



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

---

---

---

**“Determinación de los componentes químicos y evaluación de la  
capacidad genotóxica mediante ensayo cometa de la planta *Jatropha  
dioica*”**

Tesis para obtener el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
Y DE LA SALUD**

**P R E S E N T A**

**FABIOLA GONZÁLEZ CASTELAZO**

Bajo la Dirección de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS IRIS CRISTINA LÓPEZ SANTILLÁN**

Mayo del 2014



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Of. No MCBS/2014/41  
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Lic. Fabiola González Castelazo**  
**Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Determinación de los componentes químicos y evaluación de la capacidad genotóxica mediante ensayo cometa de la planta *Jatropha dioica*", con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTA M. EN C. ANA HILDA FIGUEROA GUTIÉRREZ

PRIMER VOCAL DR. JOSÉ ROBERTO VILLAGÓMEZ IBARRA

SECRETARIA M. EN C. IRIS CRISTINA LÓPEZ SANTILLÁN

SUPLENTE DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ CERUELOS

SUPLENTE M. EN C. RAMÓN MONTEJANO RODRÍGUEZ

Sin otro asunto en particular reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 24 de marzo de 2014

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL  
 DIRECTOR

M.C. ESP. MARICELA GUEVARA CABRERA  
 COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ICSSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Laboratorio de Materiales Dentales / Clínica de Odontología Ciudad del Conocimiento carretera Pachuca Tlaxiaca Km. 4.5  
 Mineral de la Reforma Hgo. C.P. 42184 Tel: (771) 7172000 ext. 6991 correo electrónico mtria\_bio\_sal@uaeh.edu.mx



*Grenny, vives en mi corazón, sigues siendo parte de mis logros y este es uno que en especial te dedico con mucho amor y aunque me encantaría poder dedicártelo personalmente sé que en donde quiera que estés lo celebras conmigo*

*Con mucho cariño a mi familia y a todos esos seres de luz que están cerca o lo estuvieron, que me han acompañado y brindado su mano en momentos difíciles para evitar que cayera; a esos ángeles que se han adelantado pero nunca han dejado de cuidarme.*

*Gracias Totales!*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradezco al comité tutorial; mi directora la Mtra. Iris Cristina Santillán por su apoyo, tiempo y conocimientos que me brindó para la realización de este trabajo; Al Dr. Villagómez por permitirme conocer la magia de la química, compartirme su experiencia y tenerme paciencia; a la Dra. Alejandra Ceruelos por sus enseñanzas y la oportunidad de trabajar en su proyecto; a la Mtra. Ana Hilda Figueroa y al Dr. Montejano por enriquecer este trabajo.

Agradezco también al Rector de la Universidad de Magallanes Punta Arenas, Chile Víctor Fajardo Morales por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de productos naturales, por su hospitalidad y amabilidad. A todos los compañeros de este laboratorio Víctor Sanhueza, Diego, Loreto, Dr. cuadra, Toño, José Solís, Jorge y Alejandra quienes me hicieron sentir como en casa e hicieron grata mi estancia, en los cuales además encontré excelentes seres humanos y buenos amigos.

A Nelvi Martínez y Javier Romero, mis compañeros y amigos les agradezco el haber hecho que la maestría fuera especial y con los cuales fue un placer hacer ciencia y compartir muchos más momentos gratos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de un gran número de personas que aportaron no solo a nivel profesional sino también personal su tiempo, consejos, experiencias, sabiduría, cariño, paciencia, humildad, en fin... infinidad de cuestiones que no terminaría de detallar pero solo quiero decir que les agradezco infinitamente porque dejaron huella en mí.

Gracias a todos los que confiaron nuevamente en que lo lograría!

Esta investigación fue financiada por FOMIX Hidalgo de la convocatoria M0009-2009-1 en la modalidad: A1 Investigación Científica Aplicada, que fue aprobada con el macroproyecto denominado: “¿Puede la raíz de *Jatropha dioca* prevenir mutaciones y cáncer? Determinación de la capacidad quimioprotectora en un modelo murino” con clave HGO-2009-01-130505 siendo responsable técnico del mismo la Dra. Ma. del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos.

Durante el desarrollo de los estudios de maestría, se contó con una beca de manutención Num. 305807 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El análisis químico se realizó en el Área académica de Química en el laboratorio 5 bajo la dirección del Dr. José Roberto Villagómez Ibarra. Mientras que la determinación genotóxica se efectuó en el Bioterio y laboratorios de Toxicología, Embriología e Inmunología en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Se realizó una estancia de investigación en el laboratorio de productos naturales en la Universidad de Magallanes en Punta Arenas, Chile en el periodo de Abril-Mayo del 2012 con apoyo de beca mixta de CONACyT.

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de la morfología de los núcleos en el ensayo del cometa.	16
<b>Figura 2.</b> Arbusto de la <i>J. dioica</i> .	18
<b>Figura 3.</b> Flor y tallo de <i>J. dioica</i> .	19
<b>Figura 4.</b> Diagrama de recolección y preparación de la muestra.	28
<b>Figura 5.</b> Diagrama general del Ensayo cometa.	37
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz de la fracción 2-16 del extracto acuoso en $\text{CHCl}_3$ .	40
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz de la fracción 2-16 (cristales) del extracto MeOH en $\text{CDCl}_3$ .	42
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas de los disacáridos trealosa, celobiosa y sucrosa.	45
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz de la fracción 115-121 (cristales) del extracto MeOH.	46
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz de la fracción 115-121 (cristales) del extracto MeOH en DMSO.	47
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz de la fracción 89 del extracto MeOH en $\text{CHCl}_3$ .	48
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz de la fracción la 89 del extracto MeOH EN $\text{CDCl}_3$ .	49
<b>Figura 13.</b> Estructuras químicas de sesquiterpenos.	50

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Momento de la cola de células del hígado tratadas con 3 dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	50
<b>Gráfica 2.</b> Longitud de la cola de células del hígado tratadas con 3 dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	52
<b>Gráfica 3.</b> Momento de la cola de células de riñón tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	54
<b>Gráfica 4.</b> Longitud de la cola de células de riñón tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	56
<b>Gráfica 5.</b> Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	58

