

"AÑO DE LA DIVERSIFICACIÓN PRODUCTIVA Y DEL FORTALECIMIENTO DE LA EDUCACIÓN"

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y
CITOSTÁTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO OBTENIDO
DE LA RAÍZ DE *Grindelia tarapacana Phil.* "Escobita"**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

BACH. JAYO PACHECO JORGE LUIS

ICA - PERÚ

2015

A mis padres:

Flor y Narciso

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy,
en toda mi educación, tanto académica, como de
la vida, por su incondicional apoyo perfectamente
mantenido a través del tiempo; y a quienes agradezco
por haberme dado la vida.

A mis hermanos:

Edgar, Michael e Iliane

Por sus consejos y su apoyo, por
enseñarme a poder salir adelante a
pesar de las adversidades y por
compartir junto a ustedes mis
alegrías y travesuras.

A mis maestros:

A mis maestros que en este andar por la vida,
influyeron con sus lecciones y experiencias en
formarme como una persona de bien y preparada
para los retos de la vida, a todos y cada uno de ellos.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que sin esperar nada a
cambio compartieron pláticas, conocimientos y su tiempo para ayudarme a
completar mi trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma muy especial a mis asesores:

***Dra. Haydèe Chávez Orellana, Q.F. Carmela Ferreyra Paredes y
Mag. Fernando Retuerto Prieto.***

Por sus invaluable enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal, así como el apoyo desinteresado y guía en la finalización del trabajo de tesis.

A todos mis amigos de la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF), por su apoyo incondicional en la realización del trabajo de investigación.

Muchas gracias.

ÍNDICE

Resumen	
Introducción	1
CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES	4
1.1 Grindelia tarapacana Phil. “Escobita”	5
1.1.1 Características generales de la familia Asteraceae	5
1.1.2 Clasificación taxonómica	5
1.1.3 Sinonimia vulgar	5
1.1.4 Breve Descripción	6
1.1.5 Estudio etnobotánico	6
1.2 CÁNCER Y TRATAMIENTO	8
1.2.1 Actividad Citotóxica y Citostática	9
1.2.2 Tratamiento del cáncer	11
1.2.3 Clasificación de los antineoplásicos	12
1.2.4 Fármacos antineoplásicos utilizados en el ensayo farmacológico	13
1.2.4.1 Ciclofosfamida	13
1.2.4.2 Citarabina	15
1.2.4.3 Cisplatino	17
CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL	21
2.1 MATERIALES Y MÉTODO	22
2.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO	22
2.2.1 Métodos y procedimiento	22
2.2.1.1 Recolección, selección, secado y conservación de la muestra en estudio	22
2.2.1.2 Obtención del extracto etanólico	23
2.2.1.3 Screening Fitoquímico	23

2.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE Y LECHUGA	25
2.3.1 Preparación de extractos vegetales	25
2.3.2 Preparación de los fármacos control	25
2.3.3 Germinación de semillas	25
2.3.4 Prueba biológica	26
2.3.5 Cálculo del % de inhibición	26
2.4 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD SOBRE ARTEMIA SALINA	26
2.4.1 Preparación de extractos vegetales	27
2.4.2 Preparación de los fármacos control	27
2.4.3 Prueba biológica	27
2.5 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN EMBRIONES DE ERIZO DE MAR (<i>Tetrapygus níger</i>)	28
2.5.1 Obtención de gametos	28
2.5.2 Fertilización	29
2.5.3 Preparación de las muestras	29
2.5.4 Bioensayo de citotoxicidad	30
CAPÍTULO III: RESULTADOS	31
3.1 RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA	32
3.2 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CITOSTÁTICA	32
3.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	34
IV. DISCUSIÓN	43
V. CONCLUSIONES	46
VI. RECOMENDACIONES	47
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Anexos	52
Anexo N° 1: Constancia de la Clasificación Taxonómica	53
Anexo N° 2: Esquema del ensayo de la Actividad Citotóxica	54

ABSTRACT

The species *Grindelia tarapacana* Phil. It grows in abundance in the surrounding towns of the province of Cordova District Huaytará, in the department of Huancavelica. Ethnobotany-based survey conducted by the "Huitco" association Puquio - Ayacucho, ascribed to this species anticancer activity.

As cancer responsible for over 12% of the causes of death in the world and in our country is the second cause of death, we found it necessary to focus our studies in a plant species with antitumor effects, to evaluate the activity extracts were obtained root treated with ethanol at 96°, identification was made by phytochemical screening secondary metabolites obtained: free phenolic groups, flavonoids, steroids and/or triterpenoids, alkaloids and catechins. The cytotoxic activity was found with the technique of cytotoxicity Bioassay *Artemia salina* and Bioassay cytotoxicity in sea urchin embryos; and the cytostatic inhibition assay germination of tomato and lettuce.

The ethanolic root extract in *Artemia salina* bioassay showed an CL₅₀ of 112.10 ppm (fraction D), in the bioassay of inhibition of germination in tomato and lettuce with 36% and 25% inhibition (fraction A) respectively. In the bioassay cytotoxicity against sea urchin embryos 5 fractions were active.

Therefore we conclude in saying that the ethanol root extract has cytotoxic and cytostatic.

Keywords: *Grindelia tarapacana* Phil., cytotoxic activity, cytostatic activity, antitumor, phytochemical screening, cancer, inhibition, germination.

RESUMEN

La especie *Grindelia tarapacana* Phil. crece en abundancia en los pueblos aledaños del distrito de Córdova provincia de Huaytará, en el departamento de Huancavelica. Basados en la encuesta etnobotánica realizada por la asociación "Huitco" Puquio - Ayacucho, que le atribuye a esta especie actividad anticancerígena.

Siendo el cáncer responsable de más del 12% de las causas de muerte en el mundo y en nuestro país constituye la segunda causa de muerte, hemos considerado necesario enfocar nuestros estudios en una especie vegetal con efectos antitumorales, para evaluar dicha actividad se obtuvieron extractos de raíz tratado con etanol a 96°, se hizo una identificación de metabolitos secundarios por screening fitoquímico obteniendo: grupos fenólicos libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, alcaloides y catequinas. La actividad citotóxica se comprobó con la técnica de Bioensayo de citotoxicidad sobre *Artemia salina* y Bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar; y la citostática por el ensayo de Inhibición de germinación de semillas de tomate y lechuga.

El extracto etanólico de raíz en el bioensayo de *Artemia salina* mostró una CL₅₀ de 112.10 ppm (fracción D), en el bioensayo de Inhibición de germinación en semillas de tomate y lechuga con 36% y 25% de inhibición (fracción A), respectivamente. En el bioensayo de citotoxicidad frente a embriones de erizo de mar las 5 fracciones resultaron activas.

Por tanto concluimos en decir que el extracto etanólico de raíz posee actividad citotóxica y citostática.

Palabras claves: *Grindelia tarapacana*, actividad citotóxica, actividad citostática, antitumorales, screening fitoquímico, cáncer, inhibición, germinación.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos muy antiguos el hombre ha utilizado a las plantas como medio terapéutico para minimizar las dolencias que le causan las diversas enfermedades.

Las plantas medicinales siempre han estado envueltas en una aureola de misterio y espejismo en muchos grupos sociales, como solución a problemas de salud o facilitadora de estados especiales del ser humano. La existencia de unas propiedades terapéuticas, descubiertas mediante la praxis, confería a sus descubridores poderes mágicos. Hechiceros y brujería han sido algunos de los protagonistas e incluso hoy día, hay mercado de plantas medicinales que se denominan en Latinoamérica “de hechiceros”.

El reino vegetal contiene aproximadamente 250 000 especies de plantas y solo un pequeño porcentaje ha sido investigado biológica o farmacológicamente. Ya que las plantas pueden contener cientos y aun miles de metabolitos, actualmente hay un interés renovado en estudiar el reino vegetal como fuente posible de nuevos compuestos con actividad farmacológica determinada ¹.

La flora peruana comprende alrededor de 25 000 especies, que se distribuyen en los distintos pisos ecológicos. Una parte importante de la flora se desarrolla en los valles interandinos de Perú, en los que pueden habitar hasta el piso subnivel de 4 500 m.s.n.m., en esta zona, debido a la alta radiación solar y bajas temperaturas a las que están expuestas, las plantas han desarrollado defensas químicas específicas que les otorgan ventajas para la adaptación a su hábitat.

El Perú, es uno de los cinco países con mayor diversidad a nivel mundial, cuenta con 28 climas de los 32 existentes en el planeta y con 84 de las 103 zonas de vida reconocidas en la tierra, sus múltiples pisos ecológicos y ecosistemas permiten encontrar numerosas especies vegetales, de las cuales un alto porcentaje tiene aplicaciones medicinales que podrían ser estudiadas para lograr un desarrollo integral de las comunidades, con la participación de diversos actores: comunidades, universidades, organismos no gubernamentales y gobierno a través de las diversas instituciones de salud, educación y agricultura. Para ello se hace necesario la realización de un diagnóstico de los recursos vegetales, de uso en salud, empleados por las

comunidades andino-amazónicas, validar el uso consignado, de una manera científica, promover el manejo sostenible de estos recursos vegetales medicinales, impulsar su producción y comercialización bajo estándares de calidad y con la debida protección de propiedad intelectual y, sobre todo, difundir el uso racional de plantas medicinales en los profesionales de la salud y en la población, promoviendo la formación y desarrollo de banco de germoplasma, la formación de jardines botánicos, el fortalecimiento de las colecciones del herbario nacional, construir viveros e invernaderos, impulsar la implementación de biohuertos familiares, comunales y escolares.^{2,3}

El 80% de la población mundial vive en países en vía de desarrollo y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, aproximadamente, el 80% de esa población dispone casi exclusivamente de la medicina tradicional para cubrir sus necesidades sanitarias primarias. Dado que las plantas medicinales constituyen la “espinas dorsal” de la medicina tradicional, más de 4 000 millones de personas de los países en desarrollo utilizan plantas medicinales de forma regular. Así, para este segmento de la población mundial, que generalmente son incapaces de pagar el coste de las drogas occidentales, existe la necesidad de estudiar estas plantas para regular su seguridad y eficacia y para desarrollar productos farmacéuticos normalizados.

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, sintéticos y de origen natural, para combatir una serie de enfermedades como: cáncer, SIDA, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, se ha convertido en una preocupación que deriva de un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias y compañías farmacéuticas, a nivel mundial, etc.⁴

El cáncer es un proceso maligno y tiene como resultado un crecimiento celular sin regulación, ausencia de diferenciación, capacidad de invadir los tejidos locales y de originar metástasis; este proceso puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano y a cualquier edad.⁵

Los agentes quimioterápicos antineoplásicos son drogas capaces de dañar células malignas respetando relativamente al organismo, como dichas drogas son venenos celulares también se las denomina agentes citotóxicos; dado que su propiedad fundamental es la de inhibir el crecimiento de los tumores malignos, se les conoce también como citostáticas. El agente antineoplásico ideal debería destruir selectivamente las células cancerosas sin efectos

adversos o toxicidad, pero la mayoría de las drogas neoplásicas conocidas producen muchos efectos secundarios y son sustancias tóxicas pues su acción se extiende a las células normales, sobre todo a las de crecimiento rápido.^{5,6}

Dentro del arsenal de plantas utilizadas, encontramos a la especie *Grindelia tarapacana* Phil., conocida como "Escobita" por los pobladores de los pueblos aledaños del distrito de Córdova provincia de Huaytará en el departamento de Huancavelica; es una planta que se utiliza en la medicina tradicional para cáncer reciente.

El propósito del presente estudio fue determinar la actividad citotóxica y citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de esta especie, con el fin de revalorizar los conocimientos de la medicina popular de los pobladores mediante un respaldo científico, además de brindar una alternativa terapéutica natural.

Objetivo General

- Evaluar la actividad Citotóxica y Citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. "Escobita".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes, mediante un Screening fitoquímico en el extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. "Escobita".
- Determinar la actividad citotóxica mediante el Bioensayo de *Artemia salina*.
- Determinar la actividad citostática mediante el porcentaje de Inhibición de Germinación de las semillas de tomate y lechuga.
- Determinar la Actividad Citotóxica y Citostática mediante el Bioensayo de citotoxicidad en embriones erizo de mar.
- Comparar la actividad citotóxica y citostática de la especie *Grindelia tarapacana* Phil. con fármacos antineoplásicos.

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

1.1 Grindelia tarapacana Phil. “Escobita”

1.1.1 Características generales de la familia Asteraceae

Las Asteraceae ocupan el segundo lugar entre las familias más diversas de la flora peruana. Esta familia es reconocida en el Perú por presentar alrededor de 250 géneros y 1590 especies, mayormente hierbas, arbustos y subarbustos. Los géneros con mayor número de especies son Senecio, Gynoxys y Verbesina. Esta familia incluye 11 géneros endémicos del Perú: Ascidiogyne, Aynia, Bishopanthus, Chucoa, Ellenbergia, Hughesia, Notobaccharis, Pseudonosseris, Schizotrichia, Syncretocarpus y Uleophytum. Los endemismos reconocidos ocupan la mayoría de las regiones ecológicas, principalmente la Mesoandina, bosques pluviales montanos y bosques muy húmedos montanos, desde el nivel del mar hasta por encima de los 4000 m de altitud. ⁷

1.1.2 Clasificación Taxonómica

El material vegetal fue clasificado por la Dra. Haydeé Montoya T. (José Campos), en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos como *Grindelia tarapacana* Phil. “Escobita” y según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988), se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GÉNERO	:	<i>Grindelia</i>
ESPECIE	:	<i>Grindelia tarapacana</i> Phil.

