en el estadio III-IV de a \$ 41,469.46 y \$ 55,465.39 respectivamente (Jasso-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Para el tratamiento del cáncer cervicouterino la Secretaría de Salud también realiza gastos dependiendo de la etapa como se muestran en el Cuadro 2, donde se menciona también el costo por diagnóstico.

Sin embargo a pesar de las grandes inversiones para los tratamientos de control del cáncer, estos tienen como inconveniente efectos secundarios para los pacientes, debido a que no sólo evitan la proliferación de las células malignas, sino también de las sanas (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010). La radioterapia, provoca: descamación de la piel, piel seca o húmeda, cansancio y fatiga, diarrea, mala absorción, necrosis de tejidos blandos y mielosupresión entre otros, debido a que el tratamiento no tiene especificidad pues actúa sobre células sanas también (Secretaría de Salud, 2010).

Algunos medicamentos como el cisplatino, provoca insuficiencia renal aguda, sordera, leucopenia, neuritis periférica, depresión de la medula ósea, náusea y vómito. El paclitaxel: hipersensibilidad, hipotensión, mucositis, náusea, vómito, diarrea, artralgias, mialgias, fiebre, fatiga, neuropatía periférica, mielosupresión y es genotóxico. El aprepitant: fatiga náusea, constipación, diarrea anorexia, cefalea, vómito, mareo, deshidratación, dolor abdominal y gastritis. El carboplatino: mielosupresión, náusea vómito, insuficiencia renal y parestesias. La Gemcitabina: anemia, edema, hematuria, leucopenia, proteinuria, trombocitopenia, broncoespasmo e hipertensión arterial (Secretaría de Salud, 2010).

Cuadro 2. Costos del diagnóstico y tratamiento de las diferentes fases del Cáncer Cervicouterino (Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2008)

Fase		Diagnóstico	Tratamiento, terapias y seguimiento
Fase 0	Conización	\$ 2,913.00	\$ 2,116.00
	Histerectomía simple		12,606.00
Fase Ia1, Ia2	Braquiterapia	2,913.00	10,824.00
	Radioterapia		7,506.00
	Quimioterapia		30,752.00
	Conización		5,740.00
	Crioterapia		4,477.00
	Histerectomía simple		16,230.00
Fase Ib1	Radioterapia	12,606.37	7,506.00
	Histerectomía radial, radioterapia		31,894.00
Fase Ib2,IIa	Radioterapia	2,913.00	7,506.00
	Histerectomía radial		28,012.00
	Histerectomía radial, radioterapia, quimioterapia		59,022.00
	Radioterapia, quimioterapia		34,634.00
Fase IIb, IIIa, IIIb	Radioterapia, quimioterapia	4,751.00	34,634.00
Fase IVa	Radioterapia, quimioterapia	5,496.00	66,017.00
Fase IVb	Radioterapia, quimioterapia	6,225.00	65,772.00

Es por esta situación que se ha recurrido a la búsqueda de otras terapias con costos menores y efectos secundarios mínimos, siendo una de ellas la fitoterapia, ya que los vegetales contienen sustancias que pueden ser utilizadas para fines terapéuticos.

1.10. Fitoterapia como alternativa antineoplásica

Las plantas son una rica fuente de metabolitos secundarios, producto del metabolismo secundario de la fotosíntesis (Figura 7). Estos compuestos vegetales presentan actividad biológica como respuesta defensiva frente a patógenos y predadores y pueden tener efectos farmacológicos benéficos para otros organismos. Los metabolitos secundarios se encuentran como complejos y sus componentes se complementan para actuar con equilibrio en la fisiología planta-organismo, lo que produce una mejor asimilación y efectos secundarios mínimos, por lo que pueden ser utilizados para la producción de nuevos fármacos (Mongelli y Pomilio, 2002; Quesada-Hernández, 2008; Gutiérrez-Ravelo y Estévez-Braun, 2009).

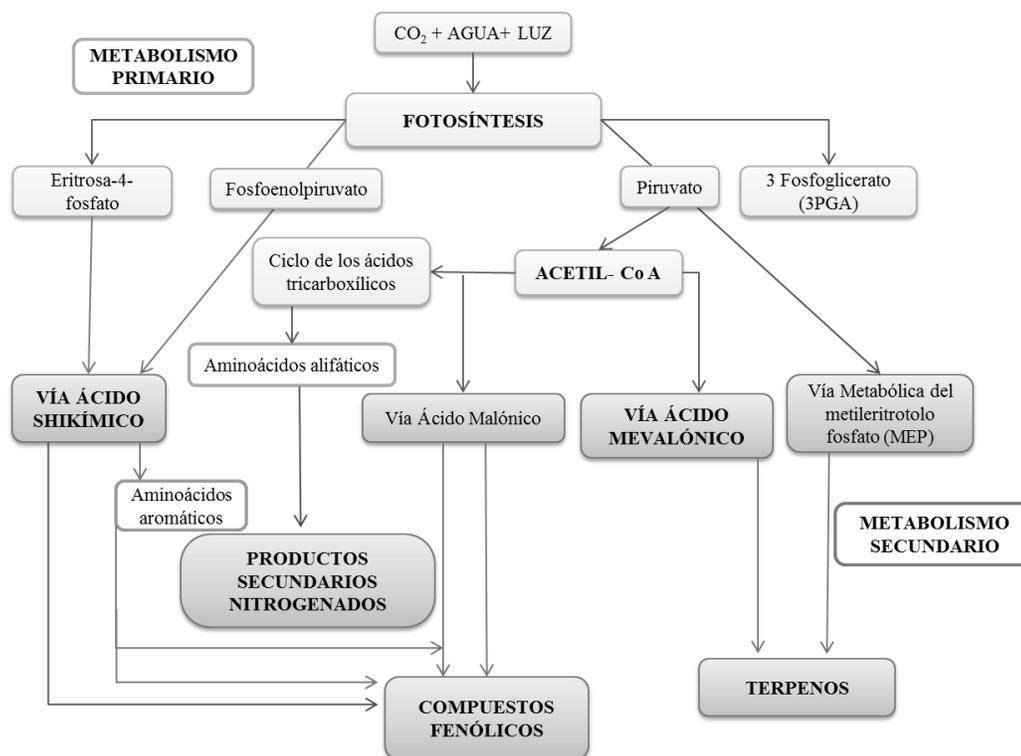


Figura 7. Formación de los metabolitos secundarios mediante el proceso de fotosíntesis

Diferentes especies de plantas contienen compuestos que se usan para el control de cáncer, de la cuales se pueden mencionar: *Catharanthus roseus* de la cual se obtienen los alcaloides: vincristina (Oncovin®) combinada con otros medicamentos para tratar leucemia linfocítica

aguda en niños, cáncer cervicouterino, de colon, de mama y otros carcinomas y vinblastina (Velban®) utilizada para el tratamiento de linfoma de Hodgkin y cáncer de ovario. De la corteza de *Taxus brevifolia* se obtuvo el Taxol® (Paclitaxel), un diterpeno para el tratamiento de cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y de colon. El taxol, doxetacel y los derivados de la camptotecina abarcan una tercera parte de las ventas globales de los agentes antineoplásicos (Vega-Ávila *et al.*, 2006).

De esta manera ampliar el número de especies vegetales para el combate contra el cáncer nos conduce a la realización de la búsqueda de otras especies y realizar las investigaciones necesarias. En México Alonso-Castro *et al.*, (2011) realizaron una revisión de plantas usadas de manera tradicional para tratamiento contra el cáncer. Reportaron 300 especies, de las cuales 88 se han probado *in vitro*, mostrando efectos citotóxicos al menos en una línea celular de cáncer y 14 de estas especies mostraron también efectos antineoplásicos *in vivo*. Enlistaron 90 familias botánicas a las que pertenecen las plantas reportadas con actividad contra el cáncer dentro de las cuales se encuentra la familia Cucurbitaceae de ella se habla con mayor detalle a continuación.

1.11. Familia Cucurbitaceae

Esta familia incluye cerca de 118 géneros y 825 especies a nivel mundial. Es un grupo de plantas rastreras o trepadoras, anuales o perennes y de flores unisexuales (con unos cuantos casos de bisexualidad) con ovario ínfero. Esta familia es importante a nivel mundial debido a que su principal uso es alimenticio, otras son utilizadas para la elaboración de utensilios y otras con fines medicinales. Algunas son silvestres y de distribución restringida y son plantas cultivadas de importancia económica. En México hay 38 géneros y 138 taxa, 13 son cultivadas. Algunas son nativas como las calabazas (*Cucurbita argyrosperma* ssp. *argyrosperma*, *C. moschata* y *C. pepo*), el chilacayote (*Cucurbita ficifolia*) y el chayote (*Sechium edule*), otras introducidas como el melón (*Cucumis melo*), el pepino (*Cucumis sativus*) y la sandía (*Citrullus lanatus*) (Lira *et al.*, 1998).

1.11.1. Género *Sechium* spp

El género *Sechium* spp., pertenece a la tribu Scyocae (Schard.). Era considerado como un género monoespecífico, únicamente constituido por una especie: *S. edule* pero Jeffrey aumentó el género incluyendo una serie de taxa silvestres. Así el género quedó delimitado con ocho especies, ubicadas en las secciones de *Sechium* y *Frantzia*, sin embargo, a pesar de los esfuerzos de Jeffrey, en Lira-Saade (1996), por fusionar algunos géneros y especies relacionados con *Sechium*, diversos autores han considerado que por lo menos *Polakowskia* y *Frantzia* están bastante distantes del centro de origen de *Sechium* y taxonómicamente son diferentes (Gamboa, 2005).

1.12. Origen y taxonomía del chayote (*Sechium edule*)

El chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Swartz] es una especie originaria de Mesoamérica. De esta planta a diferencia de otras especies cultivadas, no existen evidencias arqueológicas que apoyen la antigüedad de su origen, debido a que la testa de la semilla es suave y el fruto carnoso lo que no permite su conservación (Lira, 1995). La mayor evidencia del origen de esta planta es que existen chayotes silvestres en la región centro y sur de México y Centro América (Cook, 1901).

Se consideran sinónimos de *Sechium* a los siguientes taxones: *Sicyos edulis* Jacq., *Chayota edulis* Jacq., *Sechium americanum* Poir., *Cucumis acutangulus* Descourt. y *Sechium chayota* Hemsley (Flores, 1989), y se acepta que en el género *Sechium* se encuentran diez especies, ocho silvestres: *S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, *S. vilosum* y dos cultivadas *S. tacaco* y *S. edule* con una distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996).

El término chayote es una modificación de los vocablos Náhuatl “huizt ayotl que significa calabaza con espinas, que pudo derivar en “chayotl” lo que confirma el uso de esta planta desde tiempos precolombinos (Cook, 1901). Sus nombre comunes son: chayote (México, Nicaragua, Costa Rica, Panamá); *castellano*: cidrayota (Colombia), gayota (Perú), huisquil, güisquil o uisquil (Chiapas, (México), Guatemala y El Salvador), papa del aire, cayota (Argentina); *portugués*: chocho, chuchu, xuxu, machiche, machuchu (Brasil) (Lira, 2011).

Clasificación Taxonómica (GISeM, 2010)

Reino: Vegetal

Subreino: Embryophyta

División: Anthophyta

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitaceae

Subfamilia: Sicyoideae

Género: *Sechium*

Especie: *edule*

1.12.1. Descripción Botánica

El chayote es una hierba perenne, leñosa en la base, ascendente, provista de zarcillo y raíces tuberosas. Presenta tallos trepadores de varios metros de longitud, ligeramente comprimidos y longitudinalmente surcados, verdes cuanto jóvenes y pardos al madurar; cada nudo con una hoja, una inflorescencia unisexual y un zarcillo ramificado. Hojas con pecíolo largo, simples, palmado lobuladas o anguladas; los lóbulos son agudos o acuminados y la venación ramificada. Flores unisexuales, axilares y en ocasiones estaminadas y pistiladas en el mismo nudo o flores de ambos sexos sobre el mismo eje. Fruto péndulo, grande obovoide o piriforme, con un número variable de depresiones longitudinales, superficie beige casi blanca, verde claro u oscuro y brillante, puede ser glabra, finamente pubescente o con un número variable de espinas y una sola semilla, grande, plana y es una planta vivípara (Figura 8) (Maffioli, 1981; Lira-Saade, 1996, Flores, 1989; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008).

En México, esta especie se encuentra en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz, y es en este último Estado donde se encuentra la mayor diversidad biológica. Se han clasificado a los chayotes cultivados en tres grandes grupos: blancos, verdes y espinosos, siendo los dos primeros generalmente lisos. Sin embargo el Grupo Interdisciplinario de *S. edule* en México (GISeM) (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2010), ha establecido la nomenclatura varietal para diferentes variedades de *S. edule* (Figura 9) respecto de su ancestro silvestre y que ha permitido su registro y protección legal.

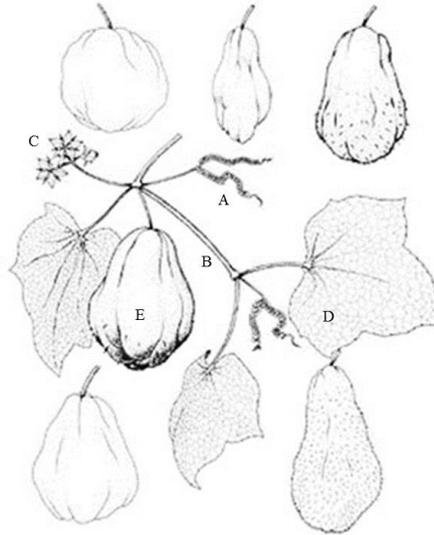


Figura 8. Características morfológicas de *Sechium edule*. A) zarcillo, B) tallo, C) inflorescencia, D) hoja y E) fruto



Figura 9. Grupos varietales de *Sechium edule*, descritas por GISeM. (Cadena-Iñiguez, *et al.*, 2007)

1.12.2. Importancia del chayote (*Sechium edule*)

La importancia de las variantes biológicas cultivadas de *S. edule* incluyen aspectos principalmente alimentarios y socioeconómicos por generación de divisas en los mercados de exportación (Cadena-Iñiguez y Arévalo, 2010), además de aplicaciones en la medicina

tradicional en la cual se reporta como diurético, cardiovascular, antiinflamatorio, contra calcificaciones renales y arteriosclerosis. Las infusiones de hojas se emplean para disolver cálculos renales, y como auxiliares en el tratamiento de la arterioesclerosis e hipertensión; las infusiones de frutos se utilizan para aliviar la retención de orina. Las propiedades cardiovasculares de las infusiones de hojas han sido comprobadas en estudios modernos, mientras que su gran efectividad en la curación de enfermedades renales ya se conocía en la península de Yucatán, desde la época colonial, donde estos padecimientos son muy comunes (Lira, 2011).

1.13. Estudios Farmacológicos con chayote (*Sechium edule*)

Diferentes estudios han confirmado el uso de diferentes partes de la planta para tratar distintas enfermedades, tales como, las registradas por Cambar *et al.* (1980) y Cambar (1985) como hipotensor arterial y vasodilatador, además del uso de las raíces tallos y hojas como agentes antimicrobianos (Ordoñez *et al.*, 2003), y estas últimas con las semillas como antioxidante (Ordoñez *et al.*, 2006). Otros autores como Salama *et al.* (1986; 1987) reportan actividad antiinflamatoria y cardiotónica del fruto, y Gordon *et al.* (2000), su uso en el tratamiento de arteriosclerosis. Estudios realizados por Yen *et al.* (2001) revelan su acción inhibitoria de la mutagenicidad, y como depresor del sistema nervioso central y antiepiléptico (Mohammed *et al.*, 2012). Estos estudios muestran usos prometedores de *S. edule*, sin embargo, en ninguno de ellos se puntualiza la variante biológica utilizada. Esta situación es relevante, si se considera la amplia diversidad morfológica y bioquímica contenida en las variantes intraespecíficas de la especie (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008; 2011), ya que el tipo y contenido de metabolitos secundarios es muy diferente entre grupos varietales, lo cual repercute en la actividad biológica que puedan presentar.

1.13.1. Estudios de *Sechium* spp. respecto a su actividad biológica

Cadena-Iñiguez *et al.* (2007; 2013) reportan la citotoxicidad de ocho variantes de *S. edule* sobre diferentes líneas celulares cancerígenas, resaltando que los grupos varietales *albus dulcis*, *a. levis*, *amarus silvestryis*, *nigrum spinosum*, y *n. xalapensis*, actúan sobre P-388 (fibroblastos de leucemia de ratón) y L-929 (fibrosarcoma de pulmón de ratón), mientras que *nigrum spinosum*

mostró efecto antiproliferativo sobre HeLa y L-929 (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009) y efecto inhibitorio en la viabilidad de células leucémicas WEHI-3 (Aguñiga, 2013), y *albus levis*, *a. dulcis*, *a. minor*, *amarus silvetrys*, *n. levis*, *nigrum spinosum*, *n. xalapensis* y *virens levis* efecto antiproliferativo en L-929, HeLa y P-388 (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013). Los principales metabolitos secundarios identificados y relacionados con la actividad biológica son alcaloides no fenólicos, esteroides, saponinas, triterpenos (Salama *et al.*, 1986; Cadena *et al.*, 2007; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015), ésteres de ácidos grasos saturados (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009) flavonoides glicosilados (Siciliano *et al.*, 2004; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015) y taninos (Aguñiga, 2013).

