

CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS HELA DE EXTRACTOS DE TRES ESPECIES DE PLANTAS MEDICINALES DE HIDALGO, MÉXICO

M.A. Villavicencio Nieto, B.E. Pérez Escandón, E. Mendoza Pérez

Laboratorio de Etnobotánica. Centro de Investigaciones Biológicas

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Correo electrónico: mavn3@hotmail.com

V. Maldonado Lagunas

Instituto Nacional de Cancerología

RESUMEN

Se evaluó la citotoxicidad en cultivos de células HeLa de los extractos etanólicos de tres especies de plantas, *Juniperus deppeana*, *Solanum rostratum* y *Bidens odorata*, que se utilizan tradicionalmente en dos regiones del estado de Hidalgo, México, para el tratamiento de heridas, úlceras, tumores y cáncer de matriz. La citotoxicidad más elevada la presentó el extracto de *J. deppeana* ($CI_{50} = 4.63 \mu\text{g/ml}$), el cual fue separado por cromatografía en placa de gel de sílice y la fracción principal ($R_f = 0.28$) mostró actividad citotóxica ($CI_{50} = 0.79 \mu\text{g/ml}$). Aunque menor, el extracto de *S. rostratum* también presentó citotoxicidad ($CI_{50} = 127.5 \mu\text{g/ml}$). *B. odorata* fue inactiva.

Palabras clave: *Juniperus deppeana*, *Solanum rostratum*, *Bidens odorata*, plantas medicinales, Hidalgo, México, citotoxicidad, HeLa.

ABSTRACT

Ethanollic extracts of three medicinal plants, *Juniperus deppeana*, *Solanum rostratum* and *Bidens odorata*, which are used in

folk medicine in Hidalgo, Mexico, for the treatment of wounds, ulcers, tumors and cancer, were tested in a HeLa cell line to evaluate their cytotoxic activity. The highest cytotoxicity was found in the extract of *J. deppeana* ($IC_{50} = 4.63 \mu\text{g/ml}$); hence, this extract was separated via chromatography on a silica gel plate, from which the main fraction ($R_f = 0.28$) showed strong cytotoxic activity ($IC_{50} = 0.79 \mu\text{g/ml}$). Whereas the extract of *S. rostratum* also exhibited cytotoxicity ($IC_{50} = 127.5 \mu\text{g/ml}$), that of *B. odorata* was inactive.

Key words: *Juniperus deppeana*, *Solanum rostratum*, *Bidens odorata*, medicinal plants, Hidalgo, Mexico, cytotoxicity, HeLa.

INTRODUCCIÓN

En México (INEGI, 2006a) los tumores (neoplasias) son la tercera causa de mortalidad. En esta categoría, en el estado de Hidalgo los tumores malignos del cuello del útero son la primera causa de defunción femenina (INEGI, 2006b). En la medicina alopática los principales medios para tratar a personas con cáncer son la cirugía, las radiaciones y la quimioterapia (Stehman

et al., 2003). En los diferentes sistemas de medicina tradicional del mundo, desde la antigüedad se usan plantas para tratar y prevenir distintos tipos de cáncer (U.S. Congress Office of Technology, 1990; Sumner, 2001). Desde 1950 se empezaron a evaluar las propiedades citotóxicas de los extractos de plantas, lo que ha dado como resultado el hallazgo de medicamentos como los alcaloides vinblastina y vincristina, obtenidos de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), que se usan para tratar leucemia infantil, así como el taxol, aislado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), que es empleado para el cáncer de seno, cerebro y ovarios entre otras sustancias (Lee, 2004). Estudios más recientes, como el de Mans *et al.* (2000), reportaron los efectos citotóxicos que producen *in vitro* los extractos de aproximadamente 500 especies de la flora brasileña; Betancur-Galvis *et al.* (2002), encontraron que seis de diez especies de *Euphorbia* utilizadas en Colombia para tratar cáncer y tumores, presentaron citotoxicidad en HeLa y otras líneas celulares; Suffredini *et al.* (2007) probaron los extractos de 351 especies de la flora de Brasil en cultivos de células de cuatro tipos de tumores; en México se encontró que los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae), una de las llamadas “hierbas del cáncer”, mostraron citotoxicidad ligera en la línea de células de cáncer de cérvix y nula en la de carcinoma nasofaríngeo y la de colon (Waizel-Bucay *et al.*, 2003), mientras que las fracciones de un extracto acetona-agua presentaron una dosis efectiva 50, ED₅₀, de 0.418 y 2.40 µg/ml en la línea DU-145 de carcinoma de próstata (Ávila *et al.*, 2004). En el estado de Hidalgo las plantas medicinales se utilizan para tratar una serie de padecimientos, entre los que se encuentra el cáncer (Pérez Escandón *et al.*, 2003); al