<b>Gráfica 6.</b> Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J.dioica</i> .	59
---	----

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de algunas especies y géneros de la familia Euphorbiaceae.	17
<b>Tabla 2.</b> Nombres conocidos de la planta <i>J. dioica</i> a nivel nacional.	19
<b>Tabla 3.</b> Compuestos identificados en la planta <i>J. dioica</i> .	24
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento de los extractos de 40g de raíz de <i>J. dioica</i> .	38
<b>Tabla 5.</b> Orden de polaridad.	39
<b>Tabla 6.</b> Desplazamiento químico en RMN de <sup>1</sup> H Citlalitiona y Jatrophatriona.	42
<b>Tabla 7.</b> Desplazamiento químico en RMN de <sup>13</sup> C Citlalitiona y Jatrophatriona	43
<b>Tabla 8.</b> Índice de daño en células de hígado tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	53
<b>Tabla 9.</b> Índice de daño en células de riñón tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	56
<b>Tabla 10.</b> Índice de daño en células de médula ósea tratadas con tres dosis de la decocción de la raíz de <i>J. dioica</i> .	60

## INDICE GENERAL

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	7
<b>RESUMEN.</b>	8
<b>ABSTRACT.</b>	9
<b>I. MARCO TEÓRICO.</b>	10
1.1. Técnicas utilizadas en el estudio de plantas	11
1.1.1. Cromatografía.	12
1.1.2. Espectrometría.	12
1.1.2.1. Resonancia Magnética Nuclear.	12

1.1.2.1.1. Espectrometría de RMN de $^1\text{H}$ .	13
1.1.2.1.2. Espectrometría de RMN de $^{13}\text{C}$ desacoplado.	13
1.2. Pruebas para determinar la toxicidad de las plantas.	13
1.2.1. Determinación de la capacidad genotóxica.	14
1.2.1.1. Ciclofosfamida	15
1.2.1.2. Ensayo cometa.	15
1.3. Descripción de la planta <i>Jatropha dioica</i> .	17
1.3.1. Usos tradicionales.	20
1.3.2. Usos terapéuticos demostrados.	20
1.3.3. Compuestos aislados reportados de <i>J. dioica</i> .	22
1.3.3.1. Actividad de metabolitos secundarios encontrados en <i>J. dioica</i> .	24
1.3.4. Estudios de Toxicidad reportados de <i>J. dioica</i> .	25
<b>II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.</b>	26
<b>III. JUSTIFICACIÓN.</b>	26
<b>IV. OBJETIVO GENERAL.</b>	27
<b>V. OBJETIVOS ESPECIFICOS.</b>	27
<b>VI. HIPOTESIS.</b>	28
<b>VII. METODOLOGÍA.</b>	28
7.1. Recolección y preparación de la muestra.	28
7.1.1. Obtención de extractos.	29
7.1.1.1. Extracto acuoso.	29
7.1.1.2. Extractos de disolventes no acuosos.	29
7.1.1.2.1. Extracto hexánico.	29
7.1.1.2.2. Extracto metanólico.	29
7.1.1.2.3. Extractos de la raíz por polaridad creciente	30
7.1.2. Separación de fracciones.	30
7.1.2.1. Cromatografía en columna.	30

7.1.2.2. Cromatografía en capa fina.	30
7.1.2.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).	31
7.1.3. Determinación de alcaloides.	31
7.1.3.1. Técnica de determinación de alcaloides por acidificación y basificación.	32
7.1.3.2. Placa preparativa.	33
7.1.3.3. Columna flash.	33
7.2. Determinación genotóxica.	34
7.2.1. Selección de la muestra biológica.	34
7.2.2. Preparación tradicional de la raíz de <i>J. dioica</i> ensayo cometa.	34
7.2.3. Ensayo cometa.	34
<b>VIII. ANALISIS ESTADISTICO.</b>	38
<b>IX. RESULTADOS.</b>	38
9.1. Análisis químico.	38
9.1.1. Obtención de extractos.	38
9.2. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de <i>J. dioica</i> en células hepáticas.	49
9.2.1. Momento de la cola en células hepáticas.	49
9.2.2. Longitud de la cola en células hepáticas.	51
9.2.3. Índice de daño celular hepático.	57
9.3. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de <i>J. dioica</i> en células renales.	54
9.3.1. Momento de la cola en células renales.	54
9.3.2. Longitud de la cola en células de renales.	55
9.3.3. Índice de daño en células renales.	56
9.4. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de <i>J. dioica</i> en células de médula ósea.	57
9.4.1. Momento de la cola en células de médula ósea.	57
9.4.2. Longitud de la cola en células de médula ósea.	58
9.4.3. Índice de daño en células de medula ósea.	59

<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	61
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	67
<b>XII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.</b>	68
<b>XIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**BDMTM:** Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana

**BPF:** Bajo punto de fusión

**C:** Carbono

**CF:** Ciclofosfamida

**CIB:** Centro de Investigaciones Biológicas

**CREFAL:** Centro Regional de Educación Fundamental para la América Latina

**DL<sub>50</sub>:** Dosis Letal 50

**DPPH:** Difenilpicrilhidrazil

**H:** Hidrógeno

**HCl:** Ácido clorhídrico

**HSO<sub>4</sub>:** Ácido sulfhídrico

**ICSa:** Instituto de Ciencias Biomédicas y de la Salud

**KI:** Yoduro de potasio

**mA:** Miliamperes

**MHz:** MegaHertz

**MeOH:** Metanol

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NOM:** Norma Oficial Mexicana

**OH:** Hidróxilo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pH:** Potencial de Hidrógeno

**ppm:** Partes por millón

**Rf:** Factor de referencia

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**TMS:** Tetrametilsilano

**U:** Unidades

**UAEH:** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

**UMAG:** Universidad de Magallanes

**UV:** Ultravioleta

**V:** Volts

## RESUMEN

Históricamente las plantas han sido utilizadas como una técnica terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades. La medicina tradicional mexicana ha sido transmitida de generación en generación, desde las culturas antiguas, dejándonos un valioso legado que ha sido estudiado para demostrar científicamente los efectos que de manera empírica les designa la población, lo cual ha sido una base para la elaboración de productos farmacéuticos ocupando una parte muy importante de los sistemas de salud a nivel mundial. Una de estas plantas medicinales que se ha usado para diversos padecimientos es la *J. dioica* mejor conocida como Sangre de Drago o Grado que ha sido localizada en diversas zonas de Hidalgo. La *J. dioica* ha sido empleada para diversas enfermedades, pero no existe evidencia experimental contundente sobre si produce o no genotoxicidad. Existen pocas evidencias acerca de su composición química y que pudiera dar herramientas para comprobar los efectos terapéuticos y/o genotóxicos de esta planta. Por ello, es necesario primero, conocer su composición, además de entender el posible mecanismo por el cual pudiera ejercer algún efecto genotóxico. Si existe este efecto, podríamos alertar a la población sobre el riesgo que puede causar su consumo, lo que evitaría que lo tomen deliberadamente como hasta ahora.