Por esta razón es relevante atender estudios de bioprospección de forma paralela a programas de mejoramiento genético en *S. edule* con fines distintos al alimentario; de tal forma que dada la plasticidad de adaptación ambiental de la especie, (Palacios-López y Rodríguez-López, 2007; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008; Villamizar *et al.*, 2012), se amplíe la gama de genotipos sobresalientes para aplicaciones farmacológicas, que faciliten su uso a menores concentraciones de forma segura.

1.14. Materiales mejorados de *Sechium* spp

En el Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* (BANGESE), ubicado en Huautusco, Veracruz, México, se ha desarrollado de forma permanente un Programa de mejoramiento a corto, mediano y largo plazo con los recursos fitogenéticos del género *Sechium* spp., partiendo de las accesiones preservadas en este sitio, así como, de acciones concertadas con productores participantes. La orientación de dicho programa obedece a los distintos objetivos (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2012).

La hibridación inducida entre especies es utilizada cada vez con más frecuencia para cumplir diversos propósitos, tales como, aumentar el crecimiento y la supervivencia a través de la heterosis, obtener ejemplares físicamente más atractivos o producir ejemplares estériles y/o resistentes a enfermedades consiguiendo híbridos interespecíficos (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013).

Aunque mediante cruzamientos interespecíficos se pueden producir semillas y plantas fértiles, estos nuevos organismos sólo pueden sobrevivir y perpetuarse si encuentran un habitat ecológico adecuado. Si son capaces de establecerse por sí mismos, o bien se polinizan cruzándose entre sí, o se retrocruzan con uno o ambos de sus progenitores o con una posible tercera especie. Uno de los materiales biológicos recientemente obtenidos es el cultivar Perla Negra, correspondiente taxonómicamente a *Sechium edule* grupo varietal *nigrum minor* (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013) (Figura 10).



Figura 10. Frutos en madurez hortícola del chayote (*Sechium edule*) cultivar Perla Negra

Así en este estudio se evaluó la actividad biológica de este cultivar obtenido por mejoramiento genético, sobresaliente en contenido de metabolitos reportados con actividad biológica, con el fin de determinar si heredó la actividad biológica que mostró unos de sus progenitores, *amarus silvestris*, ya que este último mostró efectos antiproliferativo y citotóxico en tres líneas celulares cancerígenas, fibroblastos de leucemia de ratón (P-388), fibrosarcoma de pulmón de ratón (L-929) y cáncer cervicouterino humana (HeLa), partiendo de la premisa de que diferentes linajes genéticos, pueden derivar en efectos distintos y ser usados como fuente de principios activos para la medicina complementaria. El efecto fue probado con el extracto en metanol y micropátulas conteniendo el extracto en metanol sobre la línea celular cancerígena HeLa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conocer si *Sechium edule* cultivar Perla Negra heredó la actividad biológica, antiproliferativa y/o citotóxica de su progenitor *amarus silvestrys*, evaluando el extracto en metanol, las fracciones de este y el extracto en metanol microencapsulado del cultivar Perla Negra sobre la línea celular cancerígena humana HeLa.

3. JUSTIFICACIÓN

El fruto del cultivar de *Sechum edule*, Perla Negra, no ha sido caracterizado fitoquímicamente y no se conoce la actividad biológica que pueda mostrar, por lo tanto, realizar la caracterización fitoquímica del extracto en metanol y evaluar su actividad biológica por medio de bioensayos en alguna de las líneas celulares cancerígenas en las cuales su progenitor, *amarus silvestrys*, tuvo efecto antiproliferativo, proporcionará ésta información y mediante la fabricación de microesferas como vehículo para el extracto en metanol de *S. edule* cultivar Perla Negra, permitirá que la estabilidad del extracto y además que su efecto biológico actúe por mayor tiempo sobre la línea celular cancerígena humana HeLa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto del extracto en metanol microencapsulado de *Sechium edule* cultivar Perla Negra sobre la línea celular de cáncer cervicouterino humana, HeLa.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener el extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra.
- Hacer la caracterización fitoquímica del extracto en metanol de *S. edule* cultivar Perla Negra.
- Evaluar el efecto antiproliferativo del extracto en metanol y fracciones obtenidas de *S. edule* cultivar Perla Negra, en HeLa.
- Identificar los compuestos contenidos en el extracto en metanol y las fracciones del extracto en metanol de *S. edule* cultivar Perla Negra que mostraron actividad biológica sobre HeLa.
- Fabricar las microesferas del extracto en metanol de *S. edule* cultivar Perla Negra
- Caracterizar las microesferas conteniendo el extracto a través de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Hacer pruebas de liberación de la microesferas.
- Evaluar el efecto de las microesferas con extracto en metanol de *S.edule* cultivar Perla Negra en HeLa.

5. HIPÓTESIS

El extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra presentará actividad antiproliferativa y el extracto microencapsulado permitirán que su efecto se prolongue, evitando la proliferación celular en la línea de cáncer cervicouterino humana (HeLa) por mayor tiempo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material Vegetal

Se usaron frutos de la cultivar Perla Negra en madurez hortícola (12 ± 2 días después de antesis), cuyo linaje genético proviene de un proceso de mejoramiento, mediante la selección masal visual estratificada (Molina, 1980; Avendaño *et al.*, 2009; Avendaño-Arrazate *et al.*, 2014) a partir de variantes biológicas del grupo varietal *S. edule* var. *nigrum minor*, del cual se obtuvieron materiales sobresalientes, se cruzaron con un progenitor amargo del grupo *S. edule* var. *amarus silvestrys*. Una vez estabilizada la progenie, su comportamiento fue como variedad de polinización libre cuyos rasgos distintivos sobresalientes son el fruto color verde muy oscuro, epidermis lisa, de forma piriforme ligeramente ovada, pequeños (5.7 - 3 cm) (Cadena-Iñiguez *et al.* 2007; 2011) y fuerte sabor amargo. Los frutos se picaron en hojuelas delgadas para facilitar su secado en un horno con circulación de aire a 45 °C hasta reducir a 10% la humedad, posteriormente el material se molió, en un molino eléctrico a un tamaño de partícula de 2 mm (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007).

6.2. Obtención del extracto en metanol

El extracto en metanol, se obtuvo de una muestra final de 1.013 kg, mediante una extracción discontinua con metanol (99.8 %, ACS certificado, Merck) por 48 horas a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), hasta que el solvente no mostró el color verde típico del fruto. Posteriormente la muestra se filtró, y el disolvente se evaporó a presión reducida a 45 °C, hasta obtener un extracto libre de disolvente (Che *et al.*, 1985; Afifi *et al.*, 1999 modificadas por Cadena-Iñiguez, 2005). Finalmente se determinó el peso y rendimiento del extracto.

6.3. Caracterización Química del extracto en metanol

Se realizaron pruebas preliminares mediante reacciones colorimétricas y cromatográficas del extracto para observar los posibles grupos de metabolitos secundarios que pudiera contener.

6.3.1. Análisis colorimétrico

Las pruebas se realizaron en tubos de ensayo de 10 mL. Se diluyó una muestra 5 mg en 1 mL de agua destilada y se prosiguió de la siguiente manera:

Alcaloides: Se adicionó reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado marrón indicaría la presencia de este metabolito.

Saponinas: Se agitó vigorosamente la muestra por 5 min y la formación de espuma con apariencia de panal de abeja se consideraría prueba positiva para este metabolito.

Flavonoides: Se añadió un trocito de cinta de magnesio y 1mL de HCl concentrado. La formación de espuma rojiza indicaría la existencia de flavonoides en el extracto.

Aceites Esenciales: La precepción de un olor agradable y la presencia de gotas de aceite flotando indicarían la presencia de este grupo de metabolitos.

Terpenos (terpenoides): Se llevó a sequedad y posteriormente se agregó cloroformo (resuspensión), luego se agregaron tres gotas de ácido anhídrido acético y tres de ácido sulfúrico, la presencia de una coloración azul o la intensificación del color se tomaría como prueba positiva.

Taninos: se llevó a sequedad y se agregó HCl concentrado, una coloración azul confirmaría la presencia de este grupo.

6.3.2. Análisis cromatográfico

Se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) con placas de silica gel (gel de silica G60 Merck 70-230 mallas Alemania) de 5x2 cm con fase móvil y agente cromogénico específico para grupo de metabolitos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Disolventes y reactivos utilizados para el rastreo de los grupo de metabolitos secundario que pudiera contener el extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra.

Grupo de metabolitos	Fase móvil	Agente cromogénico	Color generado con la presencia del grupo
Alcaloides	Metanol-diclorometano (9:1)	Dragendroff	Naranja
Fenoles	Acetato de Etilo Metanol (9:1)	Folin-Ciocalteu	Azul o violeta
Flavonoides	Acetato de Etilo-Ácido Fórmico-Ácido Acético-H ₂ O (100:11:11:26)	NP-PEG	Azul intenso, amarillo, verde y naranja
Terpenoides	Acetato de etilo-metanol (7:3)	Vainillina-H ₂ SO ₄	Rojo, violeta, morado y café-marrón
Taninos	Acetato de Etilo-Ácido Fórmico-Ácido Acético-H ₂ O (100:11:11:26)	FeCl ₃	Azul o violeta
Saponinas	Acetato de etilo-metanol (7:3)	Vainillina-H ₂ SO ₄	Violeta

6.3.3. Cromatografía en columna

Para el fraccionamiento en cromatografía en columna (CC) se utilizó una muestra de 10g de extracto en metanol y se usó una columna de 7 cm de diámetro 75 de largo. El sistema utilizado fue un gradiente Hexano-Acetato de etilo-Metanol, utilizando 1L por cada cambio de polaridad, obteniendo 10 fracciones de 100 mL cada una. Los disolventes se aplicaron por la columna en el siguiente orden:

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1.- hexano (H) (100%) | 12.- acet:metanol (meOH) (90:10) |
| 2.- hexano (H)- acetato de etilo (acet) (90:10) | 13.- acet:meOH (80:20) |
| 3.- h:acet (80:20) | 14.- acet:meOH (70:30) |
| 4.- h:acet (70:30) | 15.- acet:meOH (60:40) |
| 5.- h:acet (60:40) | 16.- acet:meOH (50:50) |
| 6.- h:acet (50:50) | 17.-acet:meOH (40:60) |
| 7.- h:acet (40:60) | 18.- acet:meOH (30:70) |
| 8.- h:acet (30:70) | 19.- acet:meOH (20:80) |
| 9.- h:acet (20:80) | 20.- acet:meOH (10:90) |
| 10.- h:acet (10:90) | 21.- meOH (100%) |
| 11.- acet (100%) | |

Se realizó un seguimiento con CCF en placas 5x2 cm de las fracciones que por este gradiente se obtuvieron y aquellas con un Rf muy parecido se juntaron.

Producto de lo anterior y para el rastreo de terpenoides se realizaron tres cromatografías a en capa fina (CCF), usando tres mezclas de disolventes con diferente polaridad como fase móvil; la primera con hexano:acetato de etilo (5:5) la segunda con hexano:acetato de etilo (2:8) y la tercera de acetato de etilo:metanol (8:2) y fueron reveladas con el agente cromogénico vainillina 1% y ácido sulfúrico 10% (Wagner y Bland, 2001). Para flavonoides se utilizó la fase móvil acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua en la relación 100:11:11:26, y como agente cromogénico la mezcla de 2-aminoetil difenil-borinato:polietilen glicol (NP 1%:PEG 5%). Las cromatoplacas se observaron con luz UV a 254 y 365 nm (Cole-Parmer 9818, Chicago) antes de ser reveladas (Wagner y Bland, 2001).

6.4. Cultivo de líneas celulares

La línea celular HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) procedente del American Type Culture Collection (ATCC: The Global Bioresource Center, Manassas, VA, USA), se mantuvo como cultivo en monocapa, en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Médium, Invitrogen, USA) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) desactivado (Gibco BRL, USA) a 36 °C en

una atmósfera al 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en incubadora a una densidad de 1x10⁶ células·mL⁻¹.

Linfocitos (humanos): se obtuvieron de una muestra de sangre de 10 mL y se agregó Ficoll en relación 1:1. Se hizo una separación por densidad durante media hora (BECKMAN model TJ-5 centrifuge) y posteriormente se hizo el cultivo con IMDM y 20% de suero fetal bovino.

6.5. Dilución del extracto y preparación de microesferas

El extracto completo se solubilizó en etanol absoluto y en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) [cloruro de sodio (8 g), cloruro de potasio (0.2 g), fosfato de potasio monobásico (0.2 g), fosfato de sodio dibásico (2.16 g)], pH 7.2-7.4 (SIGMA, CHEM, St. Louis, USA. La mezcla se centrifugó a 500 g durante cinco minutos (Hermle-Labortechnik, Alemania). Los sobrenadantes se decantaron para obtener una solución madre y hacer las diluciones pertinentes (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009).

En el caso de las microesferas se pesaron 65.5 mg, en un tubo eppendorf y se agregó un mL de PBS para obtener una solución madre y hacer las diluciones pertinentes.

6.6. Evaluación de la actividad biológica

La línea celular HeLa y los linfocitos se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 2x10⁴ y 4x10⁵ células·mL⁻¹ respectivamente y se estimularon con diferentes concentraciones del extracto completo (0.04, 0.2, 0.4, 1.2 y 2.4 mg mL⁻¹), en las cuales *amarus silvestrys* progenitor de *S. edule* cultivar Perla Negra, mostró efecto antiproliferativo en la misma línea celular; las concentraciones para las microesferas cargadas fueron de 5, 10, 15 y 20 µg mL⁻¹. Se co-cultivaron por 72 h y 48h respectivamente.

La proliferación celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta. Se fijaron con glutaraldehído al 1 % durante una hora, después se adicionó una solución de cristal violeta (Sigma, St. Louis Missouri, USA) para colorear el núcleo celular (Kueng *et al.*, 1989), como

método indirecto para cuantificar el número celular (Gillies *et al.*, 1986); las placas se agitarán por 10 min (Labnet International Inc. Woodbridge, USA). En seguida se agregó en cada pozo ácido acético al 10 %, agitándolo durante 20 min para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células se evaluará a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Spectra Tecan Image, Austria). Se realizaron tres bioensayos con tres repeticiones cada uno. Para todos los bioensayos hubo un testigo absoluto sin extracto y un testigo positivo a base del antineoplásico comercial Cisplatino™ (0.72 µg mL⁻¹).

6.7. Identificación de compuestos en las fracciones que mostraron actividad biológica

La identificación de los compuestos que presentaron actividad biológica se realizó mediante Cromatografía de capa Fina (CCF) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC):

CCF: Para terpenoides se usó una placa de sílica de 20x20 cm. El sistema utilizado fue hexano:acetato de etilo:metanol (20:60:20) y como reveladores vainillina y ácido sulfúrico. Como estándares se usaron las cucurbitacinas B, D, E, e I, (Wagner y Bland, 2001). Para flavonoides se utilizó una placa de 10x10 cm. La fase móvil fue, acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua (100:11:11:26), y como agente cromogénico la mezcla de 2-aminoetil difenil-borinato:polietilén glicol (NP 1%:PEG 5%) (Wagner y Bland, 2001). Como estándares se usaron Ácido Cloragénico, Kamferol, Medicitina, Rutina y Quercitina.

HPLC: Para cucurbitacinas, Columna Symmetry Shield RP18 (4.6 x 250 mm), Análisis Isocrático, disolventes agua:metanol:acetonitrilo (50:30:20); flujo 1 mL min⁻¹; Presión 179 bares; temperatura 20 °C; volumen de inyección: 20 µL; λ 1:235 nm, y tiempo de análisis 50 min. Para flavonoides: Columna Hypersyl ODS (125 x 40 mm) Hewlett Packard. Disolventes A: H₂O pH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) B: ACN (acetonitrilo). Flujo 1 mL min⁻¹. Temperatura 30°C. Volumen de inyección variable y los estándares utilizados fueron Rutina, Florizidina, Miricetina, Quercitina, Naringenina, Florentina, Apigenina y Galangina.