1.1.3 Sinonimia Vulgar

Escobita.

1.1.4 Breve Descripción

La familia Asteraceae se caracteriza fundamentalmente por poseer inflorescencias de cabezuelas con involucros (capítulos) de una a muchas flores, sobre un receptáculo común rodeado por filarias; corola unidad con 5 lóbulos; 5 estambres formando un cilindro alrededor del estilo; ovario con dos ramas del estilo y unilocular con un solo óvulo.

Esta familia presenta hierbas y arbustos, con hojas alternas, opuestas o raramente verticiladas. Es una de las familias más grandes dentro de las plantas con flores. ⁸

La especie *Grindelia tarapacana* Phil. es una planta ramosa, hojas resinosas, flores amarillas vistosas. Su hábitat es en lugares secos.

1.1.5 Estudio Etnobotánico ⁹

Parte usada

Flor, rama y raíces.

Usos

- Tos:
 - Reposar 5-6 flores con “leche” por taza y tomar el mate.
 - Tomar el mate de una rama.
- Amigdalitis, garganta:
 - Reposar 3-4 flores sin leche por taza.
- Caracha:
 - Poner la “leche” que tiene la flor directamente a la mancha.
- Heridas:
 - Moler las flores o poner directamente la “leche” en la herida.
- Problemas oculares:
 - Gotear la “leche” de las flores al ojo.
- Golpes:
 - Preparar un mate y bañarse. También calentar una rama y amarrarse 24 horas.
- Cáncer reciente:
 - Tomar el mate de la raíz.



FIGURA N°1 Grindelia tarapacana Phil.



FIGURA N°2 Ubicación geográfica de Grindelia tarapacana Phil. en el Departamento de Huancavelica - Provincia de Huaytará

1.2 CANCER Y TRATAMIENTO

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la existencia de una proliferación anormal de células con capacidad para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia, dando origen a las metástasis. El proceso de metástasis es largo y complejo ya que las células cancerosas primero deben invadir un tejido cercano, y luego llegar al flujo sanguíneo o a un vaso linfático para migrar a una nueva zona del cuerpo y establecer una nueva colonia. Las fases en la producción de una metástasis son las siguientes: desprendimiento, invasión, penetración vascular, transporte intravascular, embolización con muerte celular y embolización con crecimiento (colonización).^{10, 11}

El cáncer se considera una enfermedad genética, resultado de las alteraciones que presenta las células cancerosas en genes relacionados con el control del ciclo celular. Durante este proceso de transformación de células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas dando lugar a una pérdida de control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como de la segregación del material genético.^{12,13} Aunque las células normales tienen estrategia de defensa (reparación del ADN, genes supresores de tumores, sistema inmune, entre otros) contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia.

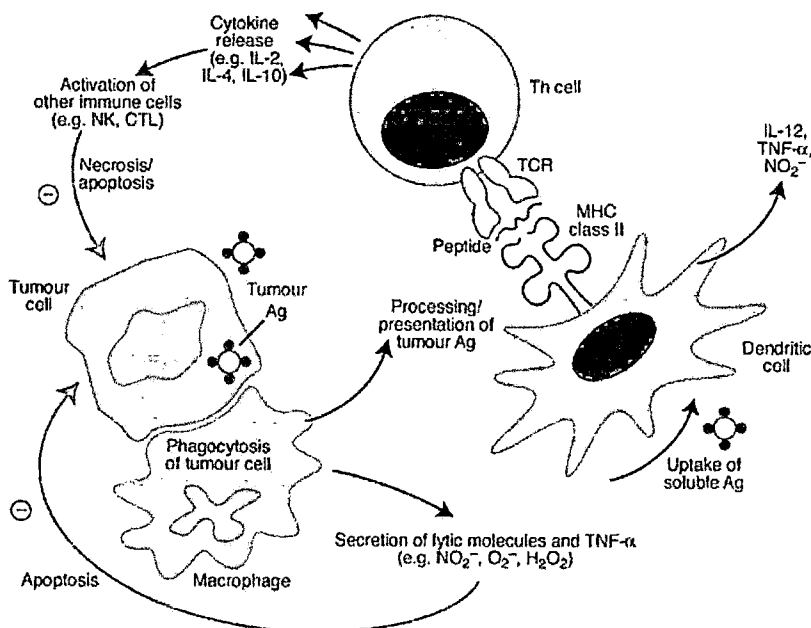


FIGURA N°3 Esquema de la citotoxicidad.

1.2.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.¹⁴

La citotoxicidad celular constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas. Cualquier tipo celular, normal o patológico, puede ser potencialmente susceptible a las células citotóxicas, y se emplea gráficamente el término “células diana” (target cells) para su designación.

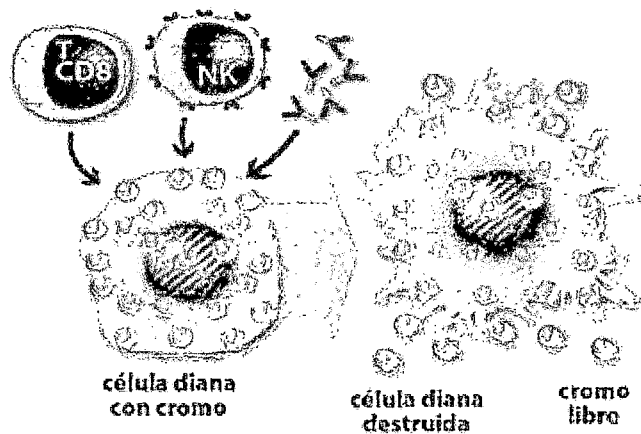


FIGURA N°4 Reacciones citotóxicas

Los citostáticos son fármacos capaces de inhibir el crecimiento desordenado de células, alteran la división celular y destruyen las células que se multiplican rápidamente. El efecto citotóxico no se limita sólo a la célula maligna sino que ejercen también su acción sobre los tejidos de proliferación rápida, como piel, mucosas, medula ósea, intestino, y otros.

Los medicamentos citostáticos incluyen una serie de sustancias químicas, que se utilizan para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, como terapia única o asociados a otras medidas como son cirugía, radioterapia, inmunoterapia u hormonoterapia.

El buen resultado obtenido en tratamiento de dichas patologías por estos fármacos han provocado un aumento de su utilización en los últimos años, de

forma paralela también ha aumentado la preocupación por los riesgos que conlleva su manejo.

Los citostáticos tienen un gran peligro toxicológico, que puede afectar al manipulador, al paciente y al medio, ya que están diseñados para originar la muerte celular, sin diferenciar entre células sanas y cancerosas. La mayoría de los citostáticos han demostrado propiedades mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas, y embriotóxicas en modelos animales. Su toxicidad afecta sobre todo a tejidos y órganos de alta capacidad de proliferación, como son piel, mucosa, tejido hematopoyético, gónadas, etc. ¹⁵

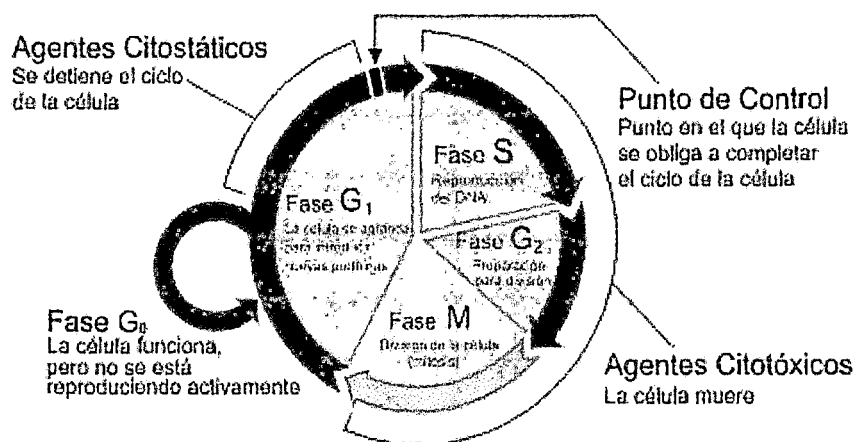


FIGURA N°5 Esquema de un ciclo celular

Debido a la alta toxicidad y a la multirresistencia de las drogas citostáticas utilizadas actualmente, además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes naturales antitumorales derivados de plantas. En la actualidad, existen evidencias clínicas de las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de un gran número de productos obtenidos de plantas que presentan menor toxicidad que los actuales tratamientos empleados. ^{16, 17, 18}

1.2.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La elección del tratamiento adecuado para el cáncer viene determinado por varios factores, incluyendo el tipo, las condiciones generales del paciente y por supuesto cuál sea el objetivo buscado: curarlo, evitar que se extienda, o aliviar los síntomas causados por éste. Dependiendo de todos estos factores, el paciente puede recibir uno o varios de los tratamientos siguientes:

- Cirugía.
- Quimioterapia.
- Radioterapia.
- Terapia hormonal.
- Inmunoterapia o terapia biológica.
- Medicina complementaria y alternativa.
- Transplante de células hematopoyéticas. ¹⁹

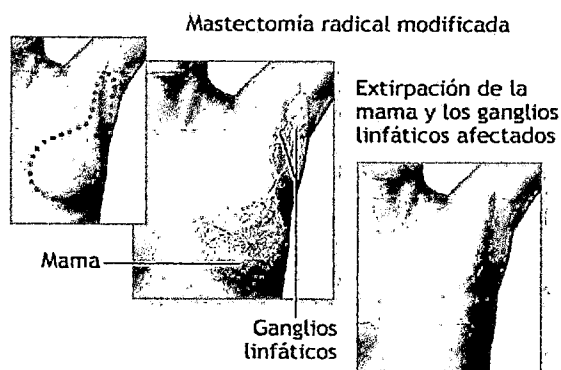
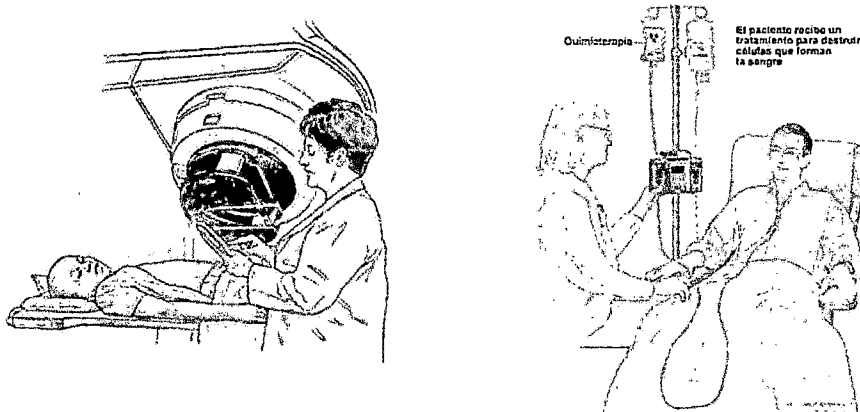


FIGURA N°6 Tratamientos de cáncer.