## ABSTRACT

Historically, plants have been used as a therapeutic technique for the treatment of several diseases. Traditional Mexican medicine has been passed through generations, since the ancient cultures, leaving a precious legacy that has been scientifically studied to demonstrate the empirical effects designated by the population, which have been useful for the development of pharmaceutical products and they are a very important part of health systems worldwide. One of these medical plants has been used for many illnesses is *Jatropha dioica*, it is better as Sangre de Drago or Sangre de Grado and it has been located in different areas of Hidalgo State. *Jatropha dioica* has been used for many diseases, but there is not conclusive experimental evidence it genotoxicity or not. Likewise there is little evidence about its chemical composition that provide tools to test the therapeutic and / or genotoxic effects of this plant. Therefore it is necessary to know its composition, and understand the possible mechanism by which it could exert some genotoxic effect. If this effect exists, we could warn people about the dangers that can cause consumption, which would prevent deliberate intake as so far.

## I. MARCO TEÓRICO

Históricamente las plantas han sido utilizadas por el hombre en su instinto natural de conservación con el fin de encontrar el remedio a sus malestares. La medicina tradicional mexicana ha sido transmitida de generación en generación desde las antiguas culturas hasta nuestros tiempos, dejándonos un valioso legado cultural que está siendo estudiada para demostrar científicamente los efectos que, de manera empírica, les designa la población, lo cual ha sido una base para la elaboración de recursos farmacéuticos, ocupando una parte muy importante de los sistemas de salud a nivel mundial (OMS, 2002). Encuestas realizadas en el año 2009 en la ciudad de Matamoros, Tamaulipas México, mostraron que va en aumento el número de personas que utiliza ocasionalmente alguna planta con fin medicinal, ya que así lo aprendieron de sus padres o abuelos, mostrando mayor interés por parte de la población femenina (Garza-Sanmiguel, 2009). Para 1999 se habían reportado alrededor de 21,000 plantas consideradas medicinales, dichas plantas son muy accesibles y de bajo costo para la población por lo que es importante fortalecer estos sistemas para obtener mejor aprovechamiento de los recursos naturales.

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna ya que su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un fuerte efecto fisiológico en el organismo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria. Los efectos medicinales que se les atribuyen se deben a metabolitos que, al ser ingeridos, provocan un efecto fisiológico en el organismo (OMS, 2002). A estas sustancias se les conoce como principios activos, producidos a partir del metabolismo secundario de la planta; dichos principios activos pueden actuar como antibióticos, analgésicos, estimulantes del sistema nervioso o sobre la actividad muscular, entre otros efectos.

El estudio de las sustancias de origen natural que poseen un efecto medicinal se le conoce como Farmacognosia. Se considera que una planta es medicinal cuando alguna de sus partes o extractos es empleada en el tratamiento de alguna afección (González-Elizondo, 2004).

El estudio de las posibles plantas medicinales involucra realizar un análisis fitoquímico que permita determinar los metabolitos secundarios. Este estudio consiste en una serie de técnicas de extracción, separación, purificación y determinación estructural, de estos compuestos. Es de gran importancia aislar los principios activos en las distintas partes de las plantas y en diferentes tipos de extractos, identificarlos y probarlos en ensayos biológicos. Una vez identificados, estos se podrán relacionar a la actividad biológica a estudiar de acuerdo a sus propiedades (Lock, 2000).

### **1.1. Técnicas utilizadas en el estudio de plantas (farmacognosia)**

La farmacognosia se encarga del estudio de la composición química y de los efectos de los principios activos de las sustancias de origen vegetal y animal. Esta se concentra en realizar ensayos para la caracterización y valoración a estas sustancias, así como determinar la farmacología y las principales aplicaciones que podrían tener. Los principios activos son responsables de los efectos farmacológicos atribuidos y por ello se les puede otorgar un efecto terapéutico (Osorio, 2009).

La investigación fitoquímica utiliza métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos (Osorio, 2009).

El tamizaje consiste en realizar una extracción de los metabolitos que se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustadas en las células, utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente, generalmente comenzando con hexano, e ir aumentando la polaridad con cloroformo, acetato de etilo, metanol y agua. (Molina, 2005). Este procedimiento ayuda a la extracción por arrastre de diferentes polaridades arrastre diferentes metabolitos secundarios usando diferentes polaridades y de esta forma poder purificarlos más fácilmente.

Existen varios métodos de separación e identificación de compuestos químicos; entre los más usados se encuentran la sublimación, destilación, y la cristalización fraccionada y el más utilizado que es la cromatografía. Una vez separados los compuestos se recurre a métodos como espectrometría y resonancia magnética nuclear para la identificación de las sustancias.

### 1.1.1. Cromatografía

Esta técnica se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y también para determinar su proporción. En ella las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas en donde, la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad que muestren las moléculas en cada fase. Las separaciones se obtienen al introducir una mezcla de compuestos orgánicos en una fase estacionaria, dejando luego que una fase móvil fluya a través de la muestra. Los diversos métodos cromatográficos difieren respecto a la fase móvil (líquido o gas), la fase estacionaria (papel, gel o empaque sólido) y la fuerza que impulsa a la fase móvil (presión, gravedad o un campo eléctrico).

### 1.1.2. Espectrometría

La espectrometría comprende un conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectrometría ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectrometría de resonancia magnética nuclear). Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética.