6.8. Producción de microesferas conteniendo el extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra

Para la elaboración de las microesferas de los extractos en metanol de *S. edule* var. Perla Negra se usó el método propuesto por (Akbuga y Bergisadi, 1996) y modificada por Olivera (2010)

(comunicación personal), en el cual se trabajó con una emulsión agua- aceite (W/O), en dos fases; dispersa y continua. Es un método de coacervación en el cual se forma la mezcla del material encapsulante y el compuesto de interés. Posteriormente un cambio fuerza iónica provoca una fase de separación o coacervación de la cobertura y atrapamiento del material activo disperso. Finalmente la cobertura es solidificada por medio de un material entrecruzante para solidificar las microsferas (Sandoval *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2009). En el presente trabajo se utilizó como material encapsulante quitosano, como agente entrecruzante, glutaraldehído.

6.8.1. Preparación del quitosano

Se preparó una solución de quitosano al 15% con ácido acético al 5%. Se colocaron 100 mL del ácido acético en vaso de precipitados con capacidad de 150 mL y se agregaron 15g de quitosano de peso medio y se dejó en agitación en un agitador magnético por 8 h, posteriormente en un agitador digital a 1100 rpm por 10 h más. Transcurrido el tiempo de agitación se llevó al autoclave a 120°C y 15 psi por 15'. Finalmente se filtró en un embudo büchner con papel filtro (Wattman No. 3) conectado aun matraz quitazato utilizando una bomba de vacío con una presión de succión de 4 cm de mercurio.

6.8.2. Fase dispersa (fase orgánica: quitosano mas extracto)

Se pesaron 72.1 mg del extracto y se diluyeron con 300 µL de etanol al 96% y 700 µL de PBS (1mL). Se centrifugo por 2' a 10000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se mezcló con 9 mL de quitosano y se agitó en un vortex hasta que la mezcla fue homogénea. Se dejó reposar para posteriormente agregarla a la fase continua.

6.8.3. Fase continua (fase acuosa: inclusión del agente entrecruzante)

Se colocaron 450 mL de aceite de maíz (Mazola®) en un matraz de capacidad de 500 mL y se agregaron 3.75 mL de Spam 80 y se inició una agitación a 1100 rpm en un agitador digital. Se agregaron los 10 mL de la fase dispersa por goteo (una gota cada 10 s). Posteriormente se agregó el Glutaraldehído al 25%, por goteo en cinco secciones de 3 ml cada 15 min para hacer un total de 15 mL a una agitación de 850 rpm. La agitación se mantuvo por dos horas más. Pasado el

tiempo de agitación se dejó reposar por una hora. Este proceso se realizó con y sin extracto metanólico y sin y con sonicación en un sonicador Branson 8510 (Alemania).

6.8.4. Lavado y secado de microesferas

Este proceso se hizo a presión utilizando un embudo büchner y papel filtro (Wattman No. 3) conectado aun matraz quitazato conectado a una bomba de vacío con una presión de succión de 6 cm de mercurio. El lavado se inició con éter de petróleo para quitar el aceite y posteriormente se lavó abundantemente con agua para eliminar el glutaraldehido. Las esferas que se produjeron, se lavaron y fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente.

6.9. Caracterización de las microesferas

Utilizando el microscopio óptico y con Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) (Joel JSM-6390 y FEI QUANTA FEG 250) se realizó la observación de las microesferas obtenidas para su caracterización morfológica y tamaño de la micropartícula. Como una prueba preliminar para hacer una aproximación de estas características, utilizó una cámara digital (Moticam X2 Motic®) acoplada al microscopio óptico.

Para la observación en MEB las muestras tendrán que pasar por una serie de pasos de la siguiente manera (Bozzola and Rusell, 1998)

- 1.- Fijación con glutaraldehido
- 2.- Deshidratación gradual con OH
- 3.- Secado de punto crítico. Mediante la inyección de CO₂
- 4.- Se coloca en un porta muestra con una cinta doble cara para que quede adherida a este.
- 5.- Se mete al ionizador de metales para bañar la muestra con oro
- 6.- Ya cubierta la muestra se observa en el microscopio.

Todos estos pasos ser realizan con las muestras que contienen un porcentaje de humedad, en el caso de las microesferas, solo se realizará la colocación en el portamuestra y el baño de oro para posteriormente realizar la caracterización morfológica.

6.10. Pruebas de liberación

Se utilizó el espectrofotómetro (SPECTRONIC[®] Genesys[™] 5 E.U.A) con una absorbancia de 320 nm, y para la lectura de las muestras se usaron como testigos: suero fisiológico (pH 7.2), las microesferas vacías y una solución de 20µm mL⁻¹ del extracto en metanol, estos últimos usando como diluyente el suero fisiológico. Se pesaron 50 mg de esferas en matraces Erlenmeyer de 25 mL y se agregaron 10 mL de suero fisiológico, estos se dejaron en reposo y se tomó una muestra de 3mL para su lectura en el espectrofotómetro cada 10 min.

6.11. Análisis estadístico

Todos los bioensayos fueron realizados con tres repeticiones de manera independiente y por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey a P<0.5 utilizando software SAS Institute versión 9.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Rendimiento del extracto

El porcentaje de rendimiento del extracto en metanol obtenido de *Sechium edule* cultivar Perla Negra, con respecto al peso seco fue de 7.48% después de la extracción. Equivalente a 78.302 g de extracto crudo; el cual al ser fraccionado, registró una composición de 27.53 g de terpenos distribuidos en 17 fracciones y 32.85 g de flavonoides registradas en tres fracciones.

7.2. Pruebas preliminares cromogénicas

Las pruebas preliminares cromogénicas realizadas al extracto crudo metanol confirmaron la presencia de alcaloides y terpenos (Figura 11)

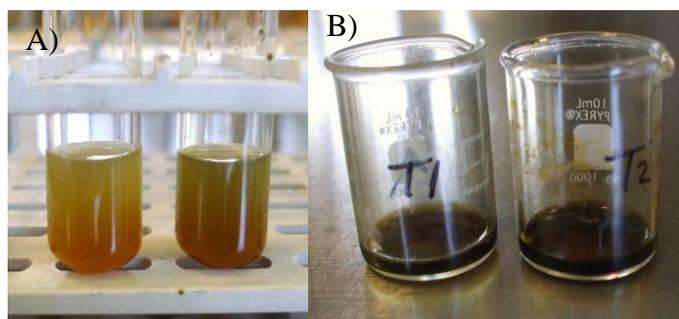


Figura 11. Prueba preliminar para alcaloides y terpenoides, se observa en A) la reacción colorimétrica de un precipitado color marrón (positiva para alcaloides) y en B) la intensificación de color, de café obscuro a negro, confirmando la presencia de terpenoides

7.3. Pruebas preliminares cromatográficas

Se confirmó la presencia de terpenos. Con respecto al grupo de alcaloides, aunque bajo luz ultravioleta de baja y alta frecuencia se pudo observar la posible presencia de estos compuestos, al revelar la placa con el reactivo de Dragendorff, no mostró el color esperado para este grupo (naranja) por lo que el resultado cromogénico se tomó como falso positivo (Figura 12).

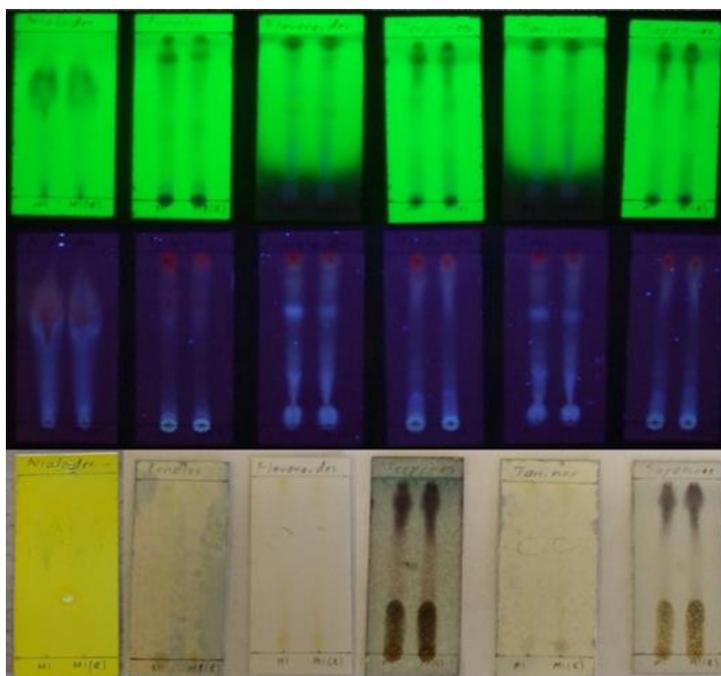


Figura 12. Cromatografías de capa fina observadas bajo la luz ultravioleta de onda corta (superiores), onda larga (medias) y reveladas (inferiores) mostrando, de izquierda a derecha, las placas para la detección de alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenoides, taninos y saponinas.

7.4. Fraccionamiento en Cromatografía en Columna

Se obtuvo un total de 210 fracciones. Estas por su semejanza de factor de retención (R_f) se fueron reuniendo, reduciéndose a 29 fracciones para terpenos, las cuales se corrieron en placas de silicagel de 20 x 20 cm para observar un mejor desplazamiento de los compuestos y hacer una última reducción en base al R_f observado en las fracciones, finalmente se obtuvieron 17 fracciones para terpenoides (Figura 13).

Al realizar el fraccionamiento de polaridades medias y altas (80:20-10:90 acetato de etilo: metanol), se realizó una prueba para rastreo de flavonoides, dando positivo, lo cual no sucedió en las pruebas preliminares; esto posiblemente, a que la concentración de terpenos impidió que fuera visible la fluorescencia de flavonoides. El seguimiento para flavonoides dió un total de 11 fracciones, las cuales finalmente por su comportamiento en el R_f se reunieron quedando un total de 3 fracciones, a las cuales por secuencia de los terpenos se les designó como fracciones 18, 19 y 20 (Figura 14).

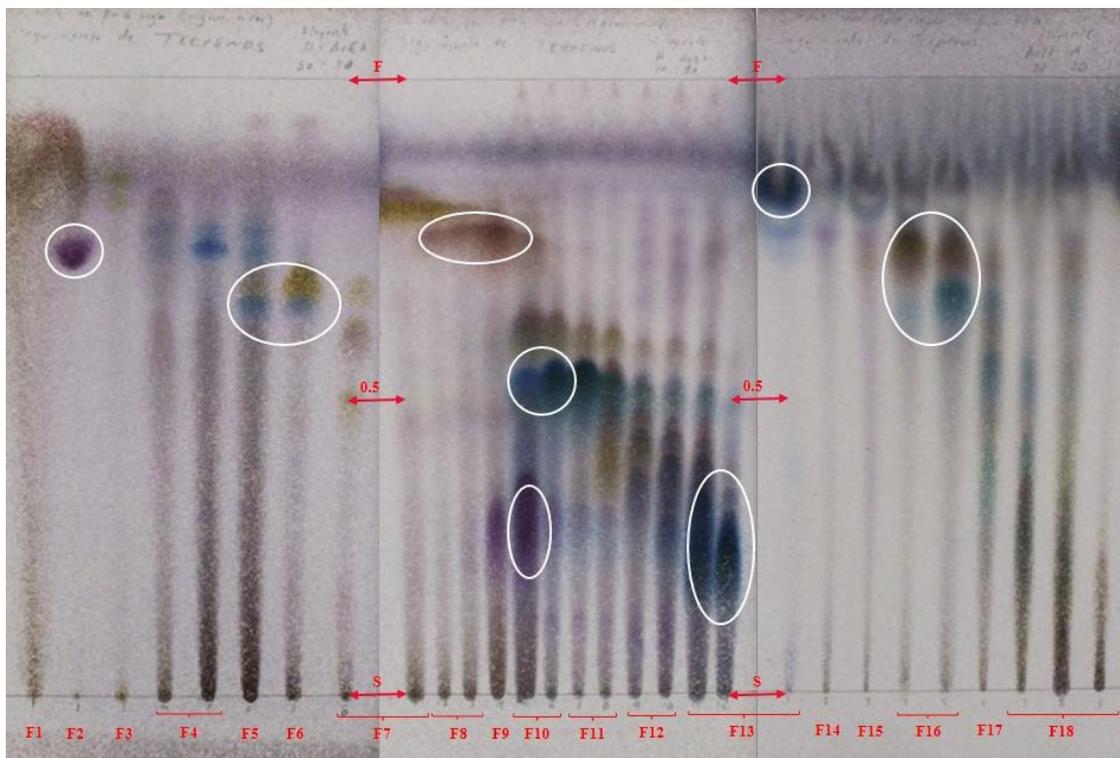


Figura 13. Cromatografías de las fracciones con seguimiento para terpenos, obtenidos en el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra.

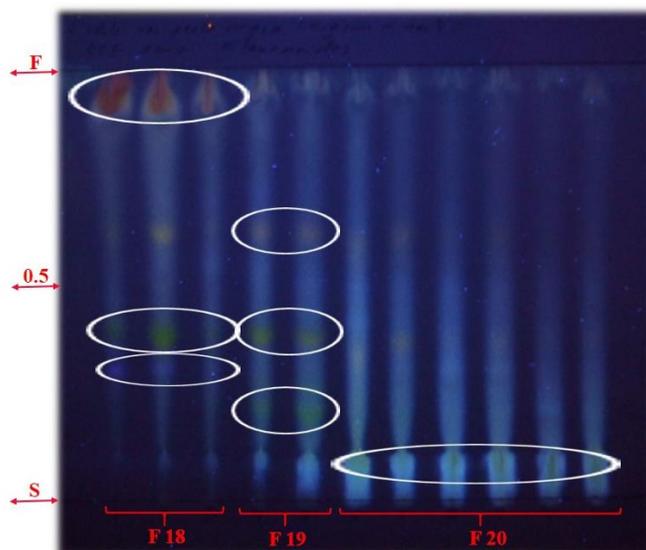


Figura 14. Cromatografía en capa fina de flavonoides presentes en fracciones del extracto de *Sechium edule* cultivar Perla Negra.

Con base a las cromatografías realizadas (CCF y CC) se confirmó que los metabolitos presentes en el extracto vegetal del cultivar Perla Negra, fueron terpenoides y flavonoides. Los terpenoides observados en la CCF se relacionan principalmente a terpenoides glicosilados (Gershenzon y Croteau, 1991), con base en coloración los cuales se mostraron desde la tonalidad azul marino, azul turquesa, café, marrón, morado, verde oscuro hasta el violeta y el valor de retención (Rf). Las tonalidades de color azul y rojo-violeta se relacionaron con cucurbitacinas (Wagner y Bland, 2001), compuestos que les confieren sabor amargo a los frutos (Salama *et al* 1986; Cadena *et al*; 2011). Respecto a los flavonoides, se observaron colores magenta, naranja, amarillo y violeta, relacionados a grupos químicos de flavonoles y flavonas (Wagner y Bland, 2001).

En otros grupos varietales de *S. edule* evaluados, tales como, *nigrum levis*, *nigrum xalapensis*, *nigrum spinosum* y *virens levis*, se ha registrado contenido de terpenos, mientras que los flavonoides se reportan en el grupo varietal *nigrum spinosum* e híbrido H-387 07 (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015).

7.5. Actividad biológica del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra

Las concentraciones propuestas inicialmente para el extracto (aquellas donde *amarus silvestrys* mostró su actividad biológica), inhibieron la proliferación de las células tumorales poco más del 80% (Figura 15). Por lo tanto, se hicieron las diluciones pertinentes y las concentraciones finales evaluadas fueron: **0, 1.25, 1.56, 1.85, 2.5, 5 y 10** $\mu\text{g mL}^{-1}$. Concentraciones dónde se encontró la IC_{50} del extracto de *S. edule* cultivar Perla Negra.

La evaluación en HeLa, mostró que existe una relación dosis dependiente (Figura 16 y 18), donde la IC_{50} fue de $1.85 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este dato es relevante al compararlo con la IC_{50} de su progenitor *amarus silvestrys* que fue de $1170 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalente a 632 veces menor.

El extracto de Perla Negra mostró ser más efectivo que el de su progenitor, inclusive más efectiva que los extractos de otros genotipos sobre la misma línea celular como: *nigrum spinosum* ($1800 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009), *nigrum spinosum*, *virens levis*, *amarus silvestrys*, *nigrum xalapensis albus levis nigrum levis*, *albus minor* y *albus dulcis* con IC_{50} de

930, 500, 1170, 840,500, 880, 630, 1510 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013), de tal forma que el efecto biológico mostrado por Perla Negra, sugiere su uso como agente potencial anticancerígeno, debido a que su IC_{50} es menor al valor máximo de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ establecido por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos (Boik, 2001) para ser considerado como agente anticancerígeno.