estudiar a cinco de estas especies de plantas se encontró que el extracto etanólico crudo de hojas de *Cupressus lusitanica* Klotzsch (Cupressaceae) resultó citotóxico en un panel de líneas celulares de cáncer y que la muerte celular es por apoptosis (López, 2001; López *et al.*, 2002), el proceso activo de muerte celular dirigido por activación de genes, el cual se encuentra disminuido en distintos tipos de cáncer (Albert *et al.*, 1998). En Omitlán se beben por separado las infusiones acuosas de las ramas de *Juniperus deppeana* Steud. (Cupressaceae) y de *Bidens odorata* Cav. (Asteraceae) para tratar el cáncer de matriz, y en Zempoala las infusiones acuosas de ramas de *Solanum rostratum* Dun. (Solanaceae) se utilizan en lavados vaginales para el tratamiento de este mismo padecimiento (Pérez Escandón *et al.*, 2003). El presente estudio se planteó con el objetivo de evaluar la actividad citotóxica en cultivos de células HeLa de los extractos etanólicos y fracciones cromatográficas de estas tres especies de plantas.

MÉTODOS

COLECTAS

En Omitlán, Hidalgo, México, se llevó a cabo la colecta por triplicado de ejemplares de árboles masculinos y femeninos de *J. deppeana*, así como la colecta de *B. odorata*; mientras que en Zempoala, Hidalgo, México, en un área con matorral xerófilo, se obtuvieron ejemplares de *S. rostratum*. La identidad taxonómica de estas especies se confirmó por medio de claves (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Los ejemplares están depositados en el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Las muestras vegetales colectadas se secaron a temperatura ambiente y las ramas, con tallos y hojas, se trituraron en un molino eléctrico. Con este material se prepararon las siguientes muestras: *J. deppeana*, 50 gr; *S. rostratum*, 45 gr; *B. odorata* 45 gr; las cuales fueron extraídas en Soxhlet durante ocho horas utilizando 200 ml de etanol absoluto. Se obtuvieron los extractos etanólicos con las siguientes concentraciones: *J. deppeana* 0.0185 g/ml; *S. rostratum* 0.0150 g/ml; *B. odorata* 0.0010 g/ml.

OBTENCIÓN DE FRACCIONES

El extracto etanólico de *J. deppeana* se fraccionó mediante cromatografía en placa preparativa de gel de sílice GF₂₅₄ de 20 x 20 x 0.25 cm, eluyendo con etanol. Al revelar el cromatograma con la luz de una lámpara UV se observaron tres bandas o fracciones. La fracción 3, con $R_f = 0.28$, fue la mayoritaria, la cual se raspó por separado y se extrajo con etanol, después se redujo el volumen por evaporación del disolvente.

CITOTOXICIDAD

Para probar la citotoxicidad de los extractos etanólicos de estas plantas, así como de la fracción obtenida de *J. deppeana*, se siguió el método empleado por López *et al.* (2002) en el que se utilizó un cultivo de la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa mantenido en medio DMEM (Dulbecco's Modified Tagle Médium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. En las pruebas se utilizaron placas de 96 pozos, en donde se sembraron 5000 células HeLa por pozo, en 100 µl de medio, éstas se trataron

con los extractos etanólicos de las plantas en diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µl extracto/100 µl de medio); la fracción de *J. deppeana* se ensayó en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 µl fracción/100 µl de medio. A las células testigo, no tratadas con extractos o fracciones, se les añadieron las mismas cantidades de etanol que a las células tratadas. Los cultivos fueron incubados en las condiciones mencionadas y a diferentes tiempos, 12, 24 y 48 hrs, se determinó la citotoxicidad mediante la estimación de la viabilidad celular utilizando la técnica de cristal violeta, para lo cual se fijaron las células con etanol al 70% durante cinco minutos, luego a cada pozo se añadió cristal violeta al 1% disuelto en agua, diez minutos después se agregó ácido acético al 33%, la lectura de la absorbancia a 570 nm (DO₅₇₀) se hizo directamente de los pozos colocando las placas en un lector de ELISA. Las pruebas se realizaron con seis a siete concentraciones por triplicado con tres repeticiones.