#### 1.1.2.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Un núcleo que contiene un número impar de protones o de neutrones tiene espín nuclear y es magnéticamente activo. Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje como si fuera un imán diminuto. Cuando un núcleo con un espín neto se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético extremo define estados de energía cuantizados para el núcleo, en el caso de  $^1\text{H}$  la alineación puede ser a favor o en contra del campo externo. Los núcleos se pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja a uno de mayor energía por medio de fuerza electromagnética de una frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa cuando un núcleo pasa de un estado mayor al estado de más baja energía, se emite carga electromagnética de esta frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo, y la técnica se conoce como RMN.

#### **1.1.2.1.1. Espectrometría de RMN de $^1\text{H}$ :**

Las señales de protones en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , como las de los carbonos en RMN  $^{13}\text{C}$ , se registran como máximo de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Este tipo de espectro proporciona cuatro elementos de información importantes: el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el patrón de desdoblamiento y la integración de la intensidad de señales.

#### **1.1.2.1.2. Espectrometría de RMN de $^{13}\text{C}$ desacoplado**

La resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$ . Este espectro determina el entorno magnético de los átomos de carbono proporcionando dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos de átomos de carbono diferentes y el desplazamiento químico de cada señal, está determinado por el entorno molecular de cada carbono (Bruice, 2007).

### **1.2. Pruebas para determinar toxicidad en plantas**

El efecto de un tóxico está determinado por tres factores: dosis, vía de administración y tiempo de acción. Un efecto tóxico puede ser reversible y el organismo vivo se recuperará a medida que disminuya la concentración del tóxico. En el caso de no existir un efecto reversible, el daño tóxico permanecerá aun cuando el agente desaparezca de su punto de acción (Bello, 2001).

El efecto tóxico de una sustancia química depende de la vía de administración, ya que ella influye en la velocidad para su distribución. Una vez administrado un tóxico, su concentración a nivel tisular dependerá de sus propiedades fisicoquímicas, que determinarán su distribución y principalmente el estado de agregación molecular y su solubilidad, así como sus posibilidades de fijación, metabolización y eliminación. El daño tóxico será más o menos intenso según el tiempo de exposición y niveles de concentración tóxica; de aquí que el tiempo sea un factor esencial en la terapéutica antitóxica (Bello, 2001).

Los ensayos de toxicidad se pueden clasificar según el tiempo al que son sometidos, por ejemplo, a corto plazo se administran una o varias dosis del agente a evaluar a animales de experimentación a lo largo de 24 horas, con un periodo de observación de 7 a 14 días. Uno

de los parámetros a medir con estos ensayos es la dosis letal media o dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) que se considera un indicativo de la capacidad tóxica de un compuesto (Bermúdez, 2007). La toxicidad subaguda o subcrónica se realiza a plazo medio, generalmente un mes, pero también en muchos casos a 90 días; se administran dosis terapéuticas y transcurrido el periodo de tiempo se evalúan los posibles casos de intoxicación ya sea en sangre o a nivel tisular. Finalmente la toxicidad crónica en la que el periodo de tiempo puede oscilar entre meses y años (generalmente 1-2); se administran dosis terapéuticas de forma continua. El objeto final es evaluar posibles efectos teratogénicos (capacidad para producir alteraciones en el feto), efectos carcinógenos (capacidad para desarrollar cáncer) y efectos mutagénicos (capacidad para producir mutaciones).

**Determinación de la DL<sub>50</sub>:** Se define como la dosis de cierto compuesto o sustancia que provoca la muerte de la mitad de los organismos de experimentación. Uno de los métodos más utilizados para tener una aproximación de la DL<sub>50</sub> es el método de Lorke (1983) el cual utiliza grupos pequeños considerando la vía de administración y el modelo animal utilizado para poder establecer diferentes rangos de toxicidad (Repetto, 2009).

### 1.2.1. Determinación de la capacidad genotóxica

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que ponen en evidencia las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. El primer paso es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en tiempo breve. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas o aberraciones cromosómicas, transformaciones celulares u otras alteraciones (Arencibia, 2009).

Los ácidos nucleicos también puede ser atacados por radicales libres, cuya genotoxicidad provoca daños en las bases y los azúcares del DNA especialmente con el OH<sup>•</sup> (peróxido) (Castillo, 2002).

Dichas modificaciones químicas de los nucleótidos provocan en muchos casos la ruptura de las cadenas de DNA. Si el daño que se origina es mayúsculo y no puede ser reparado, se produce una mutación o bien la muerte celular.

Cuando aumentan las concentraciones de radicales libres, la célula sufre diferentes cambios bioquímicos y fisiológicos como la liberación de coenzimas y un agotamiento o inactivación de los sistemas de defensa y reparación celular. Si no se restablece el adecuado equilibrio estrés oxidativo/antioxidantes, se desencadenan diferentes procesos patológicos como peroxidación lipídica, pérdida de la homeostasis del calcio y una alteración de las rutas metabólicas que llevan a la eliminación de la célula por apoptosis (Castillo, 2002).

#### **1.2.1.1. Ciclofosfamida**

Por lo general, en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas como control positivo, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) (Chakraborty, 2009). Se trata de un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas de DNA, como consecuencia de la aparición de rupturas de sus bases por efectos de los mecanismos reparativos del DNA (Arencibia, 2011).

Tanto su mecanismo de acción como sus efectos terapéuticos han sido originalmente descritos en relación a su acción antitumoral. Luego de ser absorbida por vía digestiva sufre activación metabólica dependiente del sistema de citocromo P450 hepático, estas enzimas hepáticas convierten la CF en primer lugar a aldofosfamida y 4-hidroxíciclofosfamida, y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del DNA. Al reaccionar con el DNA, los agentes alquilantes forman unos puentes que impiden la duplicación del mismo y provocan la muerte de la célula (Lieberman, 2008).

#### **1.2.1.2. Ensayo cometa**

El ensayo cometa también conocido como electroforesis en gel de células individuales (SCGE) en su versión alcalina (pH.13), fue desarrollado por Singh y colaboradores; es una técnica capaz de identificar sitios álcali-lábiles y medir niveles bajos de rupturas en el DNA con una gran sensibilidad (Vandghanooni, 2011). Esta metodología se basaba en los resultados previos de dos científicos suizos quienes desarrollaron un método rápido y sensible para el análisis del daño en el DNA, adoptando la palabra “cometa” para bautizarlo de acuerdo con la morfología que mostraban las células con su DNA dañado.