1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSICOS

CUADRO N° 1. Quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas

CLASE	TIPO DE FÁRMACO	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD*	
<i>Férmentos antiproliferativos</i>	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina	Enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin	
		Ciclofosfamida Hoflamida	Leucemia linfocítica aguda y crónica; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; mieloma múltiple, neuroblastoma; cáncer de mama, ovario, pulmón; tumor de Wilms; cáncer de cervix, testículo; sarcoma de tejido blando	
		Melfalán (L-sarcosina)	Mieloma múltiple; cáncer de mama, ovario	
	Etilenoiminas y metilclaniminas	Altretamina	Leucemia linfocítica crónica; macroglobulinemia primaria; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin	
		Tiotepa	Cáncer del ovario	
	Derivado de metilhidrazina	Procarrbazina (N-metilhidrazina, MHH)	Cáncer de vejiga, mama, ovario	
		Busulfán	Enfermedad de Hodgkin	
	Alquilsulfonato Nitrosoureas	Carbustina (BCNU)	Leucemia mielógena crónica	
		Estrepto-zocina (estreptozocina)	Enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin; tumor primario del cerebro; melanoma	
	Triazenos	Dacarbazina (DTIC; carboxamida de dimetiltriazenoimidazol), ternazoformida	Insulinoma pancreático maligno; carcinoma maligno	
		Complejos de coordinación de platino	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino	Melanoma maligno; enfermedad de Hodgkin; sarcoma de tejido blando; glioma; melanoma
	<i>Antimetabolitos</i>	Análogos del ácido fólico	Metotrexato (ametofterina)	Cáncer de testículo, ovario, vejiga, esófago, pulmón, colon
			Pentetrexed	Leucemia linfocítica aguda; cardiocarcinoma; cáncer de mama, cabeza, cuello y pulmón; sarcoma osteógeno; cáncer de la vejiga
		Análogos de la pirimidina	Fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), capecitabina	Melanoma, cáncer del pulmón, Mama, colon, esófago, estómago, páncreas, cabeza y cuello; lesión premaligna de la piel (tópico)
			Citarabina (arabinósido de citocina)	Leucemias mielógena y linfocítica aguda; linfoma no Hodgkin
Análogos de la purina e inhibidores relacionados		Gemcitabina	Cáncer de páncreas, ovario, pulmón	
		Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP)	Leucemias linfocítica y mielógena agudas	
		Pentostatina (2'-desoxicoformicina), cladribina, fludarabina	Leucemia de células pilosas; leucemia linfocítica crónica; linfoma no Hodgkin de célula pequeña	
		<i>Fármacos naturales</i>	Alcaloides de la vinca	Vinblastina, vinorelbina
Vincristina				Leucemia linfocítica aguda; neuroblastoma; tumor de Wilms, rabdomiosarcoma; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Taxanos			Paclitaxel, docetaxel	Cáncer de ovario, mama, pulmón, vejiga, cabeza y cuello
Etoposídotoxinas	Etoposído		Cáncer de testículo, pulmonar de célula pequeña y otros cánceres del pulmón; cáncer de mama; enfermedad de Hodgkin; linfomas no Hodgkin; leucemia mielógena aguda; sarcoma de Kaposi	
	Teniposído		Igual que el etoposído; también leucemia linfoblástica aguda en niños	
Camptotecinas	Topotecán, irinotecán		Cáncer del ovario; cáncer de pulmón de célula pequeña; cáncer de colon y pulmón	
Antibióticos	Dactinomicina (actinomicina D)		Coriocarcinoma; tumor de Wilms; rabdomiosarcoma; testículo; sarcoma de Kaposi	
	Daunorubicina (daunomicina, rubidomícina)		Leucemias mielógena y linfocítica agudas	
	Doxorrubicina	Sarcoma de tejido blando, osteógeno y otros; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; leucemia aguda; cáncer de mama, genitourinario, tiroidea, pulmón y estómago; neuroblastoma y otros sarcoma de la niñez		
Antraquinodiona	Mitoxantrona	Leucemia mielógena aguda; cáncer de mama y próstata		
	Bleomicina	Cáncer de testículo y cervical; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin		
<i>Fármacos diversos</i>	Enzimas Úrea sustituida	Mitomomicina (mitomycin C)	Cáncer de estómago, uno y pulmón	
		L-Asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda	
	Hidroxiurea	Leucemia mielógena crónica; policitemia verdadera; trombocitosis esencial		
	Agentes de diferenciación	Tretinoína, trióxido de arsénico	Leucemia promielocítica aguda	
	Inhibidor de la proteína-quinasa de tirosina	Imatinib	Leucemia mielocítica crónica; tumores estromatiales gastrointestinales; síndrome de hipercoagulabilidad	
Inhibidor de proteasoma		Gestinib, erlesinib	Cáncer de pulmón de célula no pequeña	
		Bortezomib	Mieloma múltiple	

CLASE	TIPO DE FÁRMACO	NOMBRES NO COMERCIALES (OTROS NOMBRES)	ENFERMEDAD*
<i>Hormonas y antagonistas</i>	Modificadores de la respuesta biológica	Interferón-alfa, interleucina 2	Leucemia de célula pilosa; sarcoma de Kaposi; melanoma; carcinoma de célula renal; ovario; vejiga; linfoma no Hodgkin; micosis fungoides; mieloma múltiple; leucemia mielógena crónica; melanoma maligno
	Anticuerpos (véanse cuadros 51-3 y 51-4)		
	Supresores adrenocorticales	Mitotano (<i>o,p'</i> -DDD)	Cáncer de corteza suprarrenal
	Adrenocortico-esteroides	Aminoglutetimida	Cáncer de mama
		Prednisona (varios otros preparados equivalentes disponibles; véase cap. 59)	Leucemias linfocíticas aguda y crónica; linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin; cáncer de mama
	Progestágenos	Caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol	Cáncer de endometrio, mama
	Estrógenos	Dietilestilbestrol, etinilestradiol (otros preparados disponibles; véase cap. 57)	Cáncer de mama, próstata
	Antiestrógenos	Tamoxifén, toremifén	Cáncer de mama
	Inhibidores de aromatasas	Anastrozol, letrozol, exemestano	Cáncer de mama
	Andrógenos	Propionato de testosterona, fluoximesterona (otros preparados disponibles; véase cap. 58)	Cáncer de mama
Antiandrógenos	Flutamida	Cáncer de próstata	
Análogo de la hormona liberadora de gonadotropina	Leuprolida	Cáncer de próstata	

* Las neoplasias son carcinomas a menos que se indique de otra manera.

FUENTE: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica ¹⁹.

1.2.4 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO FARMACOLÓGICO

1.2.4.1 **Ciclofosfamida**, es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras. Pertenece a la familia de los fármacos alquilantes.

a) **Estructura:** (RS)-N,N-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina-2-óxido

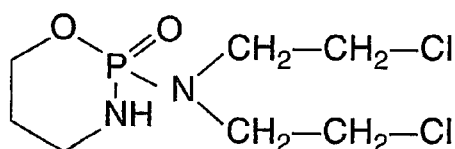


FIGURA N°7 Estructura básica de la ciclofosfamida

b) **Farmacocinética**

Después de una dosis oral de hasta 100 mg, la ciclofosfamida se absorbe por el tracto digestivo. Las dosis de 300 mg o más, muestran una biodisponibilidad del 75%. Los metabolitos activos de la ciclofosfamida se distribuyen por todos los tejidos, pero el fármaco no pasa la barrera hematoencefálica en dosis

suficientes como para tratar la leucemia meníngea. La ciclofosfamida se detecta en la leche materna y alcanza unas concentraciones en el líquido amniótico que son un 25% las observadas en el plasma. El fármaco se une sólo en pequeña proporción a las proteínas del plasma. Aproximadamente el 15% de la dosis se elimina como fármaco sin alterar en la orina. ²⁰

c) Indicaciones terapéuticas

- Tratamiento de inducción en la leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, retinoblastoma, o micosis fungoide.
- Tratamiento de cáncer de mama.
- Tratamiento de la leucemia mielógena aguda.
- Tratamiento del cáncer de pulmón.
- Tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.
- Tratamiento del linfoma no de Hodgkin o el linfoma de Burkitt.
- Tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.
- Tratamiento del mieloma múltiple.
- Tratamiento del cáncer de ovario.
- Tratamiento previo al trasplante de médula ósea.
- Profilaxis del rechazo en el trasplante de riñón.
- Tratamiento del síndrome de Behcet.
- Tratamiento del síndrome nefrótico.
- Tratamiento de la artritis reumatoide.
- Tratamiento de la granulomatosis de Wegener.

d) Reacciones adversas

La toxicidad hematológica es la principal reacción adversa de la ciclofosfamida. Las reacciones adversas sobre el tracto digestivo incluyen anorexia y náuseas o vómitos. La emesis es más probable después de dosis intravenosas elevadas y suele aparecer a las 8 horas de la administración manteniéndose varios días después. Otras reacciones adversas sobre el tracto digestivo menos frecuentes son dolor abdominal y diarrea.

Se puede desarrollar cistitis hemorrágica como consecuencia del tratamiento con ciclofosfamida.

La ciclofosfamida puede ocasionar infertilidad debido a la supresión de las funciones de las gónadas.

La ciclofosfamida ocasiona alopecia reversible en muchos pacientes (50%) y fragilidad capilar en la mayor parte de los mismos.

La rápida lisis de las células leucémicas y linfáticas por la ciclofosfamida ocasiona un aumento de los niveles séricos de ácido úrico.

También se han comunicado casos de visión borrosa transitoria durante tratamientos con dosis altas.

Se ha observado cardiotoxicidad en pacientes tratados con altas dosis de ciclofosfamida.

El síndrome de la arginina-vasopresina inadecuada (SIADH) rara vez ocurre durante el tratamiento con ciclofosfamida.

Durante el tratamiento con ciclofosfamida se han reportado casos de choques anafilácticos que han desembocado en la muerte.

En el 5% de los pacientes tratados con ciclofosfamida se ha desarrollado cáncer de vejiga, una incidencia 39 veces mayor que la de la población en general. ²¹

1.2.4.2. Citarabina, es un fármaco antineoplásico antimetabolito análogo de la pirimidina que inhibe la síntesis de ácido desoxirribonucleico. La acción principal de la citarabina consiste en la inhibición de la síntesis de deoxicitidina, aunque la inhibición de las cinasas citidílicas y la incorporación del compuesto en ácidos nucleicos también podrían desempeñar un papel en sus acciones citostáticas y citocidas.

a) Estructura: 4-amino-1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl] pyrimidin-2-one

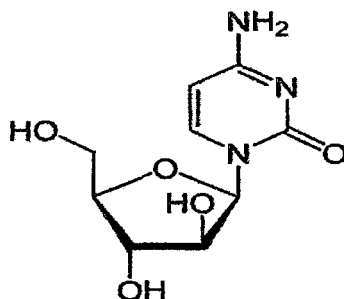


FIGURA N°8 Estructura básica de la citarabina

b) Farmacocinética

Menos del 20% de la dosis de citarabina se absorbe por el tracto gastrointestinal. El medicamento no es eficaz cuando se administra por vía oral. Tras la administración subcutánea o intramuscular de citarabina marcada, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en 20-60 minutos, siendo considerablemente inferiores a las que se obtienen tras la administración intravenosa. En perfusión intravenosa se obtienen concentraciones plasmáticas relativamente constantes del fármaco en 8-24 horas.

La citarabina se distribuye rápida y ampliamente a los tejidos y fluidos, incluyendo hígado, plasma y granulocitos periféricos. Tras la administración intravenosa rápida de citarabina, aproximadamente el 13% del medicamento se une a las proteínas plasmáticas. La mayor parte de una dosis intratecal de citarabina difunde a la circulación sistémica pero se metaboliza de forma rápida y generalmente se obtienen concentraciones plasmáticas bajas del medicamento inalterado. La citarabina parece atravesar la placenta. Se desconoce si la citarabina o su metabolito ara-U pasan a la leche materna.

La citarabina se metaboliza de forma rápida y amplia, principalmente a nivel hepático, pero también a nivel renal, en mucosa gastrointestinal, granulocitos y en otros tejidos en menor proporción.

Tras la administración intravenosa rápida, las concentraciones plasmáticas del medicamento disminuyen de forma bifásica con una semivida de aproximadamente 10 minutos en la fase inicial y de 1-3 horas en la fase terminal. Tanto la citarabina como su metabolito ara-U se excretan por la orina. Tras la administración intravenosa rápida, intramuscular, subcutánea, intratecal o tras la perfusión de citarabina, aproximadamente el 70-80% de la dosis se elimina por la orina en 24 horas.

c) Indicaciones terapéuticas

- Leucemia aguda no linfocítica.
- Crisis blásticas de leucemias crónicas no linfocíticas.
- Leucemia aguda linfocítica (tratamiento secundario).
- Linfoma no Hodgkin.
- Leucemia meníngea.

d) Reacciones adversas

El principal efecto adverso es la mielosupresión relacionada con la dosis con un bajón leucopénico de 3-11 días y un bajón trombocitopénico de 12-14 días; la megaloblastosis es típicamente advertida en el restablecimiento de la médula ósea y en los casos raros en los que se desarrolla anemia. Son frecuentes las náuseas y los vómitos de leves a moderados; los antieméticos profilácticos a menudo son supresivos. La ulceración oral leve ocurre de vez en cuando. Se puede producir un síndrome similar al gripal, manifestado por artralgias, fiebre y algunas veces erupción. La toxicidad ocular aparece frecuentemente con terapia a altas dosis; típicamente, ocurre inyección conjuntival y opacidades corneales. La toxicidad cerebelosa irreversible (ataxia, disfunción cognitiva) es un riesgo después de dosis acumuladas de 30 g/m² o mayores.

Las toxicidades intratecales están relacionadas con la dosis e incluyen dolores de cabeza transitorios y vómitos. Los ataques y la paraplejía son muy raros e implican altas dosis y tratamientos poco espaciados.²²

1.2.4.3 Cisplatino, es un complejo de platino. La estereoquímica de este compuesto es crítica para sus efectos terapéuticos, ya que el isómero trans no es citotóxico. El cisplatino tiene actividad en muchos diferentes tumores sólidos y linfomas, como el carcinoma testicular, cáncer de la vejiga, gástrico, de cabeza y cuello, de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, y cáncer de pulmón de células pequeñas. El cisplatino se considera como el compuesto de platino de elección para el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello y cánceres testiculares.

a) Estructura: (SP-4-2)-diaminodicloroplatino

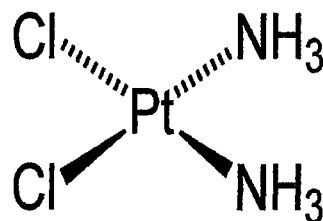


FIGURA N°9 Estructura básica del cisplatino

b) Farmacocinética

El cisplatino se administra principalmente como una infusión I.V. El cisplatino se distribuye ampliamente en todos los tejidos del cuerpo, con altas concentraciones en la próstata, el hígado y los riñones. Se une ampliamente a las proteínas plasmáticas y de las superficies de las células rojas de la sangre.