Con los datos obtenidos al medir la DO₅₇₀ se calculó el porcentaje de viabilidad como 100B/A donde A y B fueron los valores promedio de DO₅₇₀ de las células no tratadas y tratadas, respectivamente. Con los valores porcentuales de viabilidad celular y los de las concentraciones probadas se elaboraron gráficas concentración-efecto, sobre las curvas obtenidas se estimó la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀), que se definió como la concentración de los extractos y fracciones que redujo la viabilidad de las células tratadas al 50% respecto a las células no tratadas.

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

RESULTADOS

EFECTOS CITOTÓXICOS

Se encontró que los extractos etanólicos de *J. deppeana* y de *S. rostratum* redujeron la viabilidad de las células HeLa, lo que significa que produjeron citotoxicidad. Respecto de *J. deppeana*, como se muestra en la figura 1, la pérdida de viabilidad se presentó a partir de 0.05 μl extracto/100 μl de medio en los tres tiempos medidos, 12, 24 y 48 hrs. El tratamiento de 12 hrs produjo el menor decremento de la viabilidad y el efecto máximo se alcanzó en la concentración del

extracto de 2 μl /100 μl de medio, mientras que a 24 y 48 hrs el decremento fue mayor. En el tratamiento de 24 hrs la reducción máxima de la viabilidad llegó a 25%, este efecto se alcanzó al aplicar 0.1 μl del extracto y luego se mantuvo estable; a 48 hrs la viabilidad se redujo hasta el 10% con 0.4 μl del extracto y en adelante se estabilizó. La pérdida de viabilidad celular dependió tanto de la concentración del extracto como del tiempo de exposición.

El extracto etanólico de *S. rostratum* también causó pérdida de viabilidad de las células HeLa, que dependió de la concen-

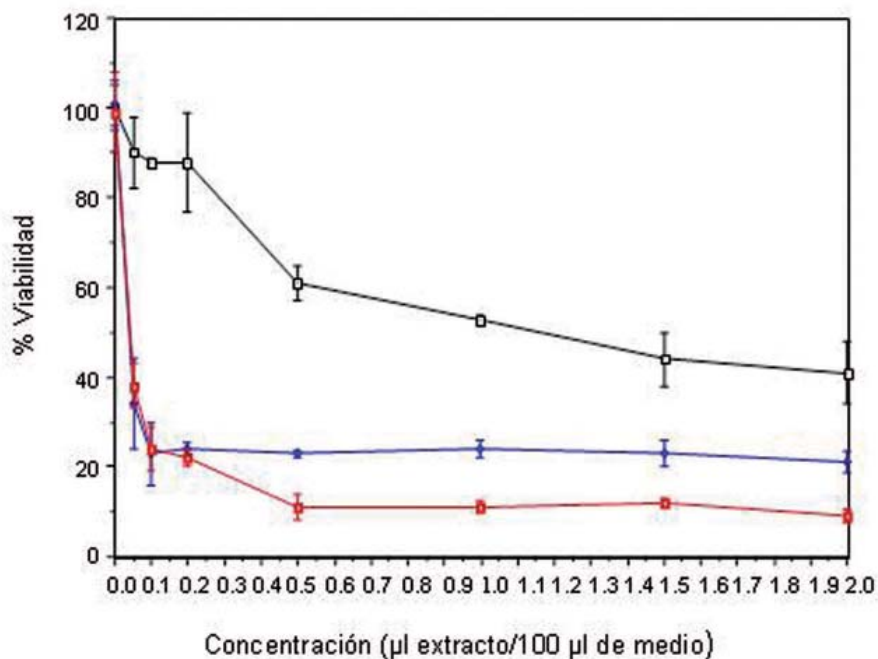


Fig. 1. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Juniperus deppeana* durante 12 (\square), 24 (\blacklozenge) y 48 (\blacksquare) horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

tración y del tiempo de exposición (Fig. 2). La pérdida fue gradual y los máximos alcanzados con 2 μ l del extracto fueron de 80, 39 y 40% a 12, 24 y 48 hrs, respectivamente, y el extracto de *B. odorata* no redujo la viabilidad de las células HeLa.