La electroforesis unicelular es una poderosa y muy versátil técnica que permite evaluar el potencial genotóxico de las sustancias, así como examinar y cuantificar el daño al DNA en células individuales. Consiste en la observación microscópica de las células que han sido previamente embebidas en agarosa, lisadas, electroforizadas y teñidas; esta es una metodología es de alta sensibilidad. Con esta técnica podremos examinar y cuantificar si la raíz de *J. dioica* presenta algún tipo de potencial genotóxico que pudiera dañar a las células (Olive, 2004).

Los parámetros considerados para medir el grado genotóxico por el ensayo cometa son los siguientes:

**Índice de daño (ID):** Es el grado de daño que presentan los núcleos celulares, asignándoles valores del 0 al 4 de acuerdo a los criterios de escala visual. Figura 1.

Con los datos se calculan los porcentajes obtenidos de la clasificación de grado de daño de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I.D. = \text{número de núcleos grado 0(0)} + \text{número de núcleos grado 1(1)} + \text{número de núcleos grado 2(2)} + \text{número de núcleos grado 3(3)} + \text{número de núcleos grado 4(4)}$$



**Figura 1.** Clasificación de la morfología de los núcleos en el ensayo del cometa

Longitud de la cola es la distancia de la migración del DNA fragmentado desde el centro de la cabeza del cometa. Este se determina por el analizador de imágenes y se mide en nanómetros. Indica los niveles de daño que ha sufrido el DNA como rupturas del mismo en donde un valor de longitud de cola mayor indica que el DNA ha tenido múltiples rupturas. El momento de la cola es un parámetro dinámico que permite medir el porcentaje de DNA fragmentado y su distribución en la cola del cometa.

La migración de los fragmentos del DNA es lo que refleja la cola del cometa fuera del núcleo y se mide como longitud de la cola, y el DNA intacto se mide en la cabeza del cometa, a este última medición se le llama momento de la cola. Debido a esto estas dos mediciones son proporcionales entre sí según la magnitud del daño en el DNA (Tice, 1998).

### 1.3. Descripción de la planta *Jatropha dioica*

Muchas especies de la Familia Euphorbiaceae se han considerado como plantas medicinales. Se calcula que en México esta familia está representada por 43 géneros y 782 especies. Los géneros más grandes son *Euphorbia*, *Croton*, *Acalypha*, *Jatropha* y *Phyllanthus*, de las cuales se enumeran algunos ejemplos en la siguiente tabla (Tabla.1) (Steinmann, 2002).

GENERO	ESPECIE
<i>Jatropha</i>	<i>curcas</i> <i>dioica</i>
<i>Euphorbia</i>	<i>pilulifera</i> <i>neriifolia</i> <i>antiquorum</i>
<i>Phyllanthus</i>	<i>emblica</i> <i>urinaria</i> <i>niruri</i>
<i>Croton</i>	<i>tiglium</i>
<i>Aleurites</i>	<i>moluccana</i>
<i>Acalypha</i>	<i>indica</i>
<i>Mallotus</i>	<i>phillippinensis</i>
<i>Ricinus</i>	<i>communis</i>
<i>Baliospermum</i>	<i>montanum</i>
<i>Manihot</i>	<i>utilissima</i>

**Tabla 1.** Ejemplos de algunas especies y géneros de la familia Euphorbiaceae

Existe gran número de estudios que aportan información sobre algunas de estas *Jatrophas*. Por ejemplo de la *J. macrorrhiza* se ha aislado un diterpeno llamado jatrophationa que ha mostrado actividad inhibitoria contra leucemia linfocítica P-338 (Yang, 2003).

Una de estas plantas medicinales que se ha usado para el tratamiento de diversos padecimientos es la *J. dioica* mejor conocida como “Sangre de Drago o Grado” existe evidencia de su uso en el México prehispánico por vestigios de plantas encontradas en cuevas prehistóricas en Chihuahua y Teotihuacán que indican su probable uso medicinal (Callejas, 2006).

La *J. dioica* es un arbusto que puede medir de 30 a 60 cm de altura es escasamente leñosa; posee rizomas subterráneos de color naranja de hasta 1 m de largo, sus hojas son espatuladas y más anchas hacia el ápice, con 2 a 3 lóbulos, de 2 a 4 cm de largo (Figura 2). Sus tallos son gruesos, carnosos, simples o ramificados de los cuales emana un látex o jugo incoloro que al contacto con el aire se vuelve de color rojizo, similar a la sangre, de ahí su nombre común (Figura 3 A). Las flores son pequeñas y se localizan en ramas separadas, pueden ser entre blanquecinas o rosadas y presentan fruto seco ligeramente esférico, con una sola semilla (Figura 3 B). Esta planta florece en primavera específicamente entre los meses de Abril y Mayo y crece principalmente en matorral xerófilo ya que se adaptan a la escasez de agua, por lo que se encuentra generalmente distribuida en las zonas áridas de Norte de México (Domínguez, 2006; Sosa, 2006; Montiel, 2000).



**Figura 2.** Arbusto de la *J. dioica*



**Figura 3.** Tallo (A) y Flor (B) de *J. dioica*

A nivel nacional se le conoce con otros nombres (Tabla 2):

Estado	Nombres Comunes
Baja California	Batácora, matácora, torote amarillo, torote prieto.
Coahuila, Durango	Sangre gaco, sangregada, sangregado
Distrito Federal	Telondilla
Durango, San Luis Potosí, Zacatecas	Sangregrado
Hidalgo	Cóatl, dexthí, gualulu, drago, felondilla
Oaxaca	Sangregrao, suzi
Sinaloa	Piñón del cerro, sangre de drago, sangregrado, tacote prieto
Sonora	Tacote prieto, sangregrado
Valle de México	Sangre de drago, sangre de grado
Tlapalezpatli	nombre en la lengua náhuatl

**Tabla 2.** Nombres conocidos de la planta *J. dioica* a nivel nacional (CREFAL, 1998).

La distribución de *J. dioica* va desde los cinco hasta los 2800 metros sobre el nivel del mar, y se ha reportado en los estados de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas y en el Distrito Federal (Martínez, 2002).