El cisplatino experimenta una degradación espontánea en el torrente sanguíneo y no se metaboliza por vía hepática. El fármaco inalterado se excreta por vía renal, tanto por filtración glomerular como por secreción. La eliminación es trifásica, con una semi-vida media de la fase inicial que dura 20 minutos, de 48-70 minutos para a segunda fase, y de 24 horas para la fase terminal. Aproximadamente el 23% de la dosis se elimina en las primeras 24 horas. El fármaco se pueden detectar en la orina de hasta 6 meses después de la discontinuación de la terapia.

c) Indicaciones terapéuticas

- Tratamiento de cáncer de vejiga.
- Tratamiento de cáncer de ovario en combinación con ciclofosfamida.
- Tratamiento del cáncer de ovario avanzado, en combinación con paclitaxel.
- Tumores intraperitoneales (por ejemplo, el cáncer de ovario avanzado, carcinoide o mesotelioma) que se limitan a la cavidad peritoneal y/o asociados con ascitis maligna.
- Tratamiento del cáncer de ovario refractorio.
- Tratamiento de cáncer testicular.
- Tratamiento de cáncer de mama.
- Tratamiento de cáncer gástrico.
- Tratamiento de enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin (NHL).
- Tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de células no pequeñas de pulmón.
- Tratamiento de primera línea del cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLC), en combinación con paclitaxel, en pacientes que no son candidatos a cirugía potencialmente curativa y/o radioterapia.
- Tratamiento del cáncer de pulmón avanzado (por ejemplo, en estadios III y IV) de células no pequeñas (NSCLC) en combinación con vinorelbina.

- Tratamiento de primera línea del cáncer inoperable, localmente avanzado (estadio IIIA o IIIB) o metastásico (estadio IV) de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) en combinación con gemcitabina.
- Tratamiento del mesotelioma maligno.
- Tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) en combinación con etopósido.
- Tratamiento de melanoma maligno.
- Tratamiento de sarcoma osteogénico.
- Tratamiento del sarcoma de tejidos blandos.
- Tratamiento del astrocitoma de alto grado y otros gliomas.
- Tratamiento de los cánceres cerebrales primarios y metastásicos.
- Tratamiento de neuroblastoma.
- Tratamiento del cáncer de pene.
- Tratamiento de cáncer de cabeza y cuello.
- Tratamiento de cáncer hepatocelular.

d) Reacciones adversas

La toxicidad limitante de la dosis de cisplatino es la nefrotoxicidad, que puede ser aguda o crónica.

La hiperuricemia, que generalmente ocurre 3-5 días después de cisplatino, puede indicar la toxicidad renal inducida por cisplatino. La nefropatía por ácido úrico y la nefrolitiasis puede ser secundaria a la hiperuricemia. El tratamiento con alopurinol es eficaz en la reducción de los niveles de ácido úrico en suero en estos pacientes.

Otras alteraciones electrolíticas, como hipomagnesemia, hipocalcemia, hipopotasemia, hiponatremia, hipofosfatemia, y pueden aparecer 48-72 horas después de la administración de cisplatino. Se han reportado casos de tétanos ocasionalmente en pacientes con hipocalcemia e hipomagnesemia.

La ototoxicidad acumulativa que consiste en audiogramas anormales ocurre hasta en el 31% de los pacientes tratados con cisplatino y el 10-15% de los pacientes desarrollan una pérdida auditiva clínica que se manifiesta como tinnitus y/o pérdida de audición en el rango de frecuencias altas.

La neurotoxicidad, por lo general se manifiesta como una neuropatía sensorial se produce después de 4-7 meses de tratamiento con cisplatino pero se han

reportado neuropatías después de la primera dosis de cisplatino o hasta 3-8 semanas después de la última dosis de cisplatino.

Los supervivientes a largo plazo de cáncer testicular tratados con cisplatino, bleomicina y vinblastina informan parestesias, entumecimiento y sensibilidad al frío en los dedos de manos y pies hasta 8 años después de finalizar el tratamiento. Otros síntomas neurológicos incluyen la pérdida de la función motora, arreflexia, pérdida de la propiocepción y afasia. El cisplatino se debe interrumpir cuando se observan por primera vez estos síntomas.

Un síndrome similar a la miastenia, con dolor de cabeza, convulsiones, disgeusia que consiste en un sabor metálico, y la pérdida del gusto también pueden ocurrir.

Igualmente las dosis altas de cisplatino se asocian con una visión borrosa, que resuelve gradualmente después de interrumpir el tratamiento.

El cisplatino causa una supresión de la médula ósea relativamente menos grave que lo hacen otros fármacos antineoplásicos. La anemia, neutropenia y trombocitopenia pueden ocurrir entre los días 18-23 después del tratamiento con cisplatino.

El cisplatino es uno de los agentes antineoplásicos emetogénicos más potentes utilizados. Las náuseas y vómitos agudos pueden comenzar dentro de 1-4 horas después del tratamiento con cisplatino y durar hasta 24 horas.

Se han producido reacciones anafilactoides durante la terapia con cisplatino, y puede manifestarse como edema facial, rubor, respiración sibilante, taquicardia e hipotensión.

En el tratamiento de cáncer de ovario, la terapia a base de platino se ha asociado con un mayor riesgo de malignidad secundaria, principalmente leucemia mielógena aguda, síndromes mielodisplásicos, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielógena crónica. Otras reacciones adversas notificadas con el cisplatino incluyen hipo, enzimas hepáticas elevadas incluyendo hiperbilirrubinemia, y alopecia.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES Y MÉTODO

- Materiales

Raíces secas de *Grindelia tarapacana* Phil. "Escobita"

Huevos de Artemia Salina

Semillas de lechuga y tomate

Erizos de mar ("*Tetrapygyus níger*")

Ciclofosfamida 1000 mg Polvo liofilizado para solución inyectable.

Citarabina 500 mg Polvo liofilizado para solución inyectable.

Cisplatino 50 mg Polvo liofilizado para solución inyectable.

- Material de vidrio: Los necesarios para la realización de la tesis.
- Reactivos: Los necesarios para la identificación de metabolitos secundarios según la marcha fitoquímica.
Solventes y reactivos necesarios para la investigación.
- Equipos:
 - Balanza analítica sartorius.
 - Balanza de precisión sartorius.
 - Agitador magnético de calefacción.
 - Manta eléctrica.
 - Evaporador rotatorio HEIDOLPH LABORATORA 4000.
 - Microscopio estereoscopio electrónico compuesto Zeiss.
 - Incubadora.
 - Agitador Shaker.
 - Autoclave RAYPA.

2.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO

2.2.1 Métodos y procedimiento

2.2.1.1 Recolección, selección, secado y conservación de la muestra en estudio

La especie vegetal fue recolectada en los pueblos aledaños del distrito de Córdova provincia de Huaytará ubicada a una altitud de 3 316 m.s.n.m., en el departamento de Huancavelica, en el mes de Junio; se seleccionaron las raíces que fueron secados al aire libre en un lugar seco y sin presencia de rayos solares por un periodo de 30 días aproximadamente. Luego se procedió a minimizar el tamaño de la muestra mediante una tijera de podar.

2.2.1.2 Obtención del extracto etanólico

Se obtuvo el extracto etanólico a partir de las raíces secas y picadas, extrayendo por reflujo hasta agotamiento con etanol de 96°, posteriormente se llevó a concentrar a un rotavapor modelo HEIDOLPH LABORATORA 4000 hasta sequedad. Obteniendo el extracto seco de color marrón.

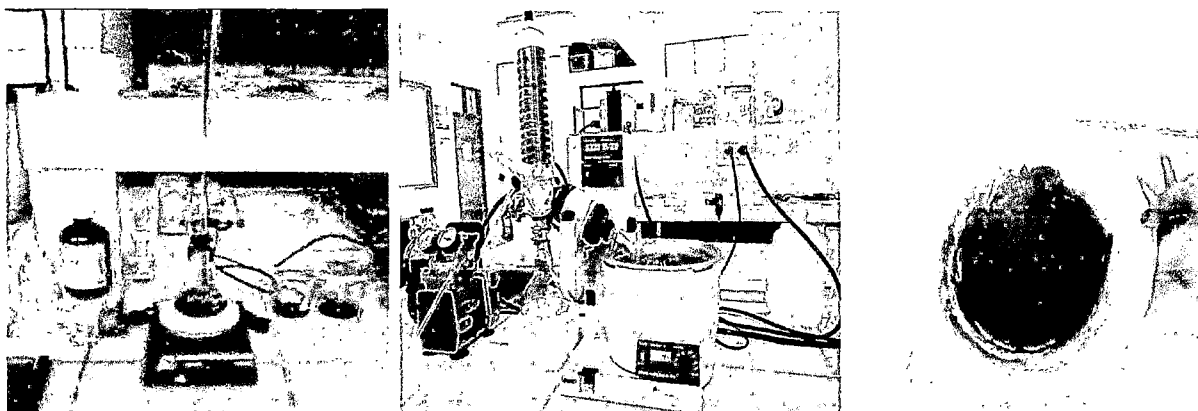


FIGURA N°10 Secuencia de extracción de *Grindelia tarapacana* Phil.

2.2.1.3 Screening fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas principales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos, constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. ²⁴

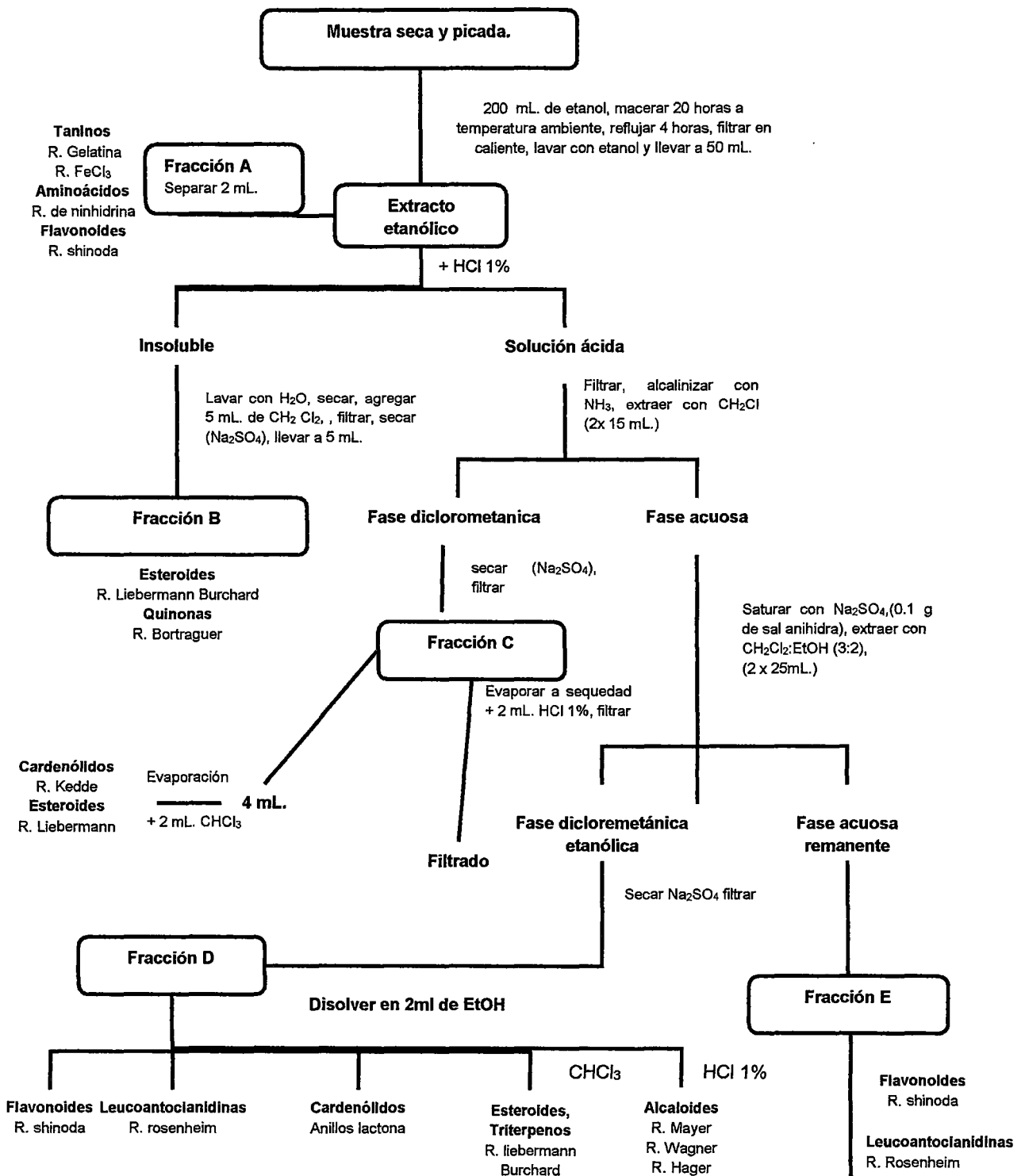


FIGURA N°11 Esquema General de una Marcha Fitoquímica

2.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE Y LECHUGA

Estudios sobre interacción planta-planta fueron introducidos por Molish en 1937, como parte de las investigaciones sobre las interacciones químicas beneficiosas o perjudiciales entre diferentes plantas ²⁵. Las plantas eliminan productos “alelopáticos” para impedir el crecimiento de otras plantas a su alrededor en forma de vapores, exudados y descomposición de materia vegetal que contienen “toxinas” que impiden la germinación de semillas. ²⁶

El ensayo de inhibición de germinación de semillas de lechuga y tomate sirve para detectar metabolitos secundarios de especies vegetales con capacidad de inhibición de crecimiento vegetal, el cual consideramos indicativo de actividad citostática y serviría para complementar el ensayo de la *Artemia salina*. ²⁷

2.3.1 Preparación de extractos vegetales

El extracto fue procesado hasta obtener soluciones de concentración de 1000, 100 y 10 ppm utilizando agua y DMSO, de acuerdo a la metodología publicada.