A partir de las curvas concentración-efecto obtenidas (Figs. 1 y 2) se calcularon las CI_{50} . Los resultados se presentan en la tabla 1, donde se observa que el extracto de *J. deppeana* presentó los valores de CI_{50} más bajos, a 24 y 48 hrs fueron de 4.625 μ g/ml, es decir, que éste fue el más citotóxico de los tres extractos ensayados; a 48 hrs la

CI_{50} del extracto de *S. rostratum* fue de 127.5 μ g/ml.

Puesto que el extracto de *J. deppeana* fue el que produjo la mayor citotoxicidad, se decidió fraccionarlo para rastrear la actividad. Se obtuvieron tres fracciones, siendo la 3 la mayoritaria ($R_f = 0.28$), por lo que se optó por ensayarla en cultivos de células HeLa para comprobar si ésta era la que produjo el efecto citotóxico.

Se encontró que la fracción 3 ($R_f = 0.28$) de *J. deppeana* produjo una reducción de la viabilidad celular. Como se observa en la

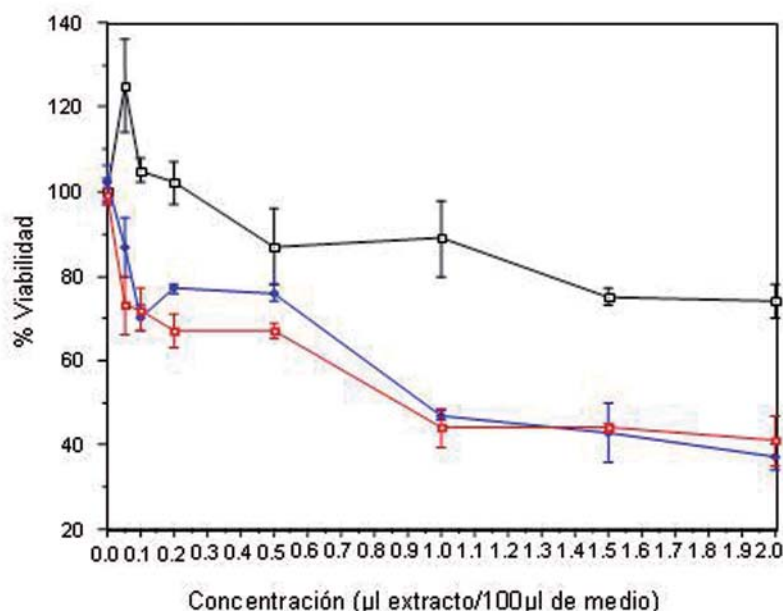


Fig. 2. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones del extracto etanólico de *Solanum rostratum* durante 12 (\square), 24 (\blacklozenge) y 48 (\blacksquare) horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Tabla 1. CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de los extractos y fracciones vegetales a la que se reduce al 50% la viabilidad de las células HeLa. Las cifras son el promedio de tres experimentos con siete concentraciones por triplicado. nd: no determinada, ne: no ensayada.

Extracto o fracción	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
<i>Juniperus deppeana</i>	240.5	4.63	4.63
<i>Solanum rostratum</i>	nd	142.5	127.5
<i>Bidens odorata</i>	nd	nd	nd
Fracción 3 de <i>J. deppeana</i>	ne	5.8	0.79

figura 3, esta reducción fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. En el tratamiento de 24 hrs se observó un decremento continuo de la viabilidad hasta llegar a 48% con 0.6 μl fracción/100 μl medio, la concentración más alta ensayada. En el tratamiento de 48 hrs la viabilidad se redujo hasta 20% con 0.3 μl fracción/100 μl medio, desde donde se mantuvo estable. Las CI_{50} de la fracción se presentan en la tabla 1, donde se observa que los valores son de los mismos órdenes de magnitud que los del extracto completo a 24 y 48 hrs, por lo que se supuso que el compuesto contenido en la fracción 3 le confiere las propiedades citotóxicas a *J. deppeana*.

En la figura 4 se presentan las imágenes obtenidas al microscopio de los cultivos de las células HeLa testigo expuestas al vehículo (etanol) (A) y al exponer el cultivo a la fracción 3 de *J. deppeana* durante 24 hrs a una concentración de 0.3 (B) y de 0.6 μl fracción/100 μl medio (C), en ambas

imágenes se observan células con forma redonda y en la última algunas con núcleos fragmentados y protuberancias celulares.