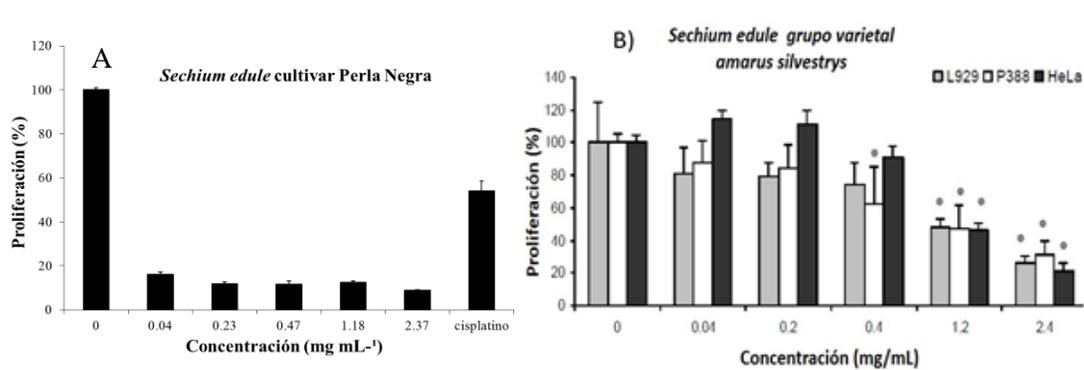


Figura 15. A) Inhibición de la proliferación de la línea celular Hela en presencia del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra con las concentraciones donde *Sechium edule* grupo varietal *amarus sylvestris* (progenitor) mostro actividad biológica. B) efecto antiproliferativo de *amarus sylvestris* sobre Hela, L929 y P388 (Cadena- Iñiguez *et al.*, 2013)

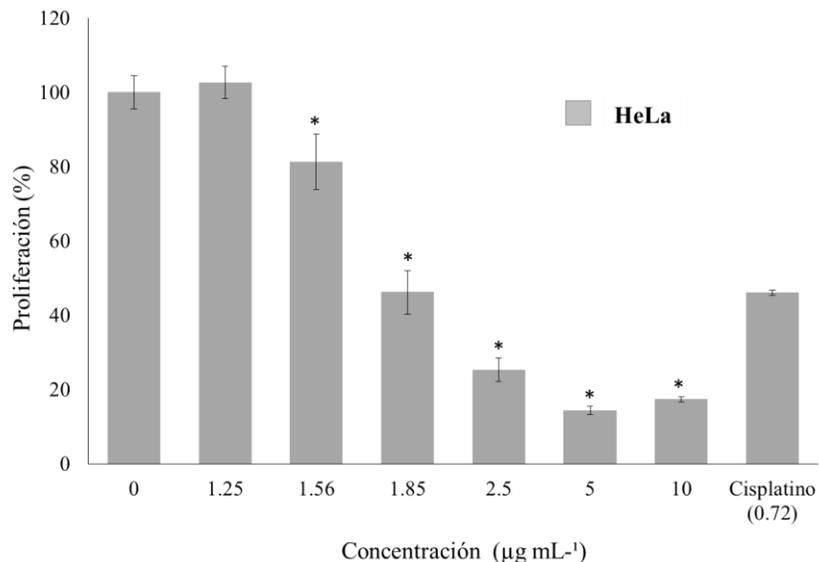


Figura 16. Porcentaje de proliferación de Hela estimulada con extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de $n=9$. * Diferencia significativa respecto al control y prueba de Tuley ($P \leq 0.05$)

El extracto en metanol no afectó la proliferación en linfocitos (Figura 17).

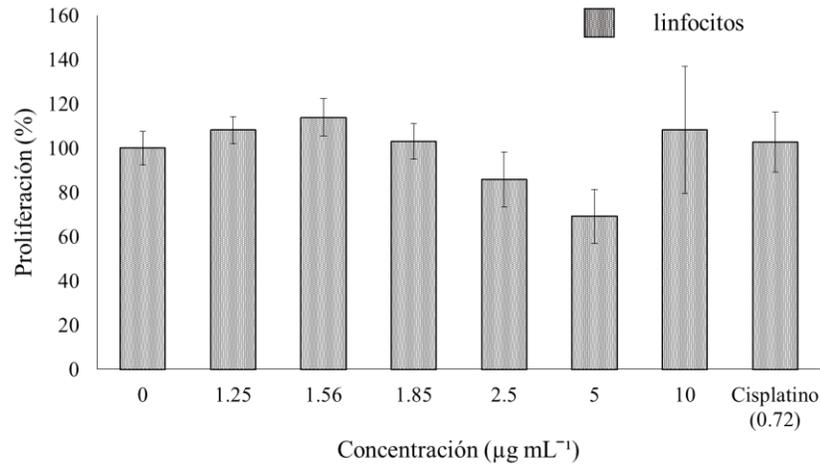


Figura 17. Porcentaje de proliferación de linfocitos, estimulados con concentraciones del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de $n=9$

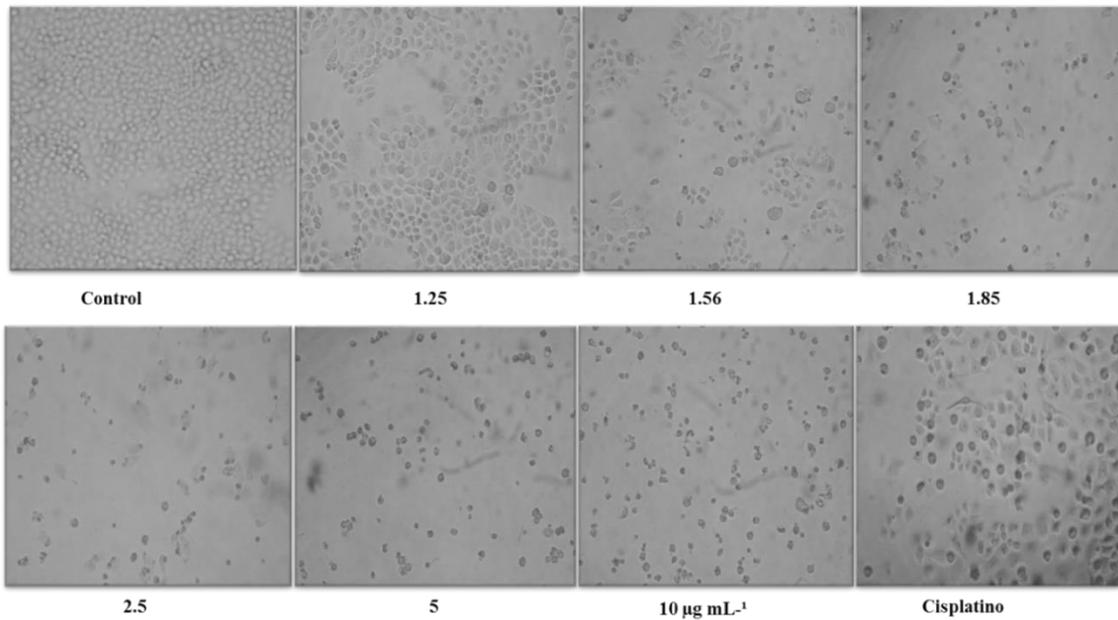


Figura 18. Efecto de inhibición celular de diferentes concentraciones del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra vista en el microscopio de luz (10X). Donde se aprecian oquedades como evidencia de la inhibición de la proliferación y células muertas flotando en el medio en las concentraciones más altas.

7.6. Actividad biológica de las fracciones del extracto en metanol del cultivar Perla Negra

Para realizar los bioensayos con las fracciones obtenidas se procedió de la misma manera que con el extracto crudo. Para determinar la concentración a evaluar, se realizó un ajuste de la IC_{50} por medio de una regresión lineal simple (Figura 19) determinando que la IC_{50} estadística fuera la concentración para realizar los ensayos biológicos con las fracciones obtenidas del extracto metanólico.

La IC_{50} calculada fue de $2.11 \mu\text{g mL}^{-1}$, al realizar el bioensayo con esa misma concentración se incluyó el extracto en metanol para verificar que no existiera diferencia significativa en el efecto biológico, también se agregó un “pool” que fue la conjunción de las 20 fracciones finales obtenidas.

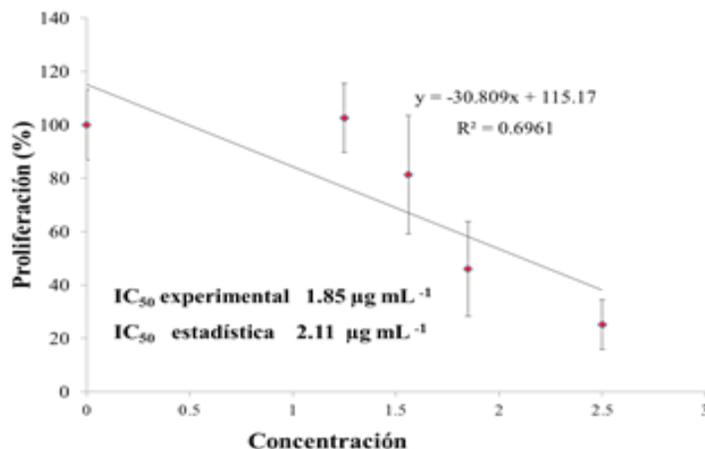


Figura 19. Concentración Inhibitoria media (IC_{50}) experimental y ajustada sobre la proliferación en la línea celular cancerígena (HeLa) tratada con el extracto en metanol de cultivar Perla Negra

Respecto al efecto biológico de las fracciones sobre HeLa se observó que las fracciones F1 y F19 no inhibieron el crecimiento celular, las fracciones F2, F5, F6, F14, F17 y F20 mostraron un bajo porcentaje de inhibición (2, 1, 9, 36, 13 y 9% respectivamente) y en contraste, las fracciones F3 y F4 promovieron la proliferación celular 6 y 4 % más que el control, respectivamente. El efecto de inhibición celular significativo se presentó con las fracciones F7 al F13, F15, F16 y F18 con los siguientes porcentajes F7:76, F8:87, F9:84, F10:86, F11:88, F12:90, F13:86, F15:64, F16:86 y F18:82%. Se observó, además, que al mezclar todas las fracciones (pool), el porcentaje del

efecto antiproliferativo fue de $89\% \pm 0.19$, superior a todas las fracciones, excepto a la F12. Además el valor de inhibición celular del control positivo a base de Cisplatino™, fue inferior a diez fracciones del extracto y el porcentaje de inhibición de proliferación con la concentración de $2.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ para extracto en metanol fue también del 50% (Figura 20).

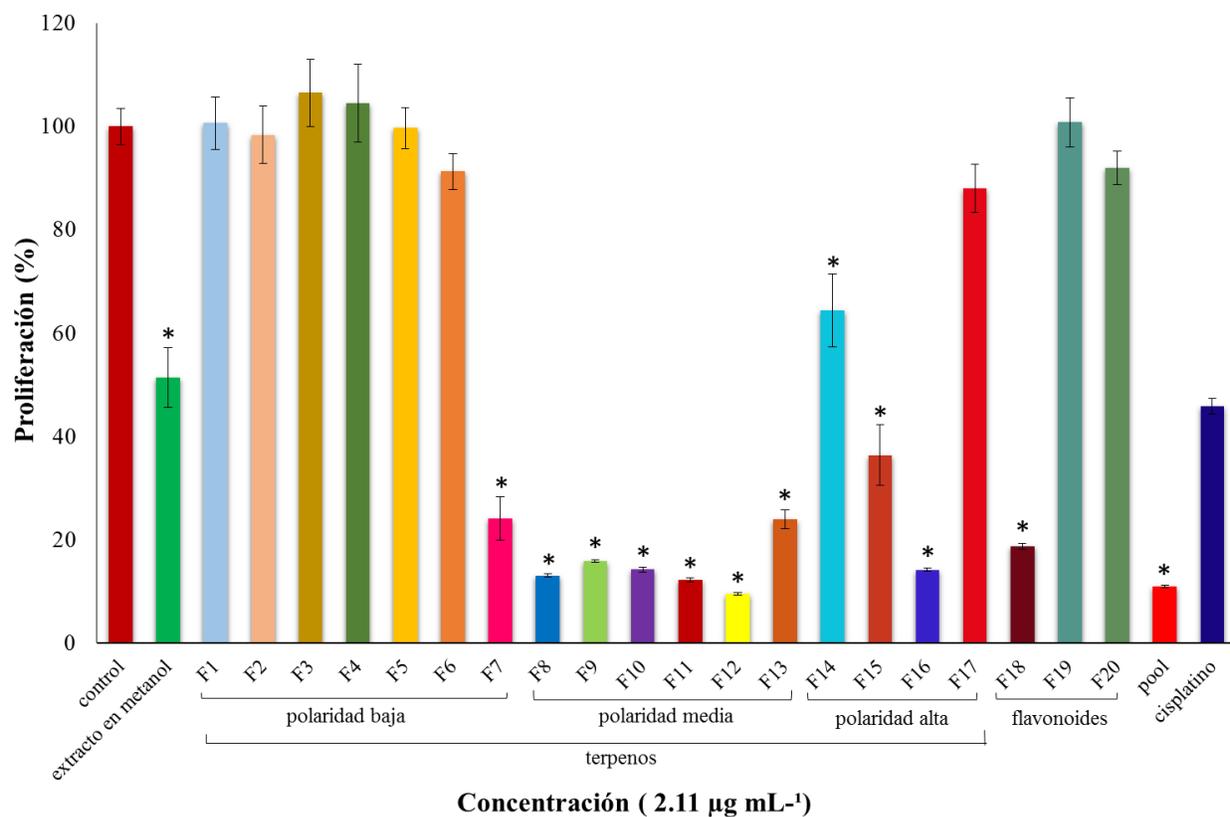


Figura 20. Inhibición de proliferación de células HeLa estimuladas con las fracciones del extracto y el pool de las fracciones del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra. Las barras indican \pm error estándar de $n=9$. * Diferencia significativa con base en el control y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Es notorio que la mezcla disolvente para el fraccionamiento químico del extracto con mayor actividad antiproliferativa fue hexano:acetato de etilo, atribuido a su mediana polaridad y mayor afinidad con terpenos. Es importante puntualizar que la suma de fracciones no es equivalente al

efecto del extracto completo debido al uso de distintos disolventes en su fraccionamiento, ya que estos arrastran las impurezas del extracto, purificando, así, los compuestos contenidos en las fracciones. También se puede observar en la Figura 23 que el fraccionamiento del extracto con mezclas de baja y alta polaridad (hexano:acetato de etilo 50:50, acetato de etilo:metanol 20:80), no reflejan la presencia de compuestos bioactivos como los terpenos afectando la actividad biológica antiproliferativa.

El grupo varietal de *S. edule*, *nigrum spinosum*, también mostró actividad antiproliferativa sobre HeLa, evaluando tres fracciones (Fr. 5-7, Fr.18-20 y Fr. 39) obtenidas del extracto en metanol. Las concentraciones evaluadas fueron de 230, 470, 1180 y 2370 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se observó que el mayor porcentaje de inhibición celular fue para Fr. 5-7 con una concentración de 470 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (80%), para Fr. 18-20 las concentraciones de 470 y 1180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con el 55% y Fr. 39 con la concentración de 2370 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el 58% (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009), concentraciones 222, 559 y 1123 veces más altas que la IC_{50} de perla negra Perla Negra.

Esta situación sugiere que no todos los genotipos de *S. edule* actúan igual, y que acciones de mejoramiento genético para desarrollar cultivares como el Perla Negra, pueden mejorar su rendimiento, composición química, y actividad biológica, como se aprecia al comparar la dosis dependiente de *n. spinosum* sobre la línea HeLa cuyas concentraciones de 47, 230, 470, 1180 y 2370 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fueron mayores desde veinte, hasta mil veces las evaluadas en Perla Negra.

La ocurrencia de cambios epigenéticos durante el cruzamientos e hibridación de las plantas (Xiong *et al.*, 1999; Bossdorf *et al.*, 2007), originan polimorfismos generando nuevos fenotipos con nuevas expresiones, las cuales se manifiestan como incrementos del potencial evolutivo (Richards, 2006), favoreciendo respuestas al ambiente, como el estrés abiótico (Lu *et al.*, 2007), de tal forma que dichos cambios pueden ser parcialmente estables y heredables en plantas (Jirtle and Skinner, 2007).

De esta manera se permitiría explicar porque el cultivar Perla Negra, expresa un potencial diferente en cuanto a la síntesis de metabolitos secundarios respecto a sus progenitores y

genotipos cercanos, y la expresión de cambios epigenéticos en el cultivar Perla Negra, lo que afectaría su expresión fenotípica y respuesta al ambiente, sin incidir directamente en el genoma, lo cual en *S. edule*, favorece la especialización adaptativa a cambios ambientales, mejorando el espectro de plasticidad (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008, 2011). Esta especie ha demostrado a través de su amplia variación intraespecífica, ser sumamente plástica, originando nuevas formas, ecotipos y grupos varietales, derivando novedades fenotípicas metaestables atribuidas a epialelos que pueden estar ampliando gradualmente la biodiversidad (Masuelli y Marfil, 2011).

7.7. Identificación de compuestos con CCF y HPLC

La identificación de compuestos con actividad biológica mediante la CCF mostró con base en el valor de retención (Rf) que la F7, F8 y F9 contenían cucurbitacina B (Rf 0.85) y cucurbitacina E (Rf 0.86), la F10, F11 y F12 cucurbitacinas D (0.76), E e I (0.82) y la F13 cucurbitacina E. Para F15 y F16 no se observó mediante este método el contenido de cucurbitacinas (Figura 21).