2.3.2 Preparación de los fármacos control

Ciclofosfamida 1000 mg Polvo liofilizado para solución inyectable, Citarabina 500 mg Polvo liofilizado para solución inyectable, Cisplatino 50 mg Polvo liofilizado para solución inyectable. De cada una de estas drogas patrón se prepararon soluciones de concentraciones finales de 50, 5 y 0,5 ppm, utilizando agua destilada esteril.

2.3.3 Germinación de semillas

En 7 cajas petri se colocaron papeles de filtro previamente autoclavados y cortados del mismo diámetro de las cajas petri; se añadió un volumen de 5 mL de agua destilada estéril por caja y luego se adicionaron semillas de tomate (aprox. 100), se tapó las cajas y cubrió con parafilm, y se dejó germinar durante 3 días a una temperatura de 25°C, teniendo cuidado de no dejar secar la humedad de cada caja. Se realizó el mismo procedimiento para la germinación de semillas de lechuga, a diferencia de que una vez colocadas las semillas en las cajas petri, se dejó germinar durante 1 día. Para la prueba se utilizaron las semillas germinadas que tenían raíces de longitud de 0,5 cm.

2.3.4 Prueba biológica

En cada caja petri se colocaron discos de papel de filtro estériles y se embebieron con las soluciones de las drogas o extracto vegetal por evaluar, seguidamente se colocaron 7 semillas germinadas. Todas las pruebas fueron ejecutadas por triplicado y como controles negativos se usaron agua destilada estéril y DMSO a las concentraciones de trabajo (1000, 100 y 10 ppm). Finalmente las cajas fueron incubadas a 25°C por 4 días, concluido este tiempo se realizó la lectura de la longitud de las raíces.

2.3.5 Cálculo del % de inhibición

Para definir si el extracto o droga mostró actividad en esta prueba, se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{Long. raíz con la muestra evaluada}}{\text{Long. raíz en control}} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ crecimiento}$$

2.4 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD SOBRE ARTEMIA SALINA

Se trata de una prueba utilizada para la evaluación de la actividad tóxica general no específica de extractos vegetales, y en algunos laboratorios es utilizada como tamizaje preliminar en la búsqueda de agentes anticancerígenos ^{28, 29, 30, 31, 32, 33}, dado que se ha demostrado que existe una directa relación entre los valores de la DL₅₀ calculada y las pruebas anticancerígenas realizadas utilizando sistemas de cultivo *in vitro*, como las pruebas de disco de papa y células 9KB, 9PS, 3PS. ^{34, 35, 36, 37}

2.4.1 Preparación de extractos vegetales

Los extractos (fracción A, B, C, D y E) fueron procesados hasta obtener soluciones de concentración de 1000, 100, 10 ppm utilizando agua y DMSO, de acuerdo a la metodología publicada.

2.4.2 Preparación de los fármacos control

Ciclofosfamida 1000 mg Polvo liofilizado para solución inyectable, Citarabina 500 mg Polvo liofilizado para solución inyectable, Cisplatino 50 mg Polvo liofilizado para solución inyectable. De cada una de estas drogas patrón se prepararon soluciones de concentraciones finales de 500, 50 y 5 ppm, utilizando agua destilada esteril.

2.4.3 Prueba biológica

Día 1: En una cámara de eclosión, se colocó 8 g de huevecillos de Artemia salina y 80 mL agua de mar doblemente filtrado, a una temperatura de 37°C, con conexión de una bomba de oxígeno.

Día 2: Se disolvió 20 mg de la muestra en 2 mL de disolvente (0,5 mL de DMSO y 1,5 mL de agua de mar). A partir de esta solución se prepararon diluciones de 1000, 100, 10 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5 μ L respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración. Se realizó un control por muestra. Como la muestra fue apolar se le agregó al control 500 μ L de DMSO (para asegurar que no es el solvente el que actúa sobre las Artemias), y un control que solo recibe agua de mar (lo cual no debe producir mortalidad).

Día 3: Luego de 48 horas, y con ayuda de pipeta Pasteur, los nauplios de artemia fueron recogidos y distribuidos en un número de 10 por cada vial, las que contienen las soluciones de extractos vegetales, drogas (fármacos antineoplásicos) y controles.

Luego se agrega agua de mar hasta completar 5 mL por vial.

NOTA: Los nauplios pueden ser utilizados entre 48 a 72 horas de iniciada la incubación; a las 72 horas deben ser descartados.

Día 4: Después de 24 horas se cuenta y anota el número de sobrevivientes en cada dilución.

Se analizarán los datos con un programa estadístico para determinar valores de CL_{50} .³⁸

2.5 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN EMBRIONES DE ERIZO DE MAR (*Tetrapygus níger*)

Dos funciones distintas son llevadas a cabo por el acto de la fertilización: el primero tiene que ver con la iniciación de una complicada serie de cambios fisiológicos y morfológicos en el embrión. Estos cambios en las propiedades del embrión conducen al clivaje y el subsecuente desarrollo del embrión. Este aspecto de la fertilización es a menudo llamado activación.

En el presente caso esta prueba es utilizada como un método indirecto para evaluar mutagenicidad y teratogenicidad en el desarrollo embrionario de erizo de mar por considerar que si hay un cambio en el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión de erizo de mar y si las condiciones ambientales son las mismas, lo único que diferencia al grupo tratado del grupo control es el extracto de la planta, por tanto, el extracto de la planta estaría afectando el material genético de este animal causando problemas a nivel de la morfogénesis del mismo.^{39, 40} Entre los cambios que acompañan la unión del espermatozoide y el ovocito incluyen la formación y regresión del cono de fertilización que está relacionado con la penetración del espermatozoide para formar la membrana de fertilización que claramente se puede observar al microscopio en contraste de fase⁴¹.

Para la realización del bioensayo de citotoxicidad se recolectaron los erizos de mar en el distrito de Ancón, en horas de la mañana cuando la marea esta baja, apoyado en la tabla de mareas (Fuente: IMARPE).

2.5.1 Obtención de Gametos

Se abrió cuidadosamente al erizo por la parte dorsal, con ayuda de una tijera de disección, cortando en circunferencia, para no dañar los gametos.

El sexo animal se determinó al observar el color de los gametos. Los óvulos del *Tetrapygus níger* son de color granate y el esperma es cremoso. Se extrajeron los racimos de óvulos de tres erizos hembras con ayuda de una pinza limpia, y se colocaron en una solución de 500 mL de agua de mar doblemente filtrada hasta que se tiñeran de color púrpura. Se utilizó un oxigenador para mantener los óvulos viables, después de lo cual se procedió a lavarlos decantando el agua sobrenadante con la finalidad de eliminar el tejido celómico y restos

internos que se encontraban adheridos a los mismos, recambiando el agua de mar, doblemente filtrada, para luego completar la solución a 250 mL.

Los espermatozoides activos, a diferencias de los huevos, son viables sólo por un tiempo limitado en agua de mar. En una caja petri se colocan las gónadas masculinas de dos erizos de mar (de preferencia colocar las gónadas completas, sin maltratarlas).

2.5.2 Fertilización

Se agregó dos gotas de espermatozoides con ayuda de una pipeta Pasteur, sobre el beaker que contenía la suspensión de óvulos lavados listos para ser fecundados. Agitar suavemente los espermatozoides y los óvulos con una pipeta Pasteur limpia para que ocurra la fecundación. La fecundación se comprueba mediante la observación al microscopio, de la membrana de fertilización.

La observación del óvulo fecundado significó que el procedimiento de fertilización se realizó en condiciones óptimas.

2.5.3 Preparación de las muestras

Se pesó 100 mg de cada uno de las fracciones del extracto (fracción A, B, C, D y E) y se diluyó en 4 mL de agua de mar filtrada, más 10 μ L de DMSO. A partir de esta solución stock se tomó: 100 μ L, 50 μ L y 25 μ L de los extractos y se añadió a cada uno de los viales que contenían 2 mL de agua de mar doblemente filtrada, realizándose este procedimiento por triplicado.

Luego se añadió 3 mL de agua de mar con los huevos previamente fecundados.

Los controles son de dos tipos: controles positivos, donde cada vial contendrá 2 mL de agua de mar doblemente filtrada, con huevos fecundados de erizo de mar y 10 μ L de DMSO, y controles negativos, que sólo contendrán 2 mL de agua de mar doblemente filtrada.

Los viales con las diferentes concentraciones del extracto fueron colocados en un shaker (oxigenador) dentro de la incubadora, a temperatura entre 10 y 15°C.

2.5.4 Bioensayo de citotoxicidad

Después de 3, 6, 18, 24 y 48 horas se observó en el estereoscopio las células de embriones de erizo de mar, para visualizar el estadio de desarrollo embrionario en que se encuentran.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

Se determinó la presencia de los siguientes metabolitos primarios y secundarios: grupos fenólicos libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, alcaloides y catequinas.

CUADRO N° 2. Resultados de presencia (+) o ausencia (-) de metabolitos en la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil.

FRACCIÓN	METABOLITOS SECUNDARIOS							
	TANINOS		FLAVONOIDES	ESTEROIDES Y/O TERPENOIDES	ANTRAQUINONAS	ALCALOIDES	CATEQUINAS	SAPONINAS
	{Rx. Cloruro férrico}	{Rx. Gelatina-Sal}	{Rx. Shinoda}	{Rx. Liebermann Burchard}	{Rx. Bornträger}	{Rx. Dragendorff y Mayer}	{Rx. de Rosenheim}	{Prueba de espuma}
A	+	-	+					-
B				+	-			
C				+		+		
D	+	-	+	+		+	+	
E	+	-	+				+	

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNICA – Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Productos Naturales

3.2 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CITOSTÁTICA

3.2.1 Ensayo de Inhibición de Germinación de semillas de tomate y lechuga

CUADRO N° 3. Porcentaje de inhibición del extracto de raíz realizadas en semillas de tomate.

SEMILLAS	PARTE USADA	CONCENTRACIÓN	% INHIBITORIO
TOMATE	RAÍZ	1000 ppm	36
		100 ppm	1.03
		10 ppm	0.61

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNICA – Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Productos Naturales

CUADRO N° 4. Porcentaje de inhibición del extracto de raíz realizadas en semillas de lechuga.

SEMILLAS	PARTE USADA	CONCENTRACIÓN	% INHIBITORIO
LECHUGA	RAÍZ	1000 ppm	25
		100 ppm	6.06
		10 ppm	4.72

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNICA – Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Productos Naturales

CUADRO N° 5. Porcentaje de inhibición de los fármacos antineoplásicos, realizadas en semillas de tomate.

SEMILLAS	FÁRMACOS	CONCENTRACIÓN	% INHIBITORIO
TOMATE	CICLOFOSFAMIDA	50 ppm	18.23
		5 ppm	10.96
		0.5 ppm	7.58
	CITARABINA	50 ppm	59.36
		5 ppm	35.85
		0.5 ppm	0.89
	CISPLATINO	50 ppm	88.98
		5 ppm	81
		0.5 ppm	36

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNICA – Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Productos Naturales

CUADRO N° 6. Porcentaje de inhibición de los fármacos antineoplásicos, realizadas en semillas de lechuga.

SEMILLAS	FÁRMACOS	CONCENTRACIÓN	% INHIBITORIO
LECHUGA	CICLOFOSFAMIDA	50 ppm	43.93
		5 ppm	18.11
		0.5 ppm	2.94
	CITARABINA	50 ppm	59
		5 ppm	8.82
		0.5 ppm	8.33
	CISPLATINO	50 ppm	60.62
		5 ppm	46.9
		0.5 ppm	2.94

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNICA – Farmacia y Bioquímica Laboratorio de Productos Naturales

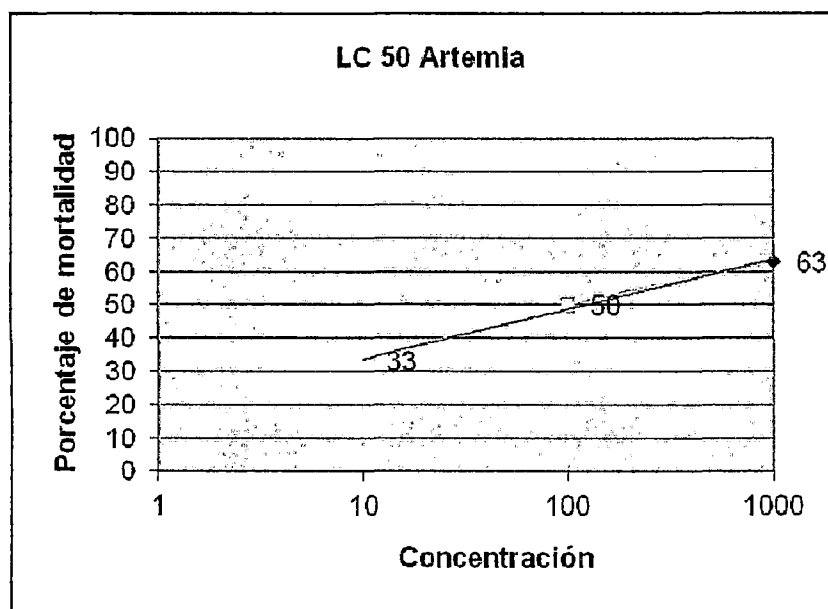
3.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

3.3.1 Bioensayo de citotoxicidad sobre Artemia salina

CUADRO N° 7. Concentración Letal media (CL_{50}) en fracción A del extracto etanólico de raíz.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	63	3
100	50	2
10	33	1