DISCUSIÓN

Las tres especies de plantas estudiadas se seleccionaron considerando su uso tradicional en varias regiones del estado de Hidalgo, las cuales se emplean para el tratamiento de cáncer de matriz (Pérez Escandón *et al.*, 2003). En el estudio se demostró que los extractos de dos de estas especies, *J. deppeana* y *S. rostratum*, causaron efectos citotóxicos en cultivos de células HeLa de cáncer cérvico uterino con lo cual se contribuye a corroborar las propiedades medicinales que tradicionalmente se atribuyen a estas plantas.

Éste es el primer reporte acerca del efecto citotóxico de *J. deppeana*. Al comparar la CI_{50} obtenida a 48 hrs con el extracto de esta planta en células HeLa con el valor reporta-

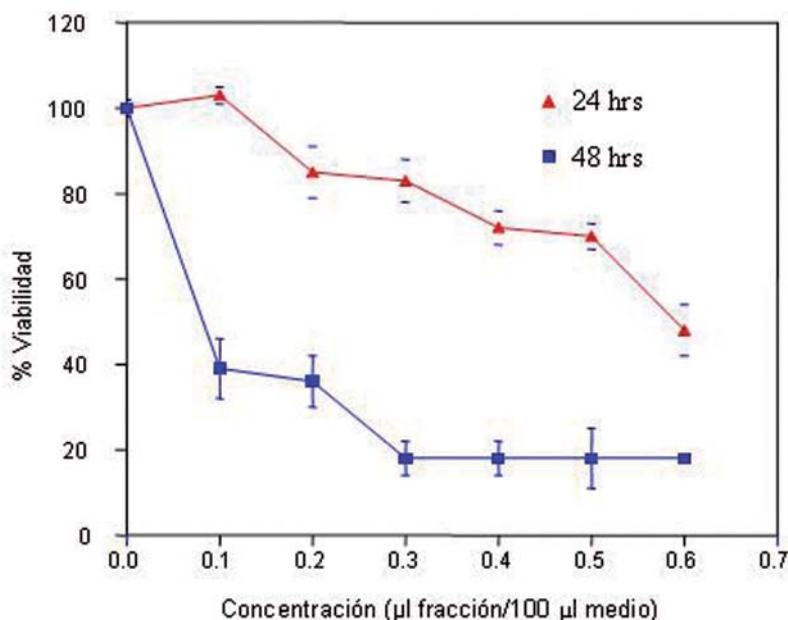


Fig. 3. Viabilidad porcentual de células HeLa expuestas a distintas concentraciones de la fracción 3 de *Juniperus deppeana* durante 24 (▲) y 48 (■) horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

do en otras especies, se observó que la cifra (4.625 µg/ml) fue unas quince veces menor que la encontrada por Betancur-Galviz *et al.* (2002) con el extracto de *Euphorbia arenaria* (74.6 µg/ml) y de unas 40 a 400 veces menor que las CI_{50} producidas con los extractos metanólicos (200 µg/ml) y acuosos (2000 µg/ml) de *Matricaria chamomilla* (Srivastava and Gupta, 2007).

Otras especies de *Juniperus* ya se utilizaban en Roma en el siglo I dC. para detener el crecimiento de tumores (Koulman *et al.*, 2004). En la actualidad ya se ha comprobado la citotoxicidad de extractos y sustancias

de *J. bermudiana* (Cole *et al.*, 1977), *J. phoenicea* (Carines *et al.*, 1980), *J. sabina* (San Feliciano *et al.*, 1990), *J. przewalskii* (Wang *et al.*, 2002) y *J. communis* (Bayazit, 2004) en distintas líneas celulares de tumores humanos.