### 1.3.1. Usos tradicionales

La Sangre de Drago se ha reportado como antidisentérica (Martínez, 2004), antiescorbútica, antiséptica, astringente (Barba, 2003), en el tratamiento de dermatosis y hemorroides, como tónico capilar y cáncer de matriz (Domínguez, 2006). En los mercados la gente que vende la planta la recomienda para el dolor de riñones y problemas de digestión. Así mismo es empleada para el tratamiento de várices y golpes. El agua resultante de la decocción de la planta es utilizada para mitigar la sarna, como revitalizante o para infecciones. El látex es usado para remover piezas dentales deterioradas o en el tratamiento de aftas orales y gingivitis. Refuerza piezas dentales, posee efecto antialopésico y anticasca (Manzanero, 2009) (Sánchez, 2005).

### 1.3.2. Usos terapéuticos demostrados

Se ha demostrado que los extractos acuosos y metanólicos de *J. dioica* (MeOH), muestran actividad antibacteriana y antimicrobiana *in vitro* contra: *Staphylococcus aureus*, bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones cutáneas formando forúnculos, ampollas y abscesos, así como enfermedades que pueden poner en peligro la vida, como neumonía, meningitis, endocarditis y sepsis; también tiene actividad contra la bacteria de *Escherichia coli*, que aunque la mayoría de sus cepas son inofensivas, algunos tipos pueden producir enfermedades y causar diarrea; *Cándida albicans*, hongo que causa infección de la piel; *Cryptococcus neoformans*, hongo que se deposita en los pulmones y puede viajar a través de la sangre hacia la médula espinal y el cerebro, donde podría causar enfermedad; y *Sporotrix schenckii*, hongo que causa más frecuentemente micosis subcutánea y profunda (Domínguez, 2006) (BDMTM, 2009).

Trabajos de investigación existentes acerca del uso de la *J. dioica* han sido reportados por Silva Belmares, et al. (2003) quien demuestra que la presencia de algunos fitoquímicos obtenidos de las fracciones hexánicas de esta planta poseen efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* y actividad moderada contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Estudios recientes han demostrado que los extractos metanólicos de la raíz y tallo de *J. dioica* muestran actividad antioxidante en la prueba de difenilpicrilhidrazil (DPPH) usada para la detección de la actividad antioxidante, donde cada extracto se pone en contacto en una placa de silica gel con el reactivo DPPH para detectar la presencia de antirradicales, tomando como control positivo la Vitamina C (Barrón, 2011).

Vaisberg y col. describen la actividad cicatrizante tanto de la sangre de drago como del alcaloide taspina aislado de ella, en donde este compuesto induce la migración celular hacia la zona herida. Por otro lado, Pieters y col. (1993) realizaron un fraccionamiento guiado por bioensayo, el cual demostró que el 3-4-0-Dimetilcedrusin, estimula las células endoteliales y mejora la cicatrización *in vivo*. El efecto de cicatrización del látex de la sangre de drago fue mejor que la observada con los ungüentos que contenían el 3-4-0-dimetilcedrusin; esto se debió al efecto físico de los polifenoles (proantocianidinas), los cuales precipitan las proteínas de las células y forman una costra oscura que cubre la herida (Aguilar, 2009).

Otro estudio de actividad amebicida mostró que el extracto metanólico de raíz, tallo y hojas de *J. dioica* inhibe cultivos de *Entamoeba histolytica* (Barron, 2011).

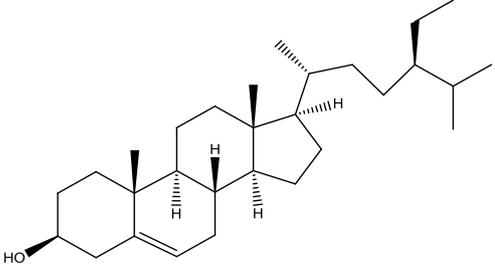
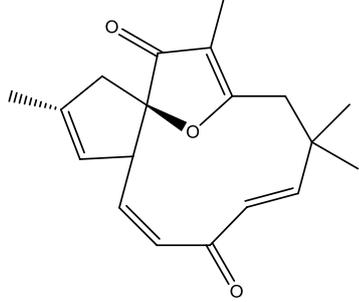
Es importante mencionar que la Jatrofona aislada de *J. gossypifolia* mostró actividad inhibitoria contra células *in vitro* de carcinoma nasofaríngeo, e *in vivo* contra 4 sistemas estándar de tumores animales (Yang, 2003).

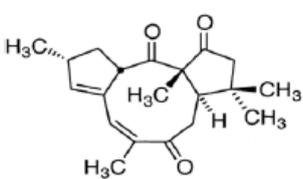
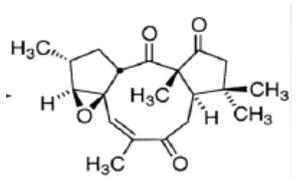
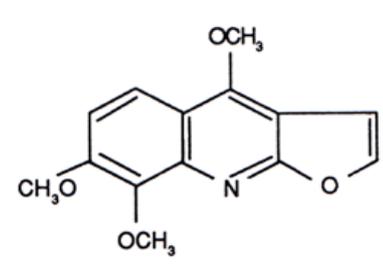
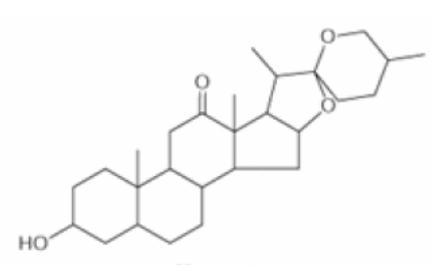
Se probó el extracto etanólico en células de la línea de cáncer cérvico uterino (HeLa) para medir su efecto citotóxico; sin embargo, en el trabajo realizado no se produjo una reducción en la viabilidad de este tipo de células (Cortes, 2005).