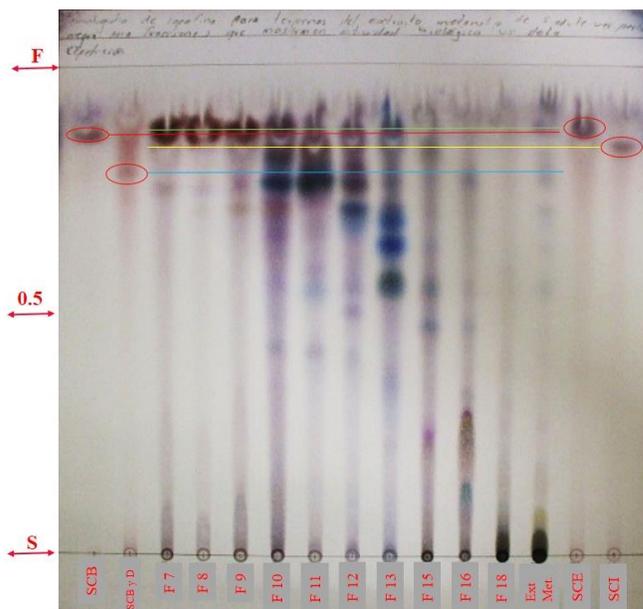


Figura 21. Identificación de cucurbitacinas en las fracciones con actividad biológica del cultivar Perla Negra, mediante CCF, incluidos los estándares de cucurbitacinas B, D, E e I

La cromatografía de líquidos (HPLC) (Figura 22), confirma los resultados de la CCF y aporta mayor información de la composición de todas las fracciones con actividad biológica y detecta

otros compuestos adicionales a los estándares de cucurbitacinas, dichos compuestos se observan en concentraciones altas pero no pudieron ser identificados. Sin embargo es probable que sean cucurbitacinas de las cuales no se tuvo el estándar o bien algún otro terpenos con un esqueleto químico muy parecido al de las cucurbitacinas.

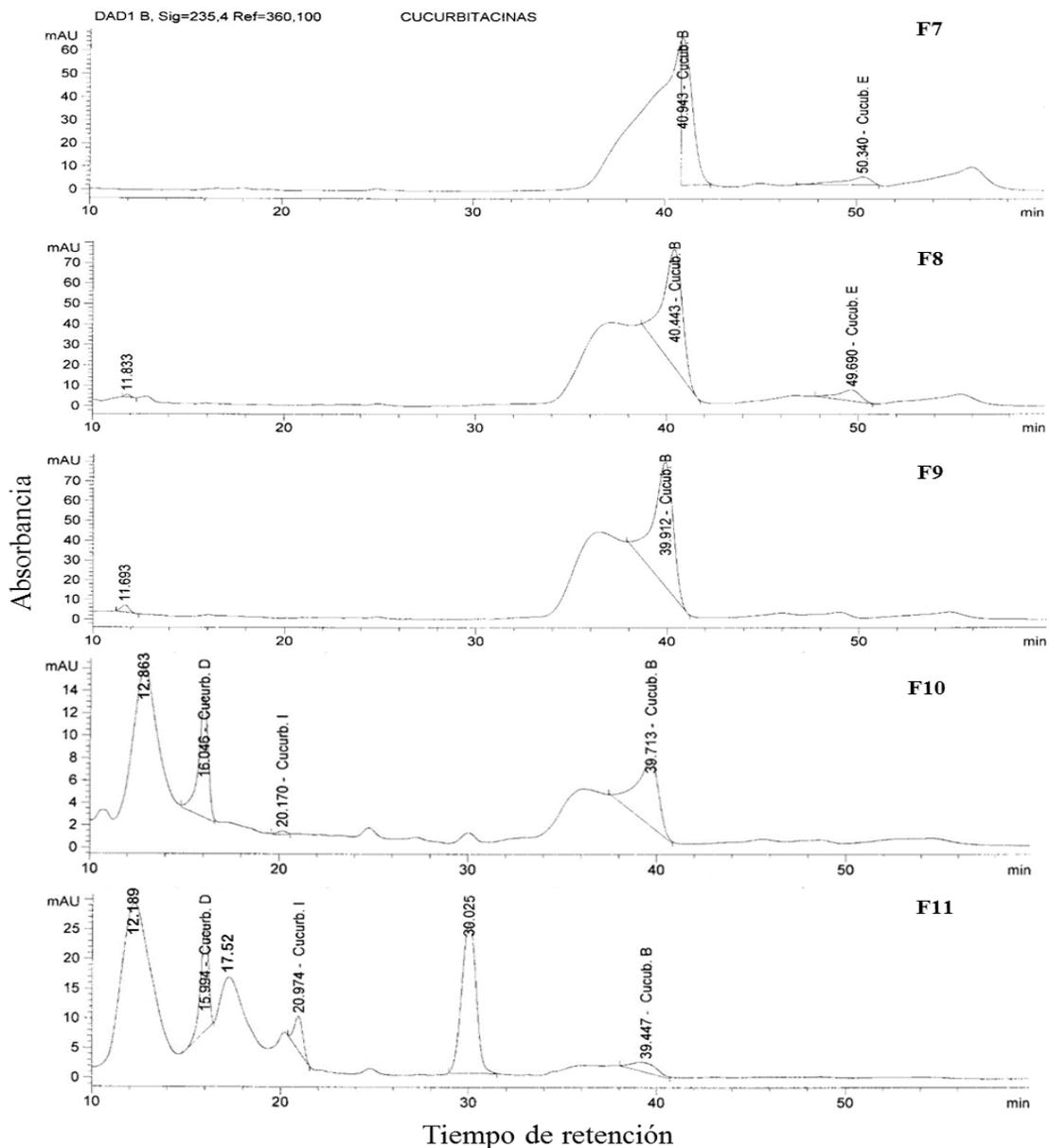


Figura 22. Cromatogramas de las fracciones con actividad biológica del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra obtenidos mediante HPLC

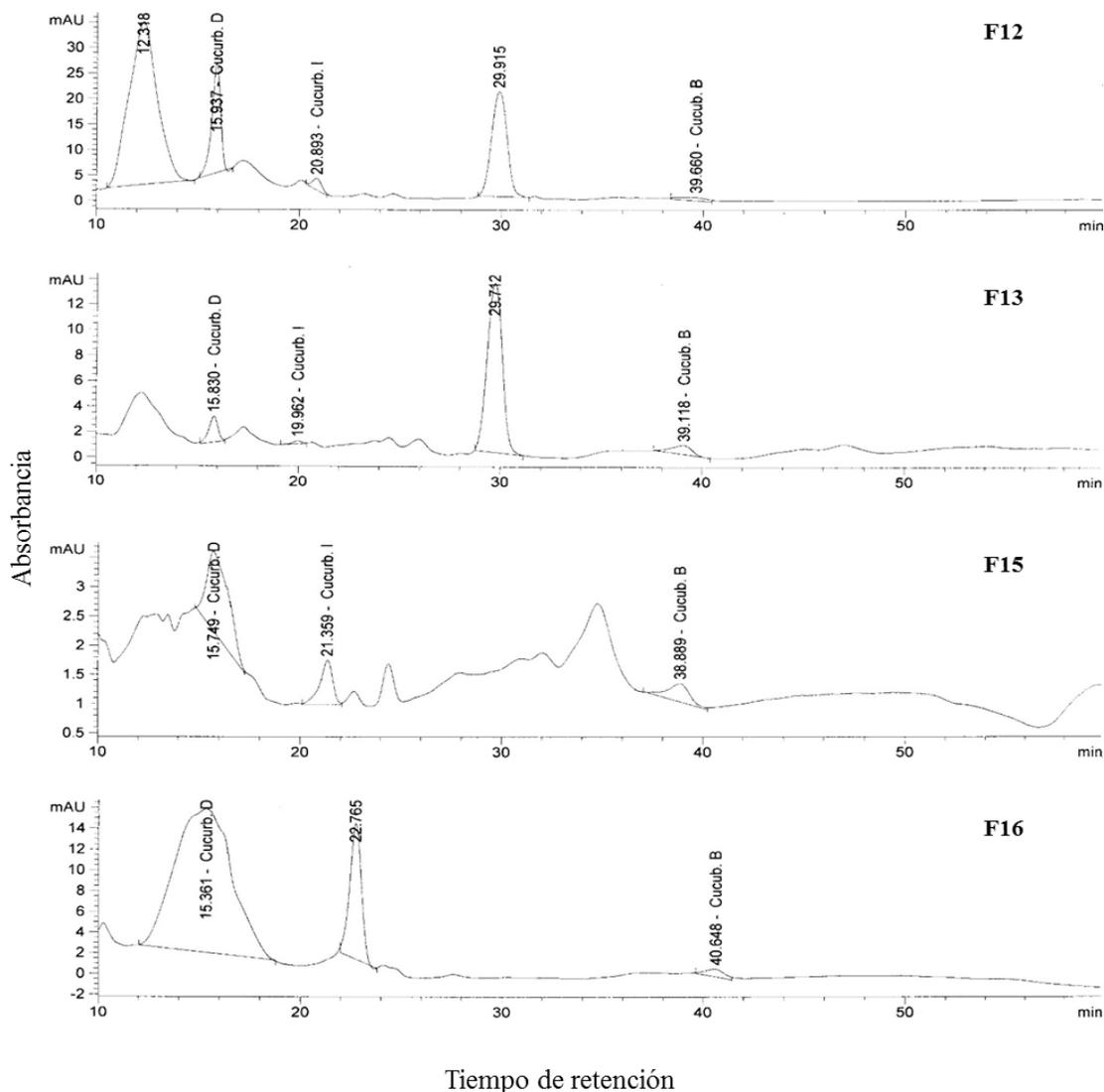


Figura 22. (continuación). Cromatogramas de las fracciones con actividad biológica del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra obtenidos mediante HPLC

Diferentes investigaciones reportan a los terpenoides con actividad antiviral, antibacterial, antihipertensiva, actividad antihiperlipidémica, contra parásitos, control de desórdenes de sistema nervioso central y con actividad anticancerígena (Brahmkshatriya and Brahmkshatriya, 2013).

La actividad biológica reportada para las cucurbitacinas identificadas en el las fracciones del extracto en metanol de Perla Negra son: para cucurbitacina D, actividad antiproliferativa *in vitro* en células humanas de carcinoma hepático, cáncer endometrial, y ovárico (Takahashi *et al.*,

2009; Ishii *et al.*, 2013), actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, de colon humano, próstata y mama (MCF-7) (Chao-Chen *et al.*, 2005), inducción de apoptosis *in vitro* en células humanas de carcinoma hepático (Takahashi *et al.*, 2009) e inhibición de crecimiento y del ciclo celular en células T de leucemia (Ding *et al.*, 2011).

Para cucurbitacina I efecto antiproliferativo *in vitro e in vivo* de cáncer nasofaríngeo (Lui *et al.*, 2009), citotóxico en la línea celular HeLa y KB (Chao-Chen *et al.*, 2005). A la cucurbitacina B le han atribuido un potente efecto inhibitorio en genes que actúan sobre diferentes rutas celulares que participan en la multiplicación celular (Chao-Chen *et al.*, 2005; Kapoor, 2013). La cucurbitacina E afecta la división celular, generando desorganización o rompimiento del citoesqueleto y actividad inhibitoria del carcinoma de próstata *in vitro* (Chao-Chen *et al.*, 2005).

El rendimiento de cucurbitacinas identificadas indica que la cucurbitacina D es la de mayor concentración, seguida de la B, E e I, como se puede observar en el Cuadro 4. Con respecto a la identificación de los compuestos para la fracción de flavonoides, la CCF indicó que la tiene cuatro tipos de flavonoides, uno de color magenta, el cual coincidió con el estándar de quercitina (Rf 0.95), el amarillo al estándar de rutina (Rf 0.35) y uno azul y otro naranja, los no tuvieron coincidencia con ningún estándar (Figura 23).

La identificación de flavonoides mediante HPLC, mostró coincidencia con la CCF. Se identificó Rutina y Quercetina (flavonoles), mostrando además información importante respecto al contenido de flavonoides, ya que se identificaron seis flavonoides más, pertenecientes al grupo de flavonas como Apigenina, compuesto reportado con anterioridad en frutos de *Sechium edule* por Siciliano *et al.* (2004), y flavononas como Naringenina entre ellos y también se observan picos de compuestos con concentraciones altas que no pudieron ser identificados (Figura 24).

Cuadro 4 Rendimiento (mg) de cucurbitacinas en nueve fracciones del extracto en metanol del fruto del cultivar de *Sechium edule*, Perla negra, con actividad biológica sobre HeLa

Fracción	Cu B	Cu D	Cu E	Cu I
F7	4.723		6.7621	
F8	6.94		7.7583	
F9	3.9365			
F10	0.7411	10.0779		
F11	0.2774	19.6135		5.4906
F12.	0.0691	20.1076		1.3317
F13	0.0422	1.0151		
F15		2.0717		0.1352
F16	0.12	234.4876		
Concentración en 10 g (extracto en metanol)	16.8493	287.3734	14.5204	6.9575
Concentración en 1 g (peso seco)	0.130	2.2447	0.112	0.537
Concentración en 1 kg (peso seco)	130.0167	2244.7691	112.2081	53.7594

Cu B: cucurbitacina B, Cu D: cucurbitacina D, Cu E:cucurbitacina E, Cu I:cucurbitacina I

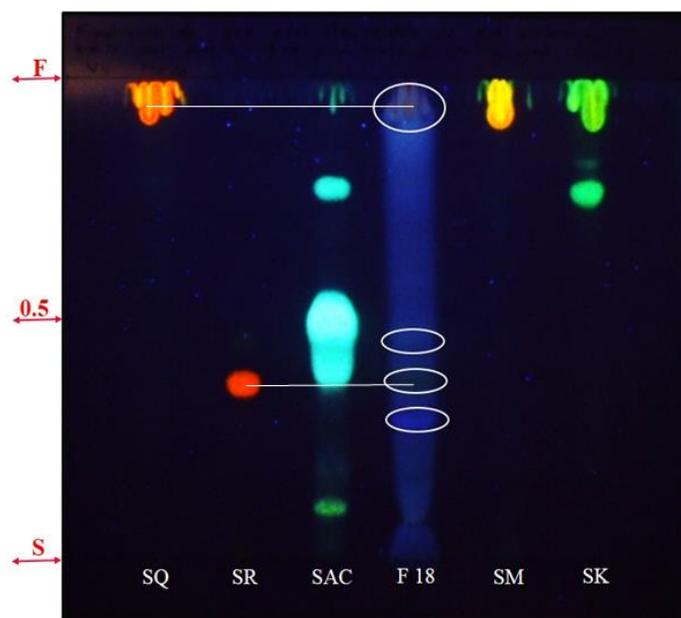


Figura 23. Identificación de la presencia de flavonoides en la fracción del extracto en metanol del cultivar de *Sechium edule* Perla Negra mediante Cromatografía en Capa Fina.

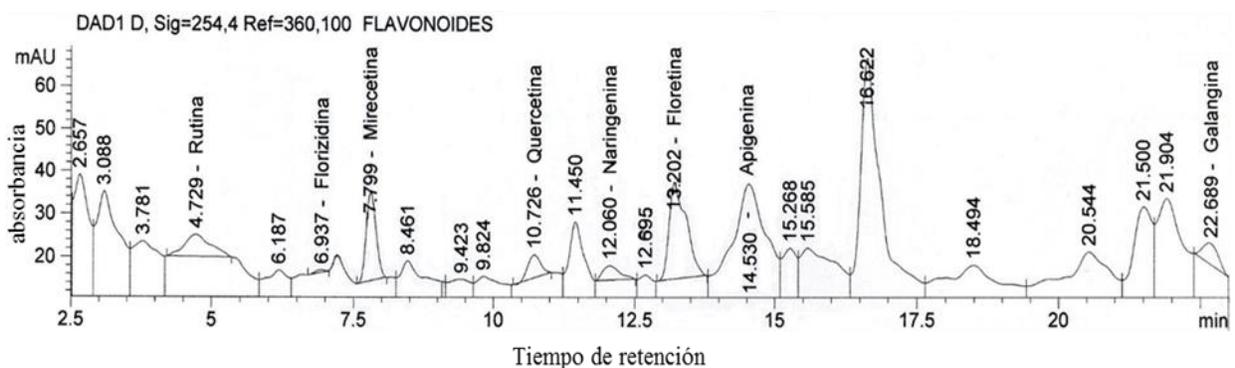


Figura 24. Cromatogramas de HPLC de la fracción de flavonoides que mostraron actividad biológica, obtenida del extracto metanólico del cultivar Perla Negra mediante cromatografía en columna, donde se confirma la presencia de ocho tipos de flavonoides (flavonoles, flavonas y flavononas) y otros no identificados

El rendimiento de los flavonoides identificados se muestra en el Cuadro 5, en el cual se observa que el flavonoide Floretina es el que se encuentra con mayor concentración y la Rutina con la de menor concentración. Cabe mencionar que, aunque la Florizidina y Apigenina fueron identificados la concentración no pudo ser calculada.