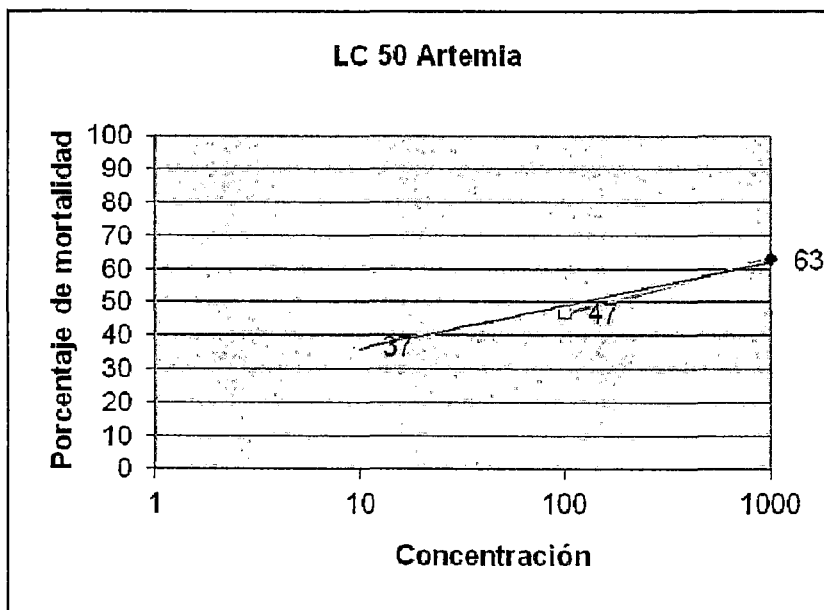
Valor de r	LC 50
0.997050141	122.5646538



CUADRO N° 8. Concentración Letal media (CL_{50}) en fracción B del extracto etanólico de raíz.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	63	3
100	47	2
10	37	1

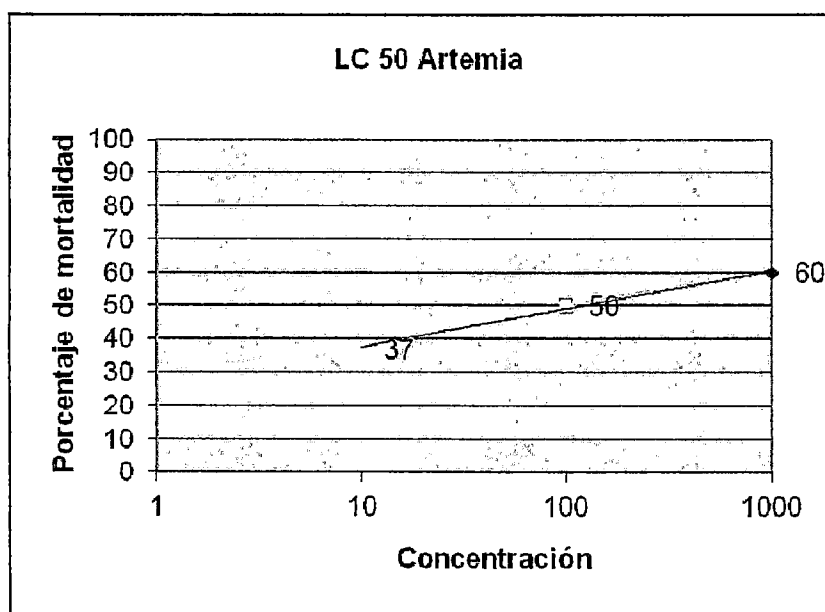
Valor de r		LC 50
0.991240707	2.075581395	119.0094355



CUADRO N° 9. Concentración Letal media (CL_{50}) en fracción C del extracto etanólico de raíz.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	60	3
100	50	2
10	37	1

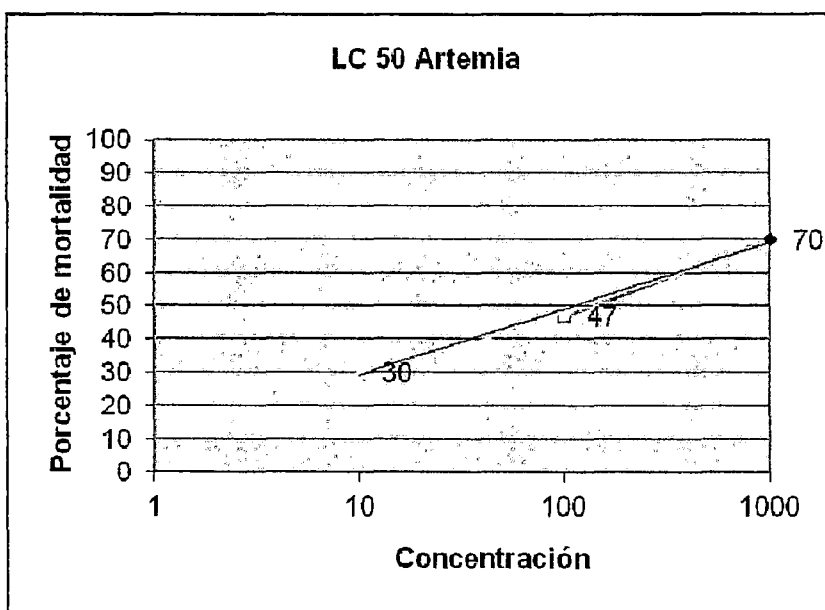
Valor de r	LC 50
0.997176465	122.0298747



CUADRO N° 10. Concentración Letal media (CL_{50}) en fracción D del extracto etanólico de raíz.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	70	3
100	47	2
10	30	1

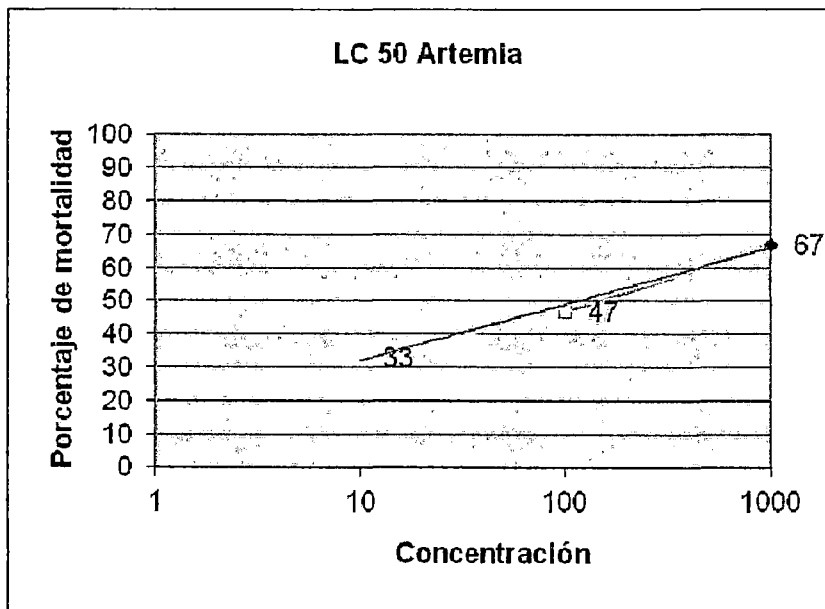
Valor de r	LC 50
0.996270963	112.105725



CUADRO N° 11. Concentración Letal media (CL_{50}) en fracción E del extracto etanólico de raíz.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
1000	67	3
100	47	2
10	33	1

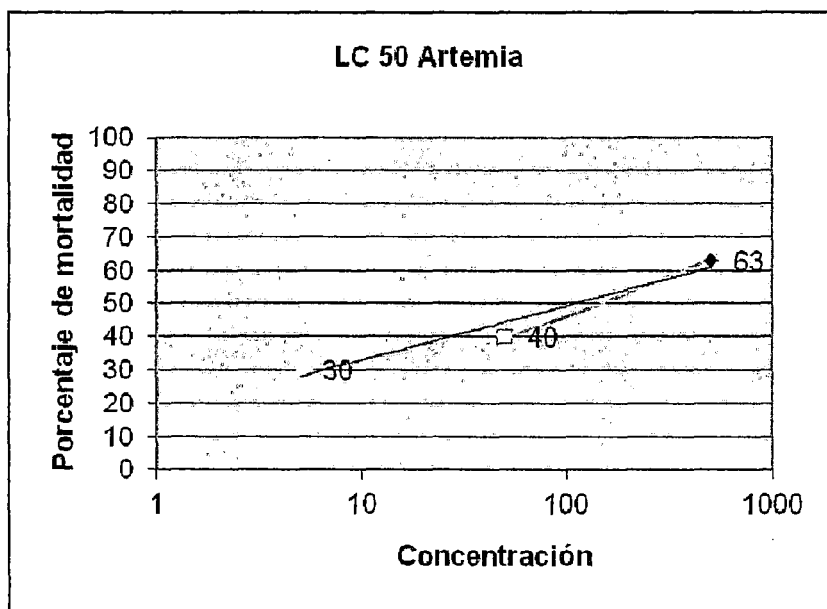
Valor de r	LC 50
0.994849751	114.3455264



CUADRO N° 12 Concentración Letal media (CL₅₀) en Ciclofosfamida.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
500	63	2.698970004
50	40	1.698970004
5	30	0.698970004

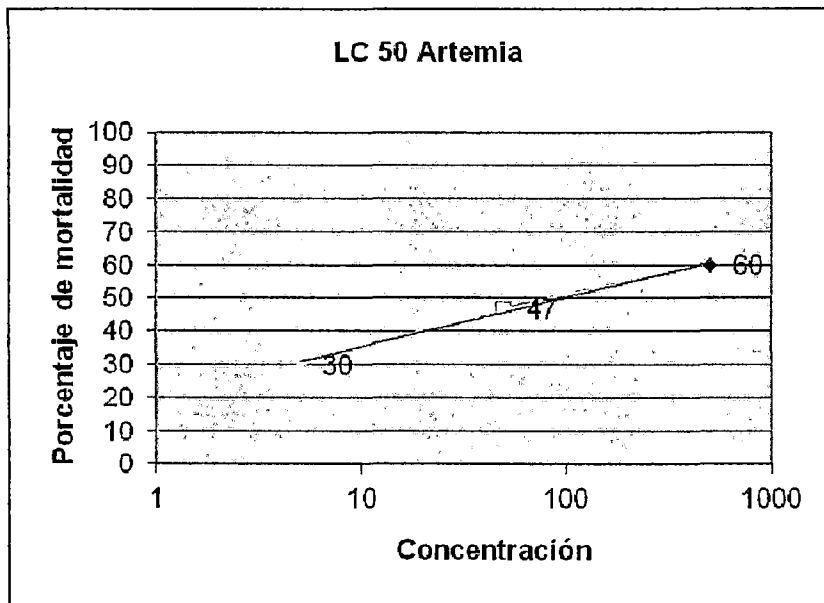
Valor de r	LC 50
0.97509738	106.0504451



CUADRO N° 13 Concentración Letal media (CL_{50}) en Citarabina.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
500	60	2.698970004
50	47	1.698970004
5	30	0.698970004

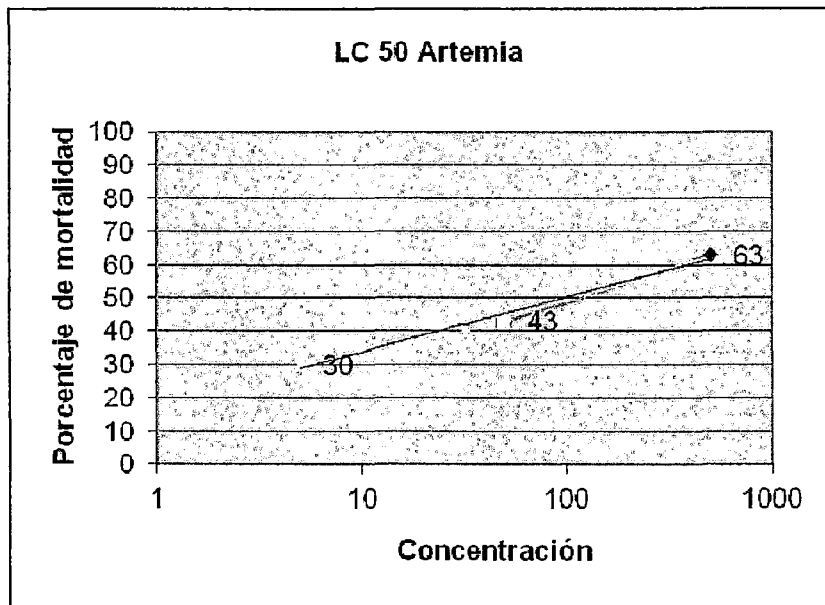
Valor de r	LC 50
0.997050141	96.8628056



CUADRO N° 14 Concentración Letal media (CL_{50}) en Cisplatino.

CONCENTRACION (ppm)	Porcentaje de Mortalidad	Logaritmo de la concentración
500	63	2.698970004
50	43	1.698970004
5	30	0.698970004

Valor de r		LC 50
0.992584082	1.977618979	94.97711622



3.3.2 Bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar

CUADRO N° 15 Células según estadio de desarrollo, en erizo de mar.