Las células HeLa tratadas con la fracción 3 de *J. deppeana* adquirieron una morfología redonda (Figs. 4B, C) que es típica de células arrestadas en la fase G2/M del ciclo celular (Albert *et al.* 1998). A una concentración de 0.6 µl fracción/100 µl medio durante 24 hrs algunas células mostraron núcleos fragmentados y protuberancias celulares

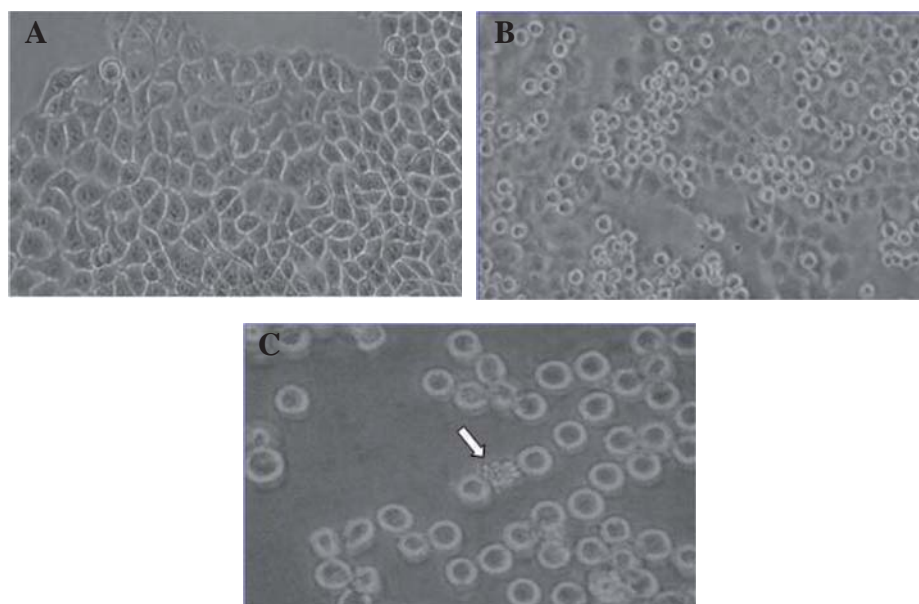


Fig. 4. Células HeLa expuestas al vehículo (A) o a la fracción 3 de *Juniperus deppeana* a una concentración de 0.3 (B) o 0.6 µl fracción/100 µl medio por 24 hrs (C). La flecha blanca muestra en C una célula con morfología apoptótica. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Aumento original A y B 10x; C 40x.

(Fig. 4C) que son características de células apoptóticas (Albert *et al.*, 1998, López, 2001, López *et al.*, 2002), lo que sugiere que la citotoxicidad producida por la fracción 3 de *J. deppeana*, y probablemente del extracto de esta planta, es por apoptosis. Sin embargo, para comprobar este efecto sería necesario realizar otro tipo de pruebas, como la tinción de núcleos con bromuro de etidio para observar si se condensan y fragmentan, así como la técnica de TUNEL para detectar fragmentación de ADN, características que se presentan en el proceso apoptótico (Albert *et al.* 1998).

También es el primer reporte de la citotoxicidad de *S. rostratum*; en el género *Solanum*

se han reportado especies como *S. crinitum* y *S. jabrense*, cuyos alcaloides fueron citotóxicos en diferentes cultivos de células tumorales (Esteves-Souza *et al.* 2002).

En este estudio el extracto de *B. odorata* fue inactivo; sin embargo, en otra especie del género, Sundararajan *et al.* (2006) encontraron que la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Bidens pilosa* produjo una reducción de la viabilidad de las células HeLa al 50% (CC₅₀ de 965.2 µg/ml) en 24 hrs.

Con el efecto citotóxico mostrado en células HeLa, *J. deppeana* y *S. rostratum* acrecientan la lista mundial de plantas con

potencial para casos de neoplasia de cuello uterino publicada por Moura *et al.* (2002), los resultados obtenidos en el estudio contribuyen a corroborar las propiedades que tradicionalmente se atribuyen a estas plantas y destacan a estas dos especies de la flora medicinal mexicana como fuente de sustancias para el tratamiento del cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó con apoyo del Programa Institucional de Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Proyecto UAE-DIP-ICBI-AA06.