Cuadro 5. Rendimiento (mg) de los flavonoides encontrados en la F18 obtenida del extracto en metanol del cultivar de *Sechium edule*, Perla Negra, mediante CC, la cual mostró actividad antiproliferativa sobre HeLa

Fracción F18	Rutina	Miricetina	Quercetina	Naringenina	Floretina	Galangina
[] en 10 g (ext. en met.)	0.18731	20.0228	3.3543	19.1101	75.1013	33.190
[] en 1 g (peso seco)	0.018	2.0022	0.3354	1.9112	7.5103	3.319
[] en 1000g (peso seco)	18.7309	2002.20	335.435	1911.2609	7510.316	3319.00

[]: concentración, ext. en met.: extracto en metanol

Los flavonoides son compuestos que tienen un amplio uso en el área farmacológica para aliviar diferentes afecciones, estos se han usado como antialérgicos, antidepresivos, para el tratamiento de la trombosis, diabetes mellitus, enfermedades reumáticas, enfermedades cardiovasculares, úlceras gástricas, también han mostrado actividad antibacterial, antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, hepatoprotector y actividad anticancerígena (Cartaya y Reynaldo 2001; Nijveldt *et al.*, 2001; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Álvarez y Orallo, 2003; Kanadaswami *et al.*, 2005; Agrawal, 2011; Kaur *et al.*, 2011; Sandhar *et al.*, 2011; Kumar and Pandey, 2013) entre otras.

En diferentes trabajos *in vitro* se ha reportado la que Quercetina, tiene efectos inhibitorios en diferentes líneas celulares como cáncer de colon, de mama, ovárico, gastrointestinal, (Martínez-Flórez *et al.*, 2002), linfoma (L1210) y leucemia (P-388). También se ha reportado que la Quercetina polihidroxilada ejerce un potente efecto de inhibición de crecimiento en las líneas celulares cancerígenas como HeLa, cáncer de estómago, de colon, de mama, ovárico, de hígado humano y células humanas de cáncer de páncreas (Kanadaswami *et al.*, 2005).

En otros grupos varietales de *S. edule* evaluados, tales como, *nigrum levis*, *nigrum xalepensis*, *nigrum spinosum* y *virens levis*, se ha registrado el contenido de terpenos, mientras que los flavonoides se reportan en el grupo varietal *nigrum spinosum* e híbrido H-387 07 (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015). Cabe mencionar que de los ocho flavonoides identificados en F18 solo uno se había reportado con anterioridad, por lo tanto siete de estos son nuevos reportes para este cultivar.

7.8. Caracterización de productos obtenidos de la microencapsulación del extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra

Mediante el método de coacervación y con base en la literatura para el tipo de morfología para los productos de la microencapsulación (Lopretti *et al.*, 2007) se obtuvieron con ayuda de un microscopio de luz lo siguiente: sin aplicación de sonicación microcápsulas y con la aplicación de sonicación microesferas (Figuras 25 y 26).

El peso de las microcápsulas obtenidas fue de 2.746g y de las microesferas 1.740g, obteniendo así un rendimiento de 24.96% y 15.81% respectivamente.

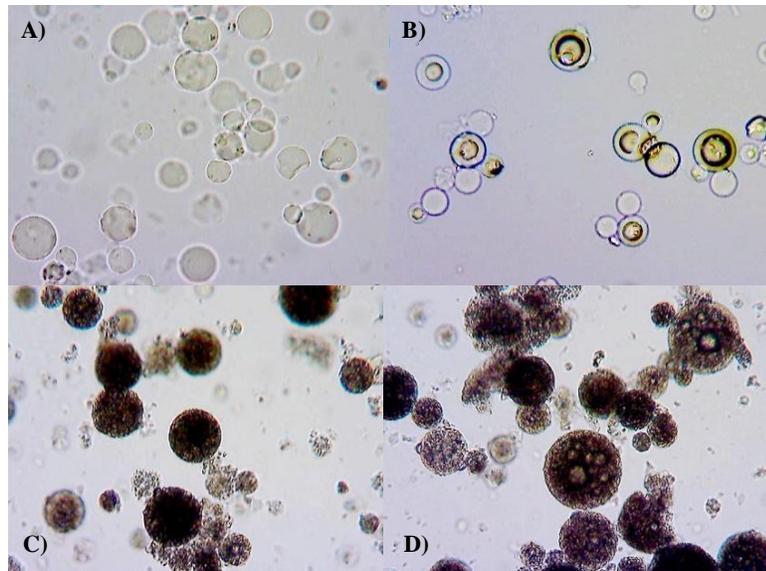


Figura 25. Microcápsulas observadas en el microscopio óptico (10X). Sin sonicación A) microcápsulas sin extracto, B) microcápsulas con extracto. Con sonicación, C) microesferas sin extracto; D) microesferas con extracto)

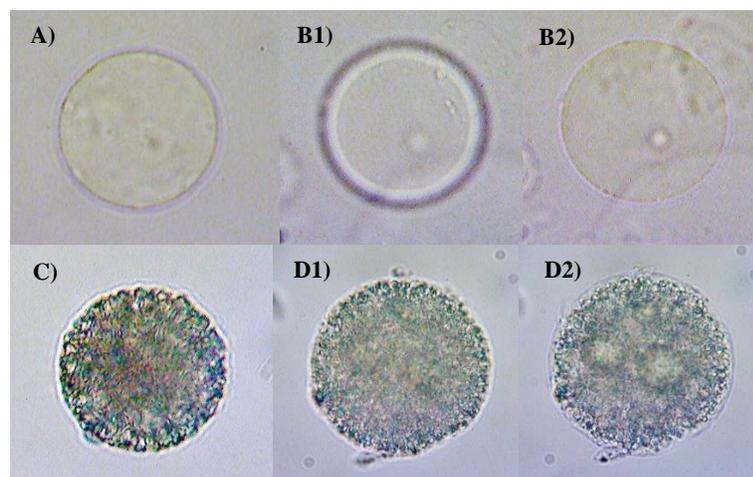


Figura 26. Detalle de microcápsulas y microesferas en un microscopio de luz (40X). A)Microcápsula sin extracto. B1 y B2)Microcápsula con extracto en enfoque diferentes. C)Microesfera sin extracto D1 y D2) Microesfera con extracto en diferentes enfoques.

7.9. Caracterización de las microesferas mediante el MEB

Las microcápsulas se observaron con forma esférica, superficie lisa y compacta. También se observaron conglomerados y el tamaño diámetro de las mismas fue 7.8-37.2 μm (Figura 27).

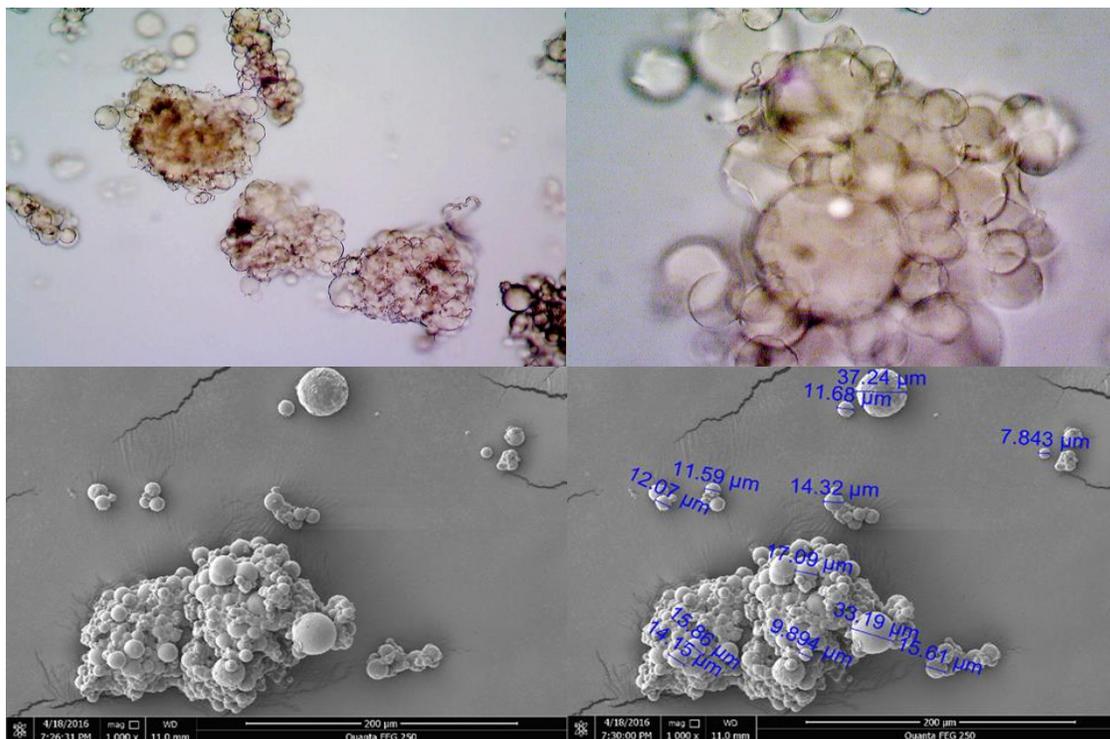


Figura 27. Morfología y tamaño de microcápsulas con extracto de *Sechium edule* cultivar Perla Negra, observadas en el microscopio de luz (imágenes superiores) y en el Microscopio Electrónico de Barrido (imágenes inferiores) donde se observa el intervalo de tamaños y los agrupamientos formados.

Las microesferas se observaron de forma esférica bien definida, la superficie compacta con pequeñas protuberancias redondeadas. Se observaron menos formaciones de conglomerados, la estructura interna se observa porosa (Figura 28). El tamaño de las partículas se encuentran en un rango de 13.3-52.7 μm . (Figura 29).

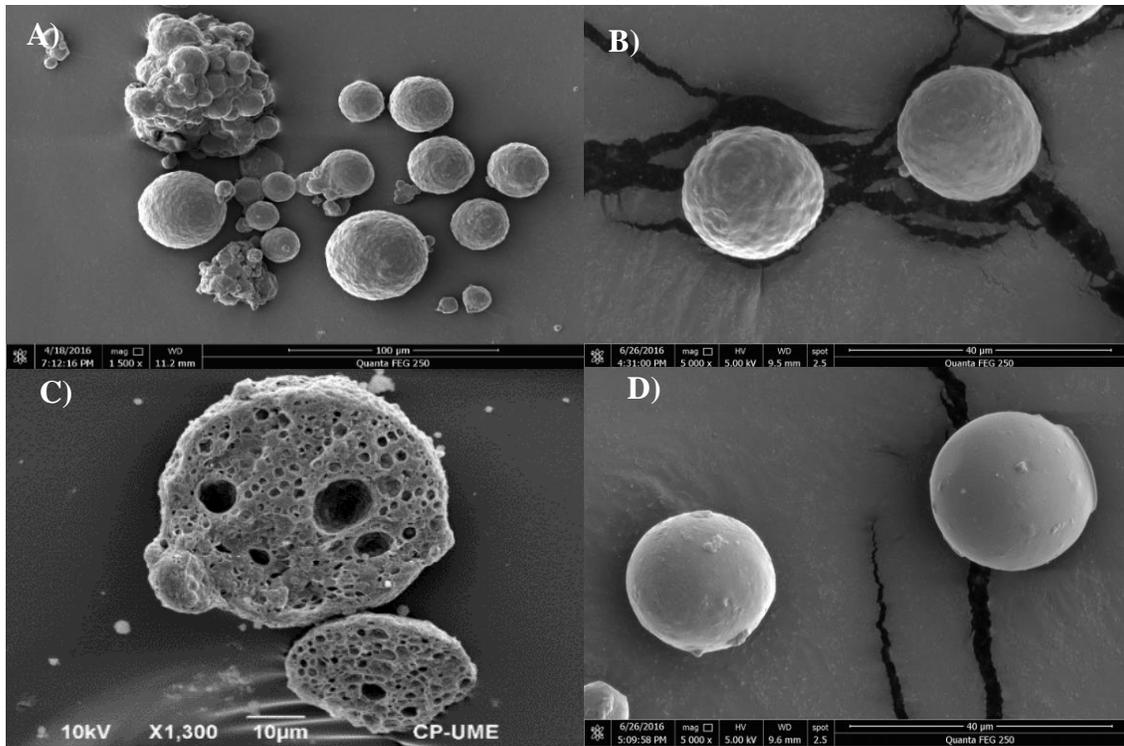


Figura 28. Morfología de las microsferas con extracto de *Sechium edule* cultivar Perla Negra. A) Algunas formaciones de conglomerados, y las microsferas dispersas, B) detalle de las microsferas. C y D) estructura interna y externa de microsferas vacías.

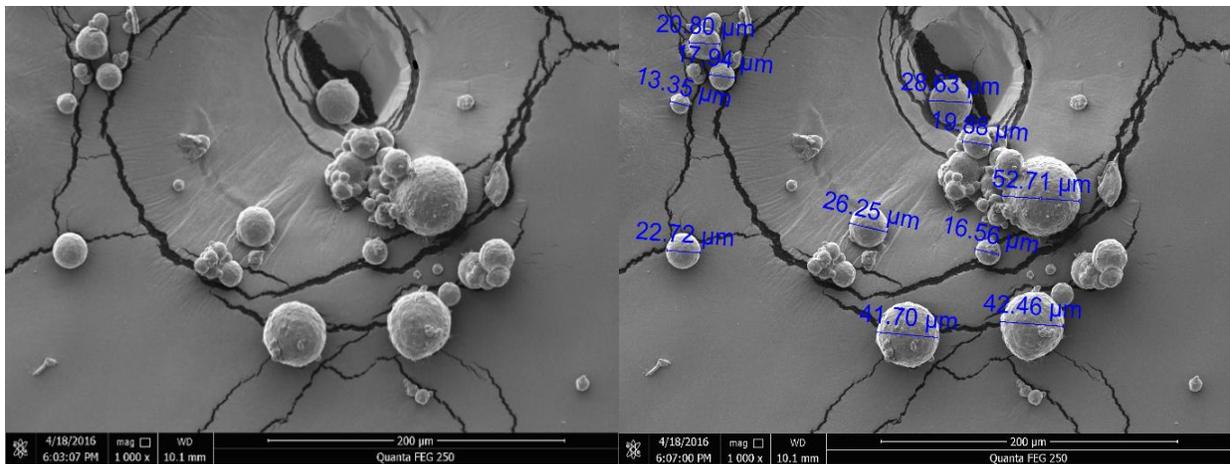


Figura 29. Tamaño de las microsferas con extracto de *Sechium edule* cultivar Perla Negra, visto en un Microscopio Electrónico de Barrido.

Autores como Lopetri *et al.* (2007) y Olivera *et al.* (2012) siguiendo el mismo método de microencapsulación (coacervación), obtuvieron también microesferas con estructura bien definida y un rango de tamaño de 2-30 μm y 1-20 μm respectivamente. Quizá esta diferencia en el tamaño es debida a la agitación utilizada en el proceso, ya que este evento es importante para la formación de las microesferas. Sin embargo en ambos métodos reportados en ambas investigaciones no se mencionan las revoluciones por minuto utilizadas para la formación de las microesferas. Por lo tanto se recomienda en futuras investigaciones realizar pruebas con una agitación mayor, para obtener microesferas de menor tamaño, para ampliar su aplicación como vehículo o excipiente en diferentes vías de administración.

7.10. Pruebas de liberación y eficiencia de carga

Las pruebas de liberación con las microcápsulas no se realizaron debido a que, como se mencionó anteriormente se encontraban conglomeradas, lo que dificulta su manejo y los resultados pueden tener un rango de error mayor. Con las microesferas se realizaron lecturas de absorbancia hasta 48 h después de estar inmersas en PBS, tiempo en el cual las microesferas liberaron su contenido, observando que a las 24 h fué donde se observó la mayor concentración del extracto según las lecturas tomadas en el espectrofotómetro (Figura 30).