	Concentración	Huevo o cigoto	Mórula	Blástula	Gástrula	Prisma	Pluteus T
		Inicio	3 h	6 h	18 h	24 h	48 h
CONTROL +	Agua de mar + DMSO	V	V	V	V	V	V
	Agua de mar + DMSO	V	V	V	V	V	V
CONTROL -	Agua de mar	V	V	V	V	V	V
	Agua de mar	V	V	V	V	V	V
FRACCIÓN A	500 ppm	M	-	-	-	-	-
	250 ppm	M	-	-	-	-	-
	125 ppm	M	-	-	-	-	-
FRACCIÓN B	500 ppm	M	-	-	-	-	-
	250 ppm	M	-	-	-	-	-
	125 ppm	M	-	-	-	-	-
FRACCIÓN C	500 ppm	M	-	-	-	-	-
	250 ppm	M	-	-	-	-	-
	125 ppm	M	-	-	-	-	-
FRACCIÓN D	500 ppm	M	-	-	-	-	-
	250 ppm	M	-	-	-	-	-
	125 ppm	M	-	-	-	-	-
FRACCIÓN E	500 ppm	M	-	-	-	-	-
	250 ppm	M	-	-	-	-	-
	125 ppm	M	-	-	-	-	-

M = Muerte; V = Vivo

FUENTE: Datos obtenidos por el autor UNMSM – Ciencias Biológicas Laboratorio de Biología Celular y genética

IV. DISCUSIÓN

Los métodos utilizados para el estudio de la actividad citotóxica y citostática de la *Grindelia tarapacana* Phil. son ampliamente aceptados y utilizados en numerosos estudios de investigación, debido a su simplicidad y a su confiabilidad.

Hasta el momento aún no se han realizado estudios sobre la citotoxicidad ni actividad farmacológica del extracto etanólico de raíz de *Grindelia tarapacana* Phil., razón por la cual no podemos hacer comparaciones de resultados para dicha especie.

Para evaluar las actividades atribuidas a esta especie vegetal se realizó diversos ensayos en los cuales hemos podido observar:

En el screening fitoquímico nos muestra la presencia de: grupos fenólicos libres en las fracciones A, D y E; flavonoides en las fracciones A, D y E; esteroides y/o triterpenoides en las fracciones B, C y D; alcaloides en las fracciones C y D, y catequinas en las fracciones D y E.

En la fracción D se observa presencia de grupos fenólicos libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, alcaloides y catequinas (cuadro N° 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de germinación de semillas de tomate, el porcentaje inhibitorio 36%, es similar al del cisplatino a 0.5 ppm (36%) y citarabina a 5 ppm (35.85%) (cuadros N° 3 y 5); y en germinación de semillas de lechuga, el porcentaje inhibitorio 25%, es mayor al de ciclofosfamida a 5 ppm (18.11%) pero menor al de cisplatino a 5 ppm (46.9%) (cuadros N° 4 y 6).

En el bioensayo de citotoxicidad sobre *Artemia salina* tuvo como resultado una CL₅₀ de: 122.56 ppm para la fracción A (cuadro N° 7), 119.00 ppm para la fracción B (cuadro N° 8), 122.02 ppm para la fracción C (cuadro N° 9), 112.10 ppm para la fracción D (cuadro N° 10), 114.34 ppm para la fracción E (cuadro N° 11), 106.05 ppm para ciclofosfamida (cuadro N° 12), 96.86 ppm para Citarabina (cuadro N° 13) y 94.97 ppm para Cisplatino (cuadro N° 14), siendo la fracción D el más activo.

Según las pruebas fitoquímicas cualitativas, los metabolitos secundarios esteroides y/o triterpenos y flavonoides, posiblemente sean los que están actuando favorablemente en la actividad citotóxica de las fracciones que presentaron actividad. A los triterpenos y saponinas triterpénicas se les ha comprobado propiedades farmacológicas importantes, entre ellas una buena actividad citotóxica en varias líneas celulares derivadas de tumores humanos, como lo referencia Sparg *et al* (2004) para varias familias botánicas y Cheng *et al* (2002) y Setter *et al* (2003) para especies de la familia rubiaceae.

Uno de los géneros más estudiado ha sido el género *Uncaria*, en la especie *U. rhynchophylla* se encontraron varios esteroides triterpenos tetracíclicos y ácidos uncarínicos, los cuales inhibieron el crecimiento de las líneas celulares de cáncer A-549, HCT-15, MCF-7 y HT-1197. Heitzman *et al* (2005).

Los flavonoides presentan una amplia variedad de propiedades biológicas beneficiosas: antimutagénicas, anticarcinogénicas y antioxidantes como lo referencia Kanadaswani y Cols (2005) y Hoensch y Cols (2005). Diversas plantas ricas en flavonoides se utilizan en la medicina asiática como agentes terapéuticos desde hace años, donde la incidencia de cáncer de próstata, colon y mama es menor. Trabajos *in vitro* con flavonoides han mostrado un efecto antitumoral al inhibir el crecimiento del ciclo celular vía quinasas, inducir apoptosis y suprimir la secreción de metaloproteinasas y de la invasión tumoral. También inactivan radicales libres y previenen la lípido-peroxidación. Estudios *in vivo* muestran que una dieta rica en flavonoides mejora la actividad antitumoral (Kanadaswani y Cols, 2005) e incluso estudios epidemiológicos recientes han mostrado que una dieta rica en frutas y verduras previenen la aparición de neoplasias intestinales según Hoensch y Cols (2005).

En la evaluación de citotoxicidad en embriones de erizos de mar, al cabo de 6 horas se observó en el microscopio las diferentes fases del desarrollo embrionario del erizo de mar: primeros clivajes, mórula, blástula, gástrula, prisma y pluteus, notándose que los resultados fueron significativos ya que a las concentraciones de 500, 250 y 125 ppm de tratamiento, frente a los controles positivos y negativos alcanzaron el estadio de desarrollo de huevo o cigoto, por lo cual se afirma que las fracciones del extracto etanólico de raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. a las concentraciones ensayadas presentan efecto embriotóxico, realizándose de acuerdo a la técnica de Gustafson (1971) y

Estus (1989), que en el presente caso fue utilizada como un método indirecto para evaluar mutagenicidad y teratogenicidad en el desarrollo embrionario de erizo de mar desde el momento de la fecundación hasta la aparición de la larva pluteus, por considerar que si hay un cambio en el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión de erizo de mar y si las condiciones ambientales son las mismas, lo único que diferencia al grupo tratado del grupo control son las fracciones del extracto de la planta. Se puede afirmar que las 5 fracciones presentaron muerte celular (cuadro N° 15).

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha cumplido un papel importante en el tratamiento del cáncer, evidenciado en que la mayoría de aplicaciones clínicas de metabolitos secundarios y derivados de plantas se han empleado durante la última mitad de siglo, en combatir el cáncer. Alrededor de 100 componentes derivados de productos naturales están actualmente en ensayos clínicos y al menos 100 proyectos similares están en desarrollo preclínico.

Como podemos observar el extracto etanólico de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. tiene actividad citotóxica.

Los resultados de este estudio evidencian sustento en su uso como anticancerígeno en la medicina tradicional. Sería interesante que futuros estudios continúen evaluando las propiedades de la *Grindelia tarapacana* Phil. y sobre todo los compuestos de sus raíces, las cuales poseen un potencial como fuente de nuevas sustancias anticancerígenas, más aun teniendo en cuenta la amplia distribución de esta planta en nuestro país.

V. CONCLUSIONES

De la evaluación de la actividad Citotóxica y Citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana Phil.* "Escobita". podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Mediante el screening fitoquímico se obtuvieron 5 fracciones, en las que se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: grupos fenólicos libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, alcaloides y catequinas.
2. La evaluación citotóxica sobre *Artemia salina*, mostró que la fracción D presentó mayor actividad citotóxica con un CL₅₀ de 112.10 ppm.
3. *Grindelia tarapacana Phil.* posee acción citostática sobre las semillas de tomate y lechuga con 36% y 25% de inhibición, respectivamente.
4. *Grindelia tarapacana Phil.* posee acción citotóxica sobre los embriones de erizo de mar.
5. En el ensayo de inhibición de germinación de semillas de tomate, el porcentaje inhibitorio 36%, es similar al del cisplatino a 0.5 ppm (36%) y citarabina a 5 ppm (35.85%); y en germinación de semillas de lechuga, el porcentaje inhibitorio 25%, es mayor al de ciclofosfamida a 5 ppm (18.11%) pero menor al de cisplatino a 5 ppm (46.9%).

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir con las investigaciones de la especie, para el aislamiento y determinación estructural de metabolitos secundarios presentes en esta especie.
2. Realizar ensayos farmacológicos con líneas celulares antitumorales del extracto etanólico de *Grindelia tarapacana* Phil.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Kate T, "Benefit sharing study, the Sarawak Program". National Cancer Institute, Washinton, (1998).
2. Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles en el Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Cuzco – Perú (1999).
3. Desmarchelier C, Witting SF. Sesenta Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana Ecología, Etnomedicina y Bioactividad. (2000) ISBN: 9972-9186-0-2.
4. Avendaño C, Introducción a la Química Farmacéutica. Edit. Mc Graw-Hill. ISBN: 8448603613. ISBN-13: 9788448603618. 2^{da} Edición.
5. Berkow R. "El manual de Merck de Diagnóstico y terapéutica". 9^{na} Edición, 1994. Impreso en España.
6. Litter M. "Farmacología Experimental y Clínica". 7ma Edición. Edit. El Ateneo, impreso en Buenos Aires – Argentina, 1988, p. 1740.
7. Beltrán H, Granda A, León B, Sagástegui A, Sánchez I y Zapata M. "Asteraceae Endémicas del Perú". ISSN 1727-9933.
8. Franco León J; Sulca Quispe L; Cáceres Musaja C. Asteráceas comunes de la provincia de Candarave – Departamento de Tacna y su importancia como Recurso Natural.
9. Pietrellini F. Las plantas medicinales en un piso alto y mesoandino. Estudio etnobotánico en la zona de Puquio (Ayacucho), 2007.
10. Fidler I, Hart I. (1982). Biological diversity in Metastatic neoplasm: Origins and implications. Science, 217: 998-1003.
11. Mareel M, Van Roy F, De Baetselier P. (1990). The invasive phenotypes. Cancer metastasis Rev., 9 (1): 45-62.
12. Kastan M, Barkak J. (2004). Cell cycle checkpoints and cancer. Nature, 32: 316-323.
13. Ford JM (2004). Clinical oncology, 11: 191-205.

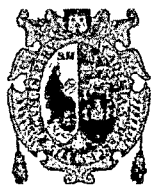
14. Repetto M. Toxicología fundamental. Métodos alternativos, toxicidad *in vitro*. Sevilla - España: Ediciones Díaz de Santos, ENPSES-Mercie Group. 3^{ra} Edición, 2002. p. 303-305.
15. Martínez MT, García F, Hernández MJ, Manzanera Saura JT, Garrigós JA. Los Citoestáticos. ISSN 1695-6141. 2002.
16. Sawyers C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432: 294-297.
17. Shukla Y, Pal SK (2004). Complementary and alternative cancer therapies: past, present and the future scenario. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 5 (1): 3-14.
18. Takaray K, Haribe S, Obata Y. (2005). Effects of 19 herbal extracts on the sensitivity to paclitaxel or 5-fluoracil in HeLa cells. *Bio Pharm Bull*, 28 (1): 138-142.
19. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11^{ma} Edición.
20. Grochow L. "A clinician Guide to Chemotherapy Pharmacokinetics and Pharmacodynamics". 1998.
21. Koopman W. Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology. 2 volúmenes, 2005.
22. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1996.
23. Cornelison TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol Oncol*. 1993.
24. Lock de Ugaz O. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Fondo editorial, PUCP Lima – Perú, 1994.
25. Irahola P. "Manual de ensayo de Inhibición de Germinación de semillas". Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas (II FB). Manual N° 004-Julio 1998.
26. Giménez Turba A. Manual de ensayo de Inhibición de Germinación de semillas. UNAS-FCFB. Julio-1998, Manual N° 004 II FB.
27. Ticona V. "Evaluación *in vitro* de la actividad citostática/citotóxica presente en extractos de especies vegetales empleadas por la Etnia

- Tacana". Tesina de Grado de la Carrera de Química Farmacéutica, Tutores: Dr. A. Giménez y Lic. P. Irahola, UMSA, La Paz – Bolivia, 1997.
28. Pozo X, Irahola P y Giménez A. "Metodología y Potencial del tamizaje de plantas medicinales utilizando la prueba de la Artemia salina" BIOFARBO; Vol V, 87-94; Enero (1997).
 29. Morales G y McLaughlin JL. "3 β -o-Palmityl longispinogenin from trichocereus Chilensis". Journal of Natural Products. 1989. p. 38-52.
 30. Anderson JE, Mckenzie AT, Byen S, McLaughlin JL. "Tubulosine: an Antitumor constituent of Pogonopus speciosus". Lloydia, 1990. p. 53, 1009.
 31. Fang YP, Anderson JE, Chang ChJ y McLaughlin TL. "Two new Styryllactones, y Deoxygoniopypyrone and 7-epi-goniofuffurone, from Goniothalaus giganteus". Lloydia, 1991. p. 54, 1034.
 32. Hui YH, Ruppercht JK, Lui YM, Anderson JK. "Bullatasin and bullatacinone two highly potent bioactive acetogenins from Annona bullata", Journal of Natural Products, 1989. p. 52, 463.
 33. Anderson, JK, Chang ChJ, Smith D y McLaughlin JL. "Majorenolide and majorynolide: A new pair of Citotoxic and pesticidal alkyne d-lactones from Persea major", Journal of Natural Products, 1989.
 34. Meyer BN, Ferrigini NR, Outnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE y McLaughlin JL. "Brine Shrimp: A convinient general bioassay for active plant constituent", Journal of Medicinal Plant research, 1982.
 35. Solís P, Wright C, Anderson M, Gupta M y Phillipson D. "A microwell Cytotoxicity assay using Artemia Salina (Brine shrimp)", Journal of Medicinal Plant Research, 1992.
 36. Jung JH, Pummangura S, Chaichangpyuth C, Patarapanich C y McLaughlin JL. "Bioactive constituents of Melodorum fruticosum (Anonaceae)", Phytochemistry, 1990. p. 29, 1667.
 37. Sigel M, Mats J, Gilmore CJ y Brayan RF "Structure and Stereochemistry of Jatrophone novel macroeyclin diterpenoid tumor inhibitor", Journal American Chem. Soc. 1976. p. 98, 2295.
 38. Finney DJ. Statistical method in biological assay. 3^{ra} Ed. Hafner, 1978.
 39. Estus S, Blumer JL. Critical period of phenytoin teratogenic action in the sea urchin, Arbacia punctulata embryo. J Pharmacol Exp Nov 1989.