### 1.3.3. Compuestos aislados reportados de *J. dioica*

A principios de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica, llevaron al desarrollo por parte de la industria farmacéutica de una nueva producción en medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos se usaron los principios activos de innumerables plantas medicinales. No se debe olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan inmensas ventajas con respecto a los tratamientos químicos o de otras fuentes, entre los que se encuentran la reducción de costos y una disminución considerable en la presentación de efectos secundarios en el organismo (Ayambo, 2006).

Los compuestos reportados que han sido aislados de *J. dioica* son (Aguilar, 2009; Cortes, 2005):

Planta	 <p style="text-align: center;">β-sitosterol</p>
<i>J. dioica</i>	 <p style="text-align: center;">β-jatrofolona</p>

	Terpenoides
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>citralitriona</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>jatrophatriona</p>  </div> </div>
	Diterpenoides tipo clerodano ( korberinas A y B. 3-4-0-Dimetilcedrusin y Dodecametil ciclohexasiloxano)
	Proantocianidósidos (beta-1 y beta-4)
	Ácido elágico
	Lignanos dihidrobenzofuranos (3',4-0-dimetilcedrusina, 4-0-metilcedrusina)
	Alcaloides (tapsina)
	
	Flavonoides
	Saponinas
	
Raíz <i>J. dioica</i>	aceite esencial, resina y ácido oxálico
Tallos <i>J. dioica</i>	Látex rico en taninos (ácido gálico y catequina)

**Tabla 3.** Compuestos identificados en la planta *J. dioica* (Barrón, 2011).

La concentración de ácido elágico en *J. dioica* fue de 0.81 mg y aunque no es uno de los componentes principales tiene un papel importante en la salud como acciones antiesteroescleróticas, propiedades anticarcinogénicas resultando en una reducción de cáncer de colon humano, próstata, cervical, lengua, esófago y piel y con propiedades en la industria alimentaria como agente antioxidante (Aguilera, 2009).

#### **1.3.3.1. Actividad de metabolitos secundarios encontrados en *J. dioica***

Se han realizado pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios de la *J. dioica* en donde los extractos de acetato de etilo, acetónico, metanólico y etanólico tanto de tallo como de raíz, se sometieron a un tamizaje parcial con pruebas colorimétricas que determinan presencia o ausencia de ciertos compuestos. Los tres extractos dieron positivo a la presencia de alcaloides, carbohidratos, esteroides y triterpenos, saponinas, oxidrilos fenólicos, grupos carbonilos, flavonoides, insaturaciones y sesquiterpeniactonas (Barrón, 2011).

La presencia de oxidrilos fenólicos y flavonoides identificados en el tamizaje permiten suponer la posible actividad antioxidante de *J. dioica*. Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en frutas y vegetales; poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antiasmática e inhibidora de enzimas (Pérez, 2003). La actividad antioxidante de algunos flavonoides es dependiente de su concentración y solo se presenta en grandes cantidades (Martínez, 2002).

El ácido elágico es un tanino también presente en *J. dioica* tiene propiedades antioxidantes y actividad antiesteroesclerótica y anticarcinogénica contra de cáncer de colon, próstata, cervicouterino, oral, esofágico y dermatológico (Wong, 2010).

Las especies de *Jatropha* son una buena fuente de terpenoides. Se han identificado alrededor de 68 diterpenos en estas especies. Algunos diterpenos que se han identificado: ramnofolona, dafnano, latirano, tigliano, dinorditerpeno, deoxipreusomerino y primarano. Los terpenos tienen propiedades antioxidantes y protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes como

radicales libres de oxígeno, superóxidos y grupos hidroxilo reactivos. La actividad biológica de los diterpenos es variable; la mayoría presentan actividad citotóxica, antitumoral y antimicrobiana *in vitro*. Ejemplos de estos son la Jatrophona, spruceanol y jatrophatriona que han mostrado propiedades antitumorales contra leucemia linfocítica y el japodagrol contra células carcinoma KB (Devappa, 2010).

Las cumarinas presentan actividad biológica como agentes anticoagulantes, espasmolíticos, hipercolesterémicos, antibacteriales e insecticidas, además de que algunas provocan hepatotoxicidad y carcinogenicidad (González 2004).

Los alcaloides poseen acción analgésica, expectorante, antiséptica, antiespasmódica, narcótica, relajante muscular, estimulante nervioso, alucinógena, etc. Se sabe que con una dosis mínima de alcaloides se obtiene una alta actividad fisiológica y es fácil provocar efectos tóxicos al sobrepasar la concentración mínima tolerada (Arango, 2010).

Las quinonas son compuestos que dan pigmentación a las plantas, principalmente tienen propiedades laxantes y antimicóticas (Lock, 2000).

#### 1.3.4. Estudios de Toxicidad reportados de *J. dioica*

En un estudio previo de toxicidad  $DL_{50}$  de *J. dioica* en ratones usando las dosis 10, 100 y 1,000 mg/kg no mostró la muerte de ningún animal de experimentación. En una segunda etapa con dosis de 1,600 mg/kg, 2,900 mg/kg y 5,000 mg/kg tampoco se observó mortalidad. De esta manera, se considera que la  $DL_{50}$  es superior a 5,000 mg/kg sin causar toxicidad, de acuerdo con el método de Lorke. Otro estudio determinó el efecto citotóxico a corto plazo con las dosis media y alta de la decocción (500ml y 1000ml respectivamente) para un adulto de aproximadamente 70 Kg, así como el efecto genotóxico con la dosis alta al inicio del tratamiento, midiendo el número de eritrocitos policromáticos multinucleados (Tenorio, 2012), y se reportó que la dosis baja equivalente a la cantidad consumida en la medicina tradicional no provocó citotoxicidad ni genotoxicidad.

Un estudio de citotoxicidad realizado en *Artemia salina* Leach (crustáceo conocido como camarón de mar) cuya técnica evalúa la actividad tóxica de los extractos frente a las larvas de esta especie y el cual es indicador de la actividad biológica de los extractos crudos o compuestos, puros y aislados de plantas superiores, muestra que *J. dioica* presentó mayor toxicidad en comparación con otras plantas (Cortes, 2005). El resultado de mortalidad de las larvas indica la presencia de grupos de compuestos potencialmente tóxicos en la *J. dioica* (Gorriti, 1998).