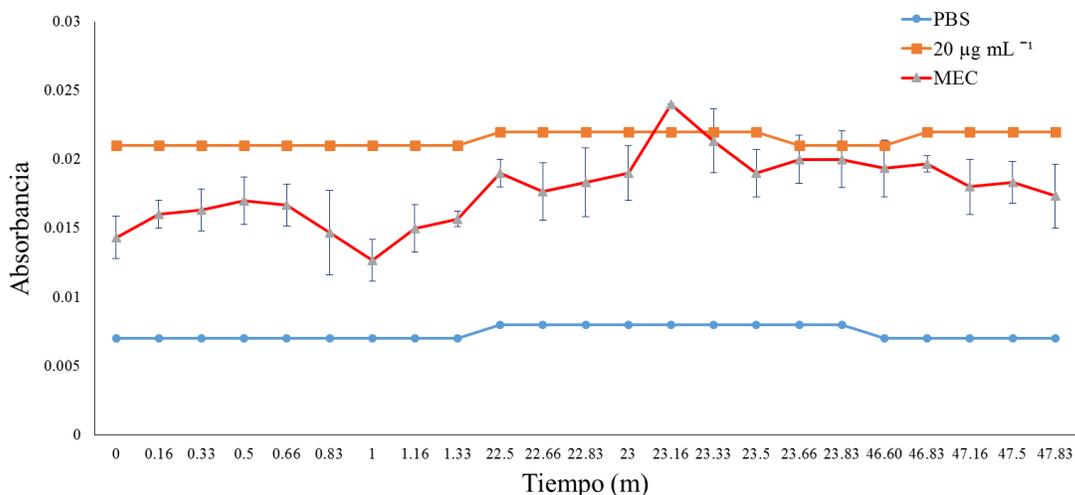


Figura 30. Gráfica de liberación del extracto en metanol *Sechium edule* Cultivar Perla Negra contenido en las microesferas. Barras indican la desviación estándar de $n=6$. (MEC=microesferas cargadas).

Para realizar el cálculo de la concentración del extracto que fue liberada por las microesferas se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones en la cual se hizo una intersección de las lecturas de la absorbancias obtenidas de las diferentes muestras de microesferas inmersas en PBS (pH 7.2) (Figura 31), donde se puede determinar que la menor concentración de extracto en metanol fue de $8.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante la primera hora y la mayor de $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 24 h.

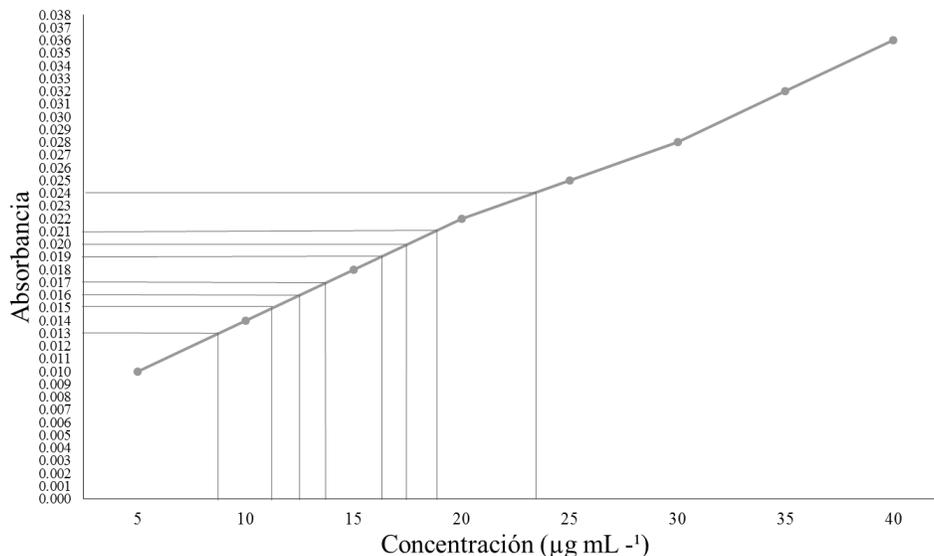


Figura 31. Curva de calibración de diferentes concentraciones conocidas de extracto en metanol de Perla Negra, donde se observa la intersección de las concentraciones obtenidas mediante las lecturas de absorbancia.

La eficiencia de la carga fue de 98%, un porcentaje mayor que lo reportado, con la fabricación de microesferas con la misma técnica por Lopetri *et al.* (2007) en la liberación de limoneno aunque no indican la concentración liberada pero mencionan que se presentó una rápida liberación y Olivera *et al* (2012), encapsulando ADN, teniendo una eficiencia de carga de 85 % y una concentración de liberación de $0.0056 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 140 min. Con base en estos resultado se observa que la eficiencia de carga y el tiempo de liberación del extracto en metanol fue mayor, comparado con los trabajos reportados por Lopetri *et al.* (2007) y Olivera *et al* (2012), lo cual puede indicar que hubo una compatibilidad mayor del material encapsulante con el compuesto a encapsular, lo cual, de igual forma es importante para lograr una buena estabilidad de las microesferas.

7.11. Evaluación de las microesferas sobre HeLa y linfocitos

La evaluación de las microesferas cargadas con el extracto en metanol de Perla Negra sobre las células HeLa, mostró una relación dosis dependiente (Figura 32), donde la IC_{50} fue de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculada por medio una regresión lineal simple) (Figura 33)

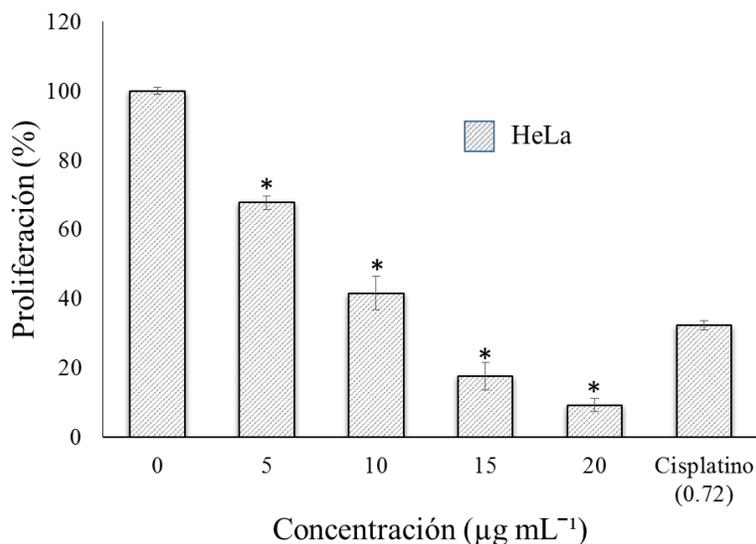


Figura 32. Inhibición de la proliferación de células HeLa, como efecto de la aplicación de microesferas cargadas con extracto en metanol de Perla Negra. Las barras indican el error estándar de $n=9$. *Diferencia significativa respecto al control y pruebas de Tukey ($P \leq 0.05$)

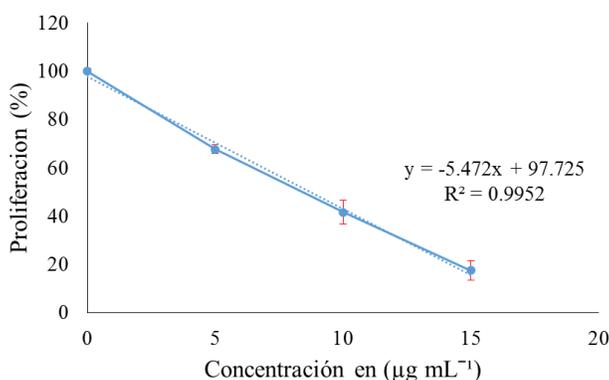


Figura 33. Regresión lineal simple para determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de las microesferas cargadas con extracto en metanol de Perla Negra con efecto antiproliferativo en HeLa.

La evaluación del efecto de las microesferas cargadas con extracto de Perla Negra sobre los linfocitos, indicó que estas células no se ven afectadas en su proliferación (Figura 34).

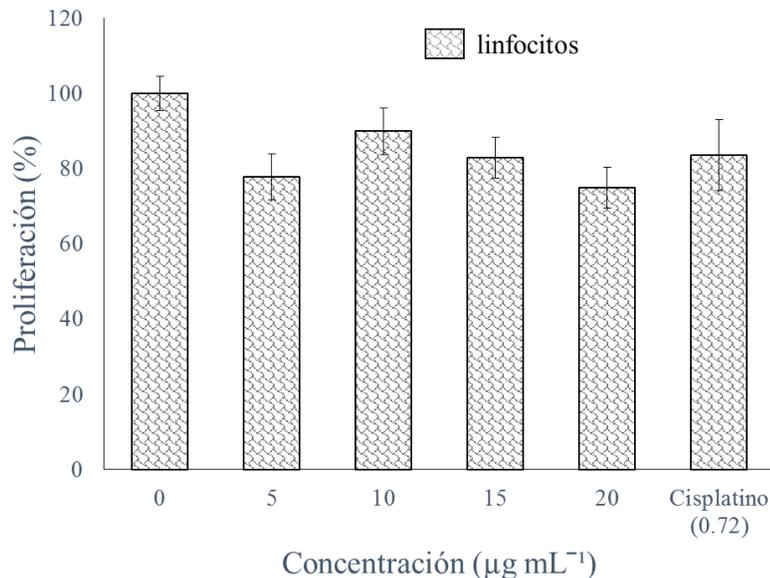


Figura 34. Proliferación de linfocitos estimulados con microesferas cargadas con extracto en metanol de *Sechium edule* cultivar Perla Negra, las barras indican el error estándar de $n=9$.

El quitosano es un polímero que ha sido frecuentemente usado como excipiente y agente encapsulante para la micro o nanoencapsulación con diferentes métodos (Tiyaboonchai, 2003) a una gran diversidad productos farmacéuticos (Agnihotri *et al.*, 2004) para ser aplicados en diferentes vías de administración (Shaji *et al.*, 2010), los cuales han tenido resultados satisfactorios para considerarlos como tratamientos prometedores para diferentes enfermedades.

Los resultados de la evaluación del efecto de las microesferas utilizando quitosano como material encapsulante y cargadas con el extracto en metanol de Perla Negra indica que las microesferas son específicas, debido a que la proliferación de linfocitos no se ve afectada, pero las células HeLa mostraron una inhibición hasta del 90% con la concentración más alta. Por lo tanto es un tratamiento prometedor para la lucha contra el cáncer, y a diferencia de los tratamientos convencionales o con costos más accesibles y sin efectos colaterales.

Se recomienda continuar con esta línea de investigación ya que hay poca información sobre productos naturales microencapsulados con propiedades antiproliferativas. Hacer algunos ajustes en la técnica para lograr partículas con tamaños menores a los mencionados en la caracterización de las microesferas.

Ajustar la técnica de evaluación de la proliferación celular, respecto al tiempo en que se deja actuar en las células ya que la técnica usada fue para evaluar su efecto a las 72 h, y sería óptimo hacer una evaluación a mayor tiempo para verificar si el efecto se presenta de la misma manera a mayor tiempo de exposición de la línea celular Hela a las microesferas.

8. CONCLUSIONES

- Se confirma la hipótesis
- La actividad biológica del progenitor fue heredada por el cultivar Perla Negra (IC_{50} $1.85 \mu\text{g mL}^{-1}$) y mostró un efecto inhibitorio 632 veces mayor que el de su progenitor *amarus silvestrys* (IC_{50} $1170 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre la línea celular HeLa.
- El extracto no afectó a los linfocitos.
- Las fracciones que mostraron una inhibición mayor al 80% (IC_{50} $2.11 \mu\text{g mL}^{-1}$) son las que contienen mayor diversidad de compuestos, incluido el pool.
- La capacidad de carga de las microesferas fue del 98%.
- La concentración máxima liberada fue de $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las 24 h.
- Las microesferas mostraron un efecto antiproliferativo con una IC_{50} estadística de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- Las microesferas no afectaron a los linfocitos.
- El efecto antiproliferativo mostrado por Perla Negra sugiere su uso como agente anticancerígeno potencial.

9. LITERATURA CITADA

- Afifi M. S., Ross S. A., Sohly M. A., Naeem Z. E., and Halaweish F. T. 1999. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chemical Ecology* 25(4): 847-859.
- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. and Aminabhavi T. M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100:5–28.
- Agrawal A. D. 2011. Pharmacological activities of flavonoids: A review. *Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 4(2):1394-1398.
- Aguñiga S. I. 2013. Potencial antileucémico *in vitro* de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco, Estado de México. 109p.
- Aguñiga-Sánchez I., Soto-Hernández M., Cadena-Iñiguez J., Ruíz-Posadas L. M., Cadena-Zamudio J. D., González-Ugarte A. K., Weiss-Steider B. y Santiago-Osorio E. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and Cancer* 0(0)1-8.
- Akbuga J., and Bergisadi N. 1996. 5-Fluorouracil-loaded chitosan microspheres: Preparation and release characteristics. *Journal of Microencapsulation* 13 (2):161-168.
- Alonso-Castro A., Villarreal M. L., Salazar-Olivo L. A., Gómez-Sánchez M., Domínguez F. and García-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133:945–972.
- Álvarez C. E. y Orallo C. F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm. Bioquímica* 22(10):130:140.
- Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W. y Hennink W. E. 2010. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62:59–82.
- Araneda B., C. y Valenzuela L. F. 2009. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Ciencia...Ahora* 22:9-19.
- Arango P. M del C., Llanes F. L., Díaz R. T. y Faxas G. M. E. 1997. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Instituto de Oncología y Radiobiología. *Revista Cubana de Oncología* 13(2):126-134.
- Avendaño A. C. H., Molina G. J. E. D., Moreno P. E. Cadena-Iñiguez J., Aguirre M. J. F., Rincón E. G. 2009. Respuesta a la selección para resistencia a sequía en maíz (*Zea mays* L.) *Interciencia*. 34(11):801-807.
- Avendaño-Arrazate C. H., Cadena-Iñiguez J., Arévalo-Galarza M. de L., Campos-Rojas E., Cisneros-Solano V. M., Aguirre-Medina J. F. 2010. Las Variedades del Chayote Mexicano, Recurso Ancestral con Potencial de Comercialización. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM), A.C. México. 88 p.

- Avendaño-Arrazate C. M., Cadena-Iñiguez J., Arévalo-Galarza M. L. C., Cisneros-Solano V. M., Morales-Flores F. J. Ruiz-Posadas L. M. 2014. Mejoramiento genético participativo en chayote. *Agroproductividad* 7(6):30-39.
- Baki D., E. and Ottenbrite R. M. 2006. Perspectives on: Chitosan drug delivery systems based on their geometries. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 21:351-368.
- Boik J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. Promising nontoxic antitumor agents from plants and other natural sources. Oregon Medical Press. Minnesota USA. p. 521.
- Bossdorf O., Richards C. L. and Pigliucci M. 2007. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*, 10: 1-10.
- Bozzola J. J. and Rusell L. D. 1998. *Electron Microscopy: principles and Techniques for Biologists*. 2a ed. Ed. Replika press Subbury MA. 675 p.
- Brahmkshatriya P. P. and Brahmkshatriya P. S. 2013. Terpenes: chemistry, biological role, and therapeutic applications. *Champer* 86. 2665-2691p. In Ramawat K: G: and J. M: Mérillon (eds). *Natural Products*. Springer-Verlag. Berlin.
- Cabané P., Alvo A., Neira-Carrillo A., Caviedes P. y Gac P. 2011. Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista Chilena de Cirugía* 63(1):110-113.
- Cadena-Iñiguez J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. México 156 p.
- Cadena-Iñiguez J., Arévalo-Galarza L., Avendaño-Arrazate C. H., Soto-Hernández M., Ruiz-Posadas L. del M., Santiago-Osorio E., Acosta-Ramos M., Cisneros-Solano V. M., Aguirre-Medina J. F. and Ochoa-Martínez D. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh Produce* 1(1):41-53.
- Cadena-Iñiguez J., Avendaño-Arrazate C. H., Soto-Hernández M, Ruiz-Posadas L. M., Aguirre-Medina J. F., and Arévalo-Galarza L. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* in the state of Veracruz, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 835-847.
- Cadena-Iñiguez J. y Arévalo G. M. L. 2010. GISeM: Rescatando y aprovechando los recursos fitogenéticos de Mesoamérica Volumen 1: Chayote. Grupo Interdisciplinario de investigación en *Sechium edule* en México, A. C. Colegio de Postgraduados. México. p 20.
- Cadena-Iñiguez J., Soto H. M., Arévalo G. M. L., Avendaño A. C. H., Aguirre M. J. F. y Ruiz P. L. M. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo Serie Horticultura Edición Especial* 17(2)45-55.
- Cadena-Iñiguez J., Soto-Hernández M., Torres-Salas A., Aguiñiga-Sánchez I., Ruiz-Posadas L., Rivera-Martínez A. R., Avendaño-Arrazate C. and Santiago-Osorio E. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(8):455-460.