40. Gustafsson T. How genes control morphogenesis. *American Scientist*, 1971; 59: 452-462.
41. Casually L. Anticancer agents based on natural products models. New York: Academic Press, 1980; p. 250-2.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Constancia de la Clasificación Taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA N° 289-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Mayra Rosario FLORES URIBE** y **Jorge Luis JAYO PACHECO** de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Grindelia tarapacana Phil.***; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Grindelia*

ESPECIE: *Grindelia tarapacana Phil.*

Nombre vulgar: "Escobita".

Determinado por: Dra. Haydeé Montoya (José Campos).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 17 de octubre de 2012



Dra. HAYDEÉ MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO N° 2: Esquema del ensayo de la Actividad Citotóxica en embriones de erizo de mar



FIGURA N°12 Recolección de erizos de mar en el mar de Ancón



FIGURA N°13 Con una tijera de disección, abrir cuidadosamente al erizo por la parte dorsal, en circunferencia, para no dañar los gametos.

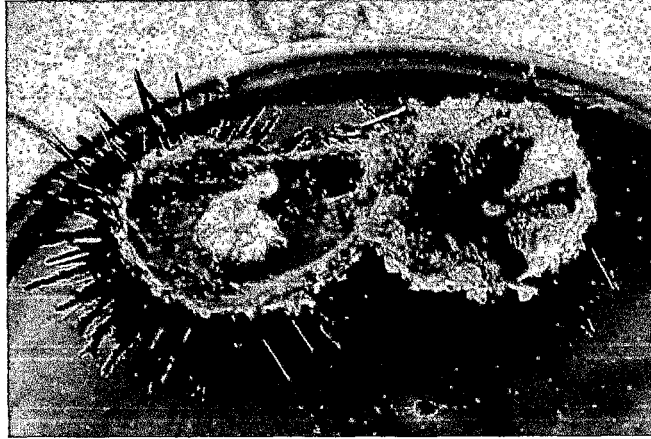


FIGURA N°14 El sexo animal se determinó al observar el color de los gametos. Los óvulos del *Tetrapygus niger* son de color granate.

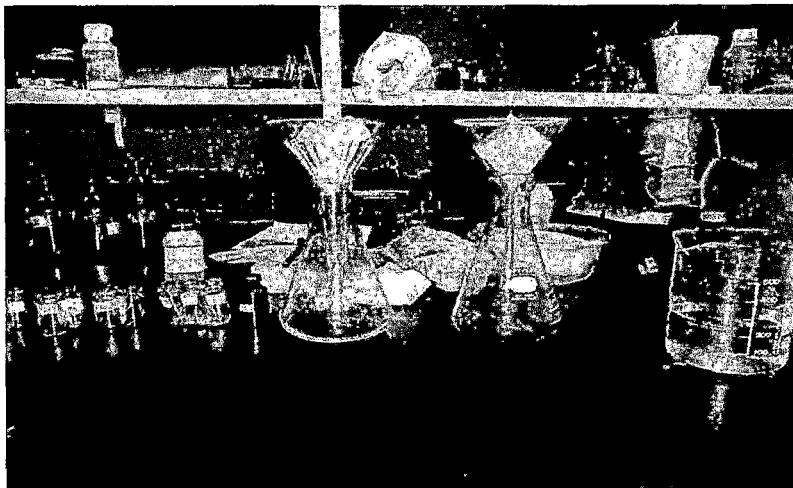


FIGURA N°15 Se utiliza agua de mar doblemente filtrada.



FIGURA N°16 Se extrajeron los racimos de óvulos con ayuda de una pinza limpia, y se colocaron en agua de mar filtrada.



FIGURA N°17 Obtención de gametos masculinos de erizo de mar.

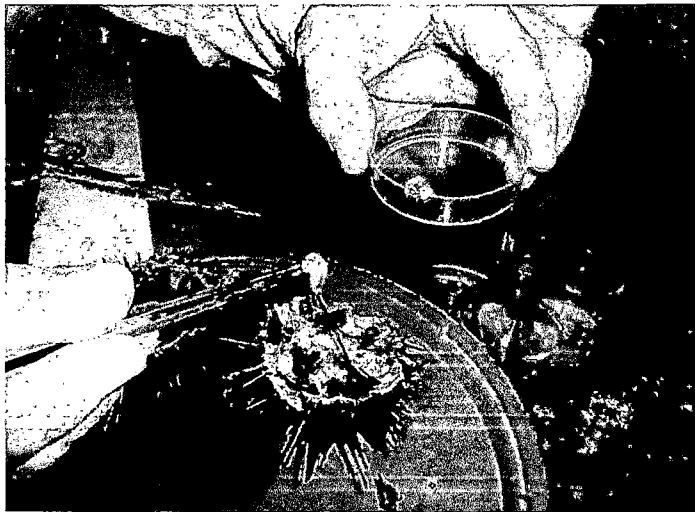


FIGURA N°18 En una caja petri se colocan las gónadas masculinas del erizo de mar (de preferencia colocar las gónadas completas, sin maltratarlas).

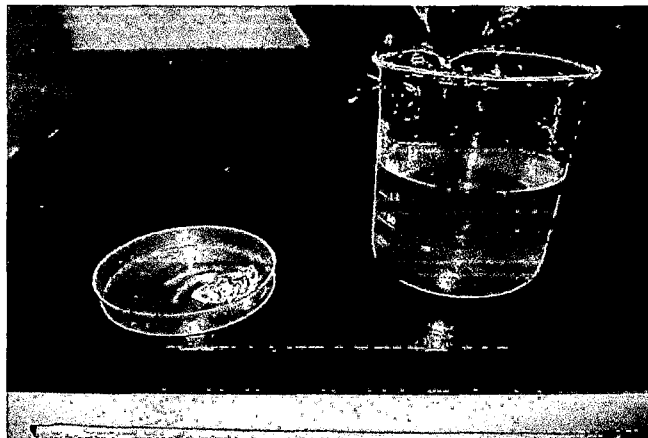


FIGURA N°19 Gónadas masculinas y femeninas de erizo de mar.

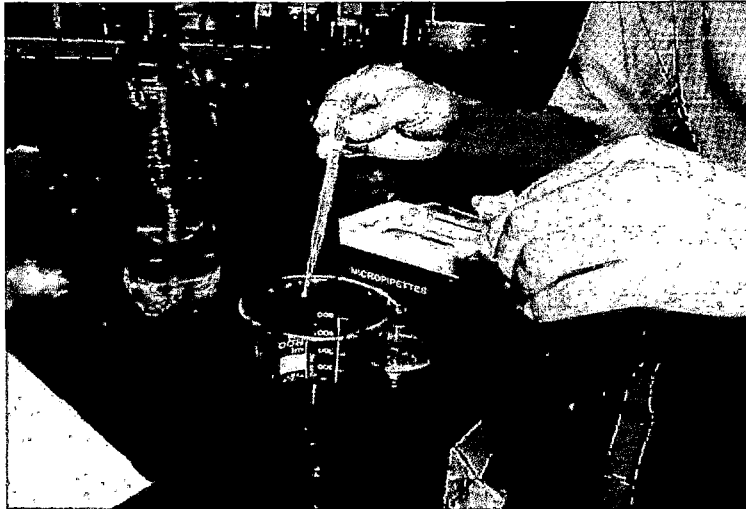


FIGURA N°20 Agregar dos gotas de espermatozoides sobre el beaker que contiene la suspensión de óvulos listos para ser fecundados. Luego agitar suavemente para que ocurra la fecundación.

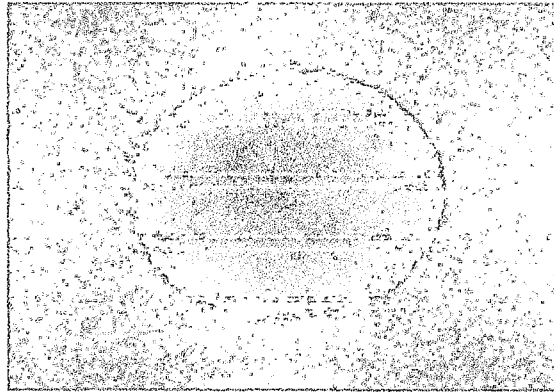


FIGURA N°21 La fecundación se comprueba mediante la observación al microscopio, de la membrana de fertilización.

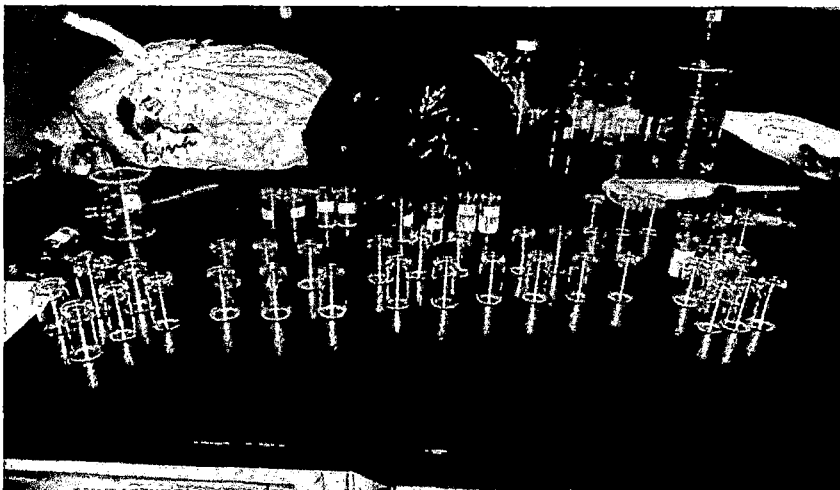


FIGURA N°22 Preparación de las muestras.



FIGURA N°23 Los viales con las diferentes concentraciones del extracto fueron colocados en un shaker dentro de la incubadora, a temperatura entre 10 y 15°C.

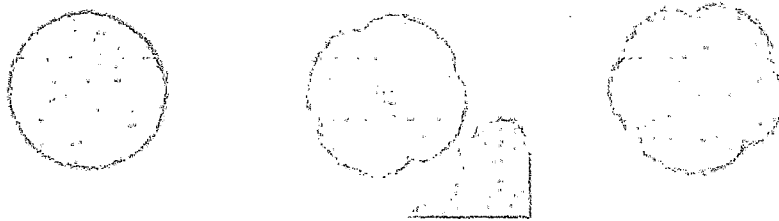


FIGURA N°24 Después de 3, 6, 18, 24 y 48 horas se observó en el estereoscopio las células de embriones de erizo de mar, para visualizar el estadio de desarrollo embrionario en que se encuentran.



Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica
Facultad de Farmacia y Bioquímica



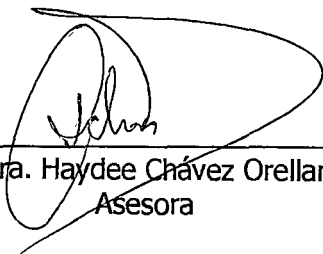
Constancia

Dra. Carmela Ferreyra Paredes, profesora principal de la cátedra de Farmacología del Departamento Académico de Ciencias Farmacéuticas y **Dra. Haydee Chávez Orellana**, profesora principal de la cátedra de Química Orgánica del Departamento Académico de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, como Asesoras de la presente Tesis.

CERTIFICAN:

Que el Bachiller Jorge Luis Jayo Pacheco, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo titulado "Determinación de la actividad Citotóxica y Citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. Escobita" para optar el título de Químico Farmacéutico, considerándola finalizada y reuniendo los requisitos de calidad necesarios, autorizan su presentación para que sea juzgada por el jurado correspondiente.

Ica, 29 de Abril del 2015



Dra. Haydee Chávez Orellana
Asesora



Dra. Carmela Ferreyra Paredes
Asesora



Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Constancia

Mag. Fernando Retuerto Prieto, profesor principal de la cátedra de Biología Celular y Genética del Departamento Académico de Genética y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, como Asesor de la presente Tesis.

CERTIFICA:

Que el Bachiller Jorge Luis Jayo Pacheco, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo titulado "Determinación de la actividad Citotóxica y Citostática del extracto etanólico obtenido de la raíz de *Grindelia tarapacana* Phil. Escobita" para optar el título de Químico Farmacéutico, considerándola finalizada y reuniendo los requisitos de calidad necesarios, autorizo su presentación para que sea juzgada por el jurado correspondiente.

Ica, 24 de Abril del 2015

Mag. Fernando Retuerto Prieto
Asesor