LITERATURA CITADA

- Albert, B.; D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter, 1998. *Essential cell biology*. Garland Publishing, Inc. New York. 710 pp.
- Ávila, E.V.; R.T. Aguilar, M.J. Estrada, M.L. Ortega y R.R. Ramos, 2004. "Cytotoxic activity of *Cuphea aequi-petala*". *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **47**: 129-33.
- Bayazit, V., 2004. Cytotoxic effects of some animal and vegetable extracts and some chemicals on liver and colon carcinoma and myosarcoma. *Saudi Med. J.*, **25**(2): 156-163.
- Betancur-Galvis, L.A.; G.E. Morales, J.E. Forero & J. Roldan, 2002. "Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of *Euphorbia* genus". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*, **97**(4): 541-546.
- Carines, D.A., O. Ekundayo & G.I. Kingston, 1980. "Lignans from *Juniperus phoenicea*". *J. Nat. Prod.*, **43**: 495-497.
- Cole, J.R., B. Tammami & J. Torrance, 1977. "Antitumor agent from *Juniperus bermudiana*". *Phytochem.*, 1100-1103.
- Esteves-Souza, A., T.M. Sarmiento da Silva, C.C. Fernandes Alves, M.G. de Carvalho, R. Braz-Filho & A. Echevarria, 2002. "Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoids from two *Solanum* species". *J. Brazilian Chem. Soc.*, **13**(6): 838-842.
- INEGI, 2006a. *Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes. 727 pp.
- , 2006b. *Anuario estadístico. Hidalgo*, Tomo I. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes. 739 pp.
- Koulman, A.; W.J. Quax & N. Pras, 2004. "Podophyllotoxin and related lignans produced by plants". In: Ramawat, K.G. (Ed.). *Biotechnology of medicinal plants*. Science Publishers Inc. Enfield. pp. 9-35.
- Lee, K.H., 2004. "Current development in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads". *J. Nat. Prod.*, **67**: 273-283.
- López, L., 2001. *Inducción de apoptosis en células HeLa por extractos de*

- Cupressus lindleyi Klotzsch. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 35 pp.
- López, L.; M.A. Villavicencio, A. Albores, M. Martínez, J. de la Garza, J. Meléndez-Zajgla & V. Maldonado, 2002. "Cupressus lusitanica (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells". *J. Ethnopharmacol.*, **80**: 115-120.
- Mans, D.R.A.; A.B. de Rocha & G. Schwarzmans, 2000. "Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds". *The Oncologist*, **5**: 185-198.
- Moura, M.D.; J.S. Silva, R.A.G. Oliveira, M.F.F.M. Diniz & J.M. Barbosa-Filho, 2002. "Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia". *Acta Farm. Bonaerense*, **21**(1): 67-74.
- Pérez Escandón, B.E.; A. Ramírez y M.A. Villavicencio Nieto, 2003. *Lista de las plantas útiles de Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. 147 pp.
- Rzedowski, G.C. y J. Rzedowski, 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A.C., Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro. 1406 pp.
- San Feliciano, A.; J.M. Miguel del Corral, M. Gordaliza & A. Castro, 1990. "Lignans from *Juniperus sabina*". *Phytochem.*, **29**: 1135-1138.
- Srivastava, J.K. & S. Gupta, 2007. "Anti-proliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells". *J. Agric. Food Chem.*, **55**(23): 9470-9478.
- Stehman, F.B.; P. Rose, B. Greer, M. Roy, M. Plante, M. Penalver, A. Jhingran, P. Eifel, F. Montz & J.T. Wharton, 2003. "Innovations in the treatment of invasive cervical cancer". *Cancer*, **98**(9): 2052-2065.
- Suffredini, I.V.; M.L.B. Paciencia, A.D. Varela y R.N. Younes, 2007. "In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia". *Fitoterapia*, **78**: 223-226.
- Sumner, J., 2001. *The natural history of medicinal plants*. Timber Press. Portland. 235 pp.
- Sundararajan, P.; A. Dey, A. Smith, A.G. Doss, M. Rajappan & S. Natarajan. 2006. "Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant". *African Health Sci.*, **6**(1): 27-30.
- U.S. Congress Office of Technology Assessment, 1990. *Unconventional cancer treatments*. U.S. Government Printing Office. Washington. 300 pp.
- Waizel-Bucay, J.; G. Martínez-Porcayo, M.L. Villarreal-Ortega, D. Alonso-Cortés y A. Pliego-Castañeda, 2003.

“Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipe-tala* Cav. (Lythraceae)”. *Polibotánica*, **15**: 99-108.

Wang, W.S.; E.W. Li & Z.J. Jia, 2002. “Terpenes from *Juniperus przewalskii* and antitumor activities”. *Pharmazie*, **57**(5): 343-345.

Recibido: 20 febrero 2008. Aceptado: 25 agosto 2008.