- Cambar P. J., Portillo P., Tabora F. E., de Pineda L., Tovar O., Casco J., Alvarado C., Díaz G., Casco B. y Cantillo L. 1980. Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. Revista Médica Hondureña 48:97-99.
- Cambar P. J. 1985. Algunos estudios farmacológicos de las plantas medicinales en Honduras. Revista Médica Hondureña 53:190-196.
- Cartaya O. y Reynaldo I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales 22(2):5-14.
- Castañeda H., Gemio R., Yapu W. y Nogales J. 2011. Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas. Revista Boliviana de Química 28(2):135-140.
- Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud. 1998. Acuerdo 117. Bogotá Colombia. Documento electrónico disponible en <http://www.disaster-info.net/desplazados/legislacion/Acuerdo117.pdf>.
- Cook O. F. 1901. The cayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA. PP. 7-31. Documento electrónico. Disponible en: <https://archive.org/stream/chayotetropicalv00cook#page/n13/mode/2up>
- Chao-Chen J., Hua-Chiu M., Lin-Nie R., Cordell A G. y Qiu S. X. 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. Nat. Prod. Rep. 22:386-399. DOI:10.1039/b418841c
- Ding N.; Yamashita U., Matsuoka H., Sugiura T., Tsukada J., Noguchi J. and Yoshida Y. 2001 Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of Cucurbitacin D in human T-cell leukemia. Cancer 117:2735-46. DOI: 10.1002/cncr.25711.
- Dubin M. y Stoppani A. O. M. 2000. Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. Medicina (Buenos Aires) 60:375-386.
- Enríquez de S. A., Diebold Y., Calonge M., García-Vazquez C., Callejo S., Vila A. and Alonso M. J. 2006. Chitosan Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for the Ocular Surface: Toxicity, Uptake Mechanism and In Vivo Tolerance. Investigative Ophthalmology & Visual Science 47(4):1416-1425.
- Expósito R. 2010. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológica. Departamento de Bioquímica y Molecular I. Madrid España. 171.
- Flores M. E. 1989. El chayote, *Sechium edule* Swart (Cucurbitaceae). Revista Biología Tropical 37 (1):1-54 Universidad de Costa Rica, Costa Rica, C.A.
- Gamboa W. 2005. Producción agrícola: una opción para el desarrollo del cultivo del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). Universidad del Costa Rica. Costa Rica.
- Genta I., Costantini M., Asti A., Conti B. and Montanari L. 1998. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. Carbohydrate Polymers 36:81-88.
- Gershenzon J. and Croteau R. 1991. Terpenoids *in* Rosenthal G. A. y Berenbaum M. R. (edits). Hervibores Their interactions with secondary plant metabolites. Champer 5. Second

- edition. Vol. 1: The Chemical participants. Academic press, inc. San Diego California. p 468.
- Gillies R., Didier N. and Dentosn M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* 159:109-113.
- Gordon E. A., Guppy L. J. and Nelson M. 2000. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Medical Journal* 49(1): 27-31.
- Gutiérrez-Delgado C., Báez-Mendoza C., González-Pier E., Prieto de la Rosa A y Witlen R. 2008. Relación costo-efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México* 50(2):107-118.
- Gutiérrez-Ravelo Á y Estévez-Braun A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (Esp)* 103(2):409-419.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2015. Mortalidad. Causas de defunción. Documento electrónico consultado el 12 de agosto de 2015. Disponible en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
- Irache J., M. 2008. Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales del Sistema Sanitario Navarra* 31(1):7-10.
- Ishii T., Kira N., Yoshida T. y Narahara H. 2013 Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Tumor Biol* 34:285–291. DOI 10.1007/s13277-012-0549-2.
- Jasso-Gutiérrez L., Dorantes A. E., Rodríguez O. E. E., Pasillas-Torres E. M. y Muñoz H. O. 2012. Estudio de caso: estimación de los costos de la quimioterapia aplicando el protocolo completo en niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin *Bol Med Hosp Infant Mex* 69(1):11-23.
- Jirtle R. L. and Skinner M. K. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8:253-262.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *Ámbito Farmacéutico. Bioquímica* 22(6):100-106.
- Jyotsna D. C. and. Rajendra C. D. 2010. Formulation and evaluation of chitosan based microparticulate nasal drug delivery system of rizatriptan benzoate. *International Journal of Pharm Tech Research* 2(4):2391-2402.
- Kanadaswami C., Lee L., Lee P. H., Hwang J., Ke F., Huang Y. y Lee M. 2005. The antitumor activities of Flavonoids. *In vivo* 19:895-910.
- Kapoor S. 2013. Cucurbitacin B and Its Rapidly Emerging Role in the Management of Systemic Malignancies Besides Lung Carcinomas. Letter to the Editor. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 28(4):359 DOI: 10.1089/cbr.2012.1373.
- Katas H., Hussain Z. and Chai L. T. 2012. Chitosan nanoparticles as a percutaneous drug delivery system for hydrocortisone. *Journal of Nanomaterials* 1:1-11.

- Kaur S. H., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. y Sharma P. 2011. A Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1(1):25-41. Available online <http://www.ipharmsciencia.com>
- Khanvilkar K., Donovan M. D. and Flanagan D. R. 2001. Drug transfer through mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* 48: 173.
- Knaul F. M., Arreola-Ornelas H., Velázquez E., Dorantes J., Méndez O. y Ávila-Burgos L. 2009. El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública Mex* 51 supl 2:S286-S295.
- Kueng W., Silver E., and Eppnberg V. 1989. Quantification of cell cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemistry*. 186: 16-19.
- Kumar S. and Pandey A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Hindawi The Scientific World Journal* 1-16. ID 162750. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2013/12750>.
- Kumar V., Abbas A. K., Fausto N. y Aster J. C. 2010. Robbins. Patología estructural y funcional. 8ª ed. Ed. Elsevier Sounder. España. p 6 y28.
- Lárez V. C. 2003 Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana del Polímeros* 4(2):91-109.
- Lárez V. C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química* 1(2):15-21.
- Lazcano-Ponce E. y Hernández-Ávila M. 1997. Cáncer: frecuencia, factores de riesgo y medidas de prevención. *Salud Pública de México*. 39(4):251-252.
- Lemus C. J. F., Martínez Z. L. A., Navarro M. A. y Posadas A. A. 2007. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. Facultad de Ingeniería-Universidad Rafael Landívar. *Boletín Electrónico* 1:1-13.
- Lira R., Rodríguez C., Alvarado J. L., Rodríguez I., Castrejón J. y Domínguez A. 1998. Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 42:43-77.
- Lira R. 1995. Estudios taxonómicos y econgográficos de las cucurbitáceas Latinoamericanas de importancia económica: *Cucúrbita*, *Sechium*, *Sicana* y *Cyclanthera*. Systematic and ecofeographic studies on crops genepools, No. 9. Interational Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. p.p. 116-169.
- Lira R. 2011. La agricultura en Mesoamérica Chayote (*Sechium edule*). In cultivos andinos FAO. Documento electrónico, consultado 09/12/2011. Disponible en http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_4.htm#31
- Lira-Saade R. 1996. Chayote. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the coservation and use of underutilized and neglected crops. 8 Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 57 p. <http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=T7W9-psggWUC&oi=fnd&pg=PA4&dq=LIRA+Saade,+Rafael+sechium+edule&ots=Xlqmahq>

[Lxl&sig=YuDH6Ce TCfV3q2GkVW0j9FBPg0#v=onepage&q=LIRA%20Saade%2C%20Rafael%20sechium%20edule&f=false](#)

- López H. O. D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* 44(3):381-389.
- López-Hernández O. D., Gómez-Carril M., Padrón-Yaquis A. S., Toledo-Rivero A., Toledo-Sanchez C. A., Reyes-Sanchez E., Reguera-Ruiz E., Duque-Rodríguez J. y López-Pelaez B. 2010. Microencapsulación de tramadol en ácido poliláctico mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* 44(4):432-442.
- López O., T. Márquez, O. Mayo, C. Toledo y E. Pérez. 2009. Características del aceite de semillas de *Cucurbita pepo* L. microencapsulado mediante secado por aspersión con maltodextrina y goma arábiga. *Latin American Journal of Pharmacy* 28(4):628-32.
- Lopretti M., F. Barreiro, I. Fernandes, A. Damboriarena, C. Ottati, y A. Olivera, A. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *Biotechnología Publicación anual del laboratorio Tecnológico del Uruguay*. 2:19-23.
- Loraine S. y Mendoza-Espinoza J. A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(4):18-27.
- Lu G., Wu X., Chen B., Gao G. and Xu K. 2007. Evaluation of Genetic and Epigenetic Modification in Rapeseed (*Brassica napus*) Induced by Salt Stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (11):1599-1607.
- Lui V., Yau D., Wong E., Ng Y-K, Lau C., Ho Y., Chan J., Hong B., Ho K., Cheung C., Tsang C-M., Tsao S-W. and Chan A. 2009. Cucurbitacin I elicits anoikis sensitization, inhibits cellular invasion and *in vivo* tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30(12):2085-94. doi:10.1093/carcin/bgp253.
- Lupo-Pasin B., González-Azón C. y Maestro-Garriga A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. *Técnicas y aplicaciones*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3(1):130-151.
- Madene A., Jacquot M., Scher J. I. and Desobry S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International Journal of Food Science and Technology* 41:1–21.
- Maffioli A. 1981. Recursos genéticos de chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, (Cucurbitaceae). Turrialba, Costa Rica. Proyecto Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE-GTZ) Unidad de Recursos Genéticos. 151 p.
- Mármol Z., Páez G., Rincón M., Araujo K., Aiello C., Chandler C. y Gutiérrez E. 2001. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU (Universidad Rafael Urdaneta)* 1:53-58.
- Martín V. M. J., Morales H. M. E., Gallardo L. V. y Ruiz M. M. A. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm* 50(1):43-50.
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M. y Tuñón M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes *Nutr. Hosp.* 17(6):271-278.

- Márquez H. J. C., Rojas B. L., Ávila A. N., Pacheco G. C. y Calderón F. F. 2005. El costo del cáncer de próstata. ¿Qué esperamos? Rev. Mex. Urol. 65(5):307-311.
- Masuelli R. W. y Marfil C. F. 2011. Variabilidad epigenética en plantas y evolución. Journal of Basic and Applied Genetics 22(1):1-8.
- Mohammed F. S., Ahmed S. and Dey S. 2012. Antiepileptic and central nervous system depressant activity of *Sechium edule* fruit extract. Bangladesh Journal of Pharmacology 7:199-202.
- Molina G. J. D. 1980. Selección masal para resistencia a sequía de maíz. Agrociencia 42:69-77.
- Mongelli E. R. y Pomilio A. B. 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina. Del uso popular a la industria farmacéutica. Revista ciencia Hoy en línea. 12 (68):52 Documento electrónico consultado 06/enero/2013. Disponible en <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy68/medicamentos.htm>
- Monroy-Vázquez M. E., Soto-Hernández M., Cadena-Iñiguez J., Santiago-Osorio E., Ruiz-Posadas L del M. y Rosas-Acevedo H. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. Agrociencia 43(8): 777-790.
- Morris G. A., Samil K. M., Harding S. E. and Adams G. G. 2010. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 27:257-284.
- Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G, van Norren K. and van Leeuwen P. AM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Journal of Clinical Nutrition 74:418–425.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-017-SSA2. 1994, Para la vigilancia epidemiológica. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud.
- Núñez-Cortés J. y del Llano J. E. 2012. Ser Médico Los valores de una profesión. Unión Editorial. Universidad Complutense Madrid. Cátedra de educación Médica Fundación Lilly. España. 385 p.
- Olivera A. D., Barreiro M. F. y Lopretti M. 2012 Microesferas de quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos. Revista Iberoamericana de Polímeros 13(5):238-244.
- Organización Mundial de Salud (OMS). 2014. Centro de prensa. Nota descriptiva 310. Mayo. Las 10 causas principales de defunción en el mundo. Documento electrónico consultado el 02 de abril de 2015. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Centro de prensa. Nota descriptiva 297 Febrero. Documento electrónico consultado el 12 de agosto de 2015. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Ordoñez A. A. L., Gomez J. D., Vattuone M. A. and Isla M. I. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food Chemistry 97:452-458.

- Ordoñez A. A. L., Gomez J. D., Cudmani N. M., Vattuone M. A. and Isla M. I. 2003. Antimicrobial Activity of Nine Extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15:33-39.
- Ortega-Camarillo C., Díaz-Flores M., Avalos-Rodríguez A., Vergara-Onofre M. y Rosales-Torres A. M. 2001. La apoptosis y su importancia biomédica. *Gaceta Médica de México* 137(6):563-578.
- Palacios-López K. y Rodríguez-López N. 2007. Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad hídrica en dos ambientes lumínicos. *Acta biol. Colomb* 12(S):187-198.
- Paños I., Acosta N. and Heras A.. 2008. New Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *Current Drug Discovery Technologies* 5:333-341.
- Patel V., Patel M. and Patel R. 2008. Chitosan: a unique pharmaceutical excipient. *Drug Development and Delivey* 5(6) Documento electrónico consultado el 16 de septiembre de 2012. Disponible en <http://www.drugdeliverytech.com/Main/Back-Issues/205.aspx>
- Parra R. 2010. Revisión: Microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63(2):5669-5684.
- Pedraz J. L. y Orive G. 2004. La microencapsulación de células. ¿Una nueva alternativa terapéutica? *Anal de la Real Academia Nacional de Farmacia* 70(3):777-787.
- Pulido A. y C. I. Beristain, 2010. Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión, utilizando quitosano como material de pared. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9(2):189-195.
- Quesada-Hernández. A. 2008. Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis* 21:1-2.
- Racovita S., Vasiliu S. and Vlad C. D. 2010. New drugs delivery systems based on polyelectrolyte complexes. *Revue Roumaine de Chimie* 55(10): 659-666.
- Ré M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* 16(6):1195-1236.
- Richards E. J. 2006. Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7:395-401.
- Rodríguez-Pedroso A. T., Ramírez-Arrebato M. A., Rivero-González D., Bosquez-Molina E., Barrera-Necha L.L. y Bautista-Baños S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 15(3):307-317.
- Roman M., Castillo J., Picciteli V., China K., Arribas G. y China C. 2008. Caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y Fluorescencia láser confocal. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 9(6):526-537.
- Sáez V., Hernández E., Sanz A. L. y Katime I. 2004. Liberación controlada fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5(2):87-101.
- Salama A. M., Achenbach H., Sánchez M. y Gutiérrez M. 1987. Aislamiento e identificación de glicósidos antiinflamatorios de los frutos de *Sechium edule*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 16: 15-16.

- Salama A. M., Polo A. E., Contretras C. R. y Maldonado L. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. Revista Colombiana Ciencias Químico-Farmacéuticas 15: 79-82.
- Sánchez R. y Arboleda G. 2008. Mitocondria y muerte celular. Nova. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 6(10):190-200.
- Sandoval A. A., Rodríguez S. E. y Ayala A. A. 2004. Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. Ingeniería y Competitividad 5(2):73-83.
- Secretaría de Salud. 2010. Diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cervicouterino. Evidencias y Recomendaciones. Guía de Práctica Clínica. Ed CENETEC Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. México. P 59.
- Shaji J., Jain V. and Lodha S. 2010. Chitosan: A novel pharmaceutical excipient. International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences 1(1):11-28.
- Siciliano T., de Tommasi N., Morelli I. and Braca A. 2004. Study of Flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:6510-6515.
- Sosa D. E. E. y García-Rodríguez F. M. 2013. Panorama epidemiológico del cáncer en México. Anestesiología en Oncología 36 (supl. 1):130-132.
- Starr C. y Taggart R. 2004. Biología: la unidad y diversidad de la vida. 10ª ed. Editorial Thomson. México. p 249.
- Takahashi N., Yoshida Y., Sugiura T., Matsuno K., Fujino A. y Yamashita U. 2009. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. International Immunopharmacology 9:508-513.
- Tecnología. 2003. Microencapsulación. Nuevas capacidades para los tejidos tradicionales. Aitex Review 14-15.
- Tiyaboonchai W. 2003. Chitosan Nanoparticles. A Promising System for Drug Delivery. Naresuan University Journal 2003; 11(3): 51-66 51.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2011. Cáncer: Investigaciones de la UNAM. Boletín Informativo de la Coordinación de la Investigación Científica. El Faro la luz de la ciencia. 3:124-125.
- Veiga O., M. D. y Ruiz C. R. 2004. El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos. Revista del OFIL (Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos) 14(2):33-42.
- Vega-Ávila E., Velasco-Lezama R. y Jiménez-Estrada M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. Bioquímica. Artículo de revisión Farmacología 31(3):97-111.
- Vélez L. A. 2003. Ética Médica. Interrogantes acerca de la medicina, la vida y la muerte. 3a. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín, Colombia. p 58.
- Villamizar C. J. M, Rodríguez L. N. F. y Tezara F. W. 2012. Plasticidad fenotípica en plantas de *Lippia dulcis* (Verbenaceae) sometidas a déficit hídrico. Acta Biológica Colombiana 17(2):363 -378.

- Wagner H. and Bland S. 2001. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer second edition. Munich Germany. P 371.
- Xiong L.Z., Xu, C.G., Saghai Maroof, M. A. and Zhang, Q. F. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol.Gen. Genet.*, 261: 439-446.
- Yáñez J., Salazar J., Chaires L., Jiménez J., Márquez M. y Ramos E. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Revista Avance y perspectiva* 21:313-319.