Para seguir esclareciendo los componentes que podrían estar presentes en la planta *J. dioica*, es necesario implementar algunas de las técnicas ya mencionadas para su determinación y realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar.

## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La Sangre de Drago ha sido usada para tratar diversos padecimientos y enfermedades, pero no existe evidencia experimental contundente sobre si produce o no genotoxicidad. Asimismo existen pocas evidencias acerca de su composición química que pudiera dar las bases para comprobar sus efectos terapéuticos y/o genotóxicos. Por ello, es necesario conocer su composición, además de entender si algún efecto genotóxico. Si existe este efecto, podríamos alertar a la población sobre el riesgo que puede causar su consumo, lo que racionalizaría su uso, por lo que es fundamental contestar a través de este proyecto de investigación, las siguientes preguntas:

¿Cuáles son los compuestos químicos presentes en la raíz de la planta *J. dioica*? ¿El extracto acuoso de la raíz de *J. dioica* produce genotoxicidad?

## III. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia, la medicina tradicional ha jugado un papel importante en el tratamiento de diversos padecimientos lo que ha contribuido al desarrollo de la industria farmacéutica. Actualmente la búsqueda de opciones terapéuticas naturales tiene sus raíces en la insatisfacción por la medicina convencional, tanto por su escaso éxito en la

cura de ciertas enfermedades, así como por los efectos secundarios que provocan. Otro factor importante que influye en el uso de remedios naturales es el económico; existen plantas que crecen de modo silvestre o que se pueden conseguir a un bajo precio. Es importante que se continúe con la identificación de las sustancias contenidas en las plantas consideradas como medicinales para demostrar posteriormente el potencial efecto terapéutico que se les atribuye, así como evaluar su toxicidad, factor que pudiera poner en riesgo la vida como consecuencia del efecto nocivo de la actividad perniciosa de una estructura química determinada. Después de estos estudios, establecer el riesgo-beneficio de su uso y/o proponer las dosis recomendadas de ingesta para su aplicación terapéutica, por lo que el presente trabajo plantea realizar el análisis de algunos compuestos presentes en la raíz *J. dioica*, así como su posible potencial genotóxico a través del ensayo cometa.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Determinar cualitativa y estructuralmente algunos componentes químicos presentes en la raíz de *J. dioica* y evaluar la genotoxicidad de la decocción de la raíz de *J. dioica* por ensayo cometa, en células de hígado, riñones y médula ósea de ratón.

#### **V. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Obtener el extracto acuoso de la raíz de *J. dioica* para su análisis fitoquímico.
- Determinar los disolventes o la mezcla de ellos que sea más adecuada para realizar el extracto no acuoso de la raíz de *J. dioica*, para su análisis fitoquímico.
- Separar los extractos de la raíz de *J. dioica* en fracciones por medio de cromatografías.
- Establecer y elucidar componentes químicos en los extractos obtenidos de la raíz de *J. dioica*, por espectros de resonancia magnética nuclear.
- Determinar la genotoxicidad de la administración aguda de *J. dioica*, preparada de manera tradicional, a nivel de DNA mediante el ensayo cometa.

## VI. HIPÓTESIS

La raíz de la *J. dioica* contiene alcaloides, terpenos, algunos derivados de jatrofina y otros compuestos que podrían proporcionar efectos terapéuticos o un posible efecto genotóxico sobre células de algunos tejidos del ratón.

## VII. METODOLOGIA

### 7.1. Recolección y preparación de la muestra

Se recolectaron las raíces de la planta de *J. dioica* que crece de manera silvestre en la Colonia de Huitel, municipio de Tezontepec de Aldama, Hidalgo, México en el mes de Noviembre del 2010, a una altitud de 1980 m. La especie se identificó en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), por el M. en C. Manuel Ledesma González.

A la planta se le separó la raíz, ya que es la parte de interés en el estudio, la cual se lavó a chorro de agua con un cepillo de cerdas de plástico y se dejó secar a la sombra por un mes y después se molió en molino (Fig. 4).



**Figura 4.** Diagrama de recolección y preparación de la raíz *J. dioica*

### **7.1.1. Obtención de extractos**

#### **7.1.1.1. Extracto acuoso**

Se pesaron 40g de la raíz molida y se colocaron en un matraz bola de 500 ml, se agregaron 300 ml de agua destilada y se sometió a extracción bajo reflujo por 1 hora para que finalmente se filtrara en un embudo; se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar a 10 ml. La raíz recuperada se sometió nuevamente al mismo procedimiento. Finalmente se evaporó el disolvente. El extracto obtenido se sometió a una cromatografía en columna donde se utilizaron los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol, tanto puros como en mezclas con un incremento de gradiente del 20%.

#### **7.1.1.2. Extractos de disolventes no acuosos**

##### **7.1.1.2.1. Extracto hexánico**

Se pesaron 40g de la raíz molida y se colocaron en un matraz bola de 500 ml, se agregaron 300 ml de hexano y la mezcla fue sometida al sistema de extracción por reflujo a 69°C por 3 horas y se filtró en embudo con papel filtro. Una vez filtrado, se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar a 10 ml. Finalmente se evaporó el disolvente hasta obtener el extracto seco. Se realizó un espectro de Resonancia Magnética Nuclear.

##### **7.1.1.2.2. Extracto metanólico**

Se pesaron 40g de la raíz molida y se colocaron en un matraz bola de 500 ml, se agregaron 300 ml de metanol y se sometieron al sistema de extracción por reflujo a 30°C por 3 horas para que finalmente se filtrara en un embudo con papel filtro. Una vez filtrado se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar a 10 ml. La raíz recuperada se sometió nuevamente al mismo procedimiento.

Se juntaron los concentrados de las dos extracciones y finalmente se evaporó el disolvente. Se realizó prueba de Resonancia Magnética Nuclear.

#### **7.1.1.2.3. Extractos de la raíz por polaridad creciente**

Se pesaron 500g de la raíz molida y se colocaron en un matraz bola de 2L, se agregó 1L de hexano destilado y se sometió al sistema de extracción por reflujo durante 3 horas para que finalmente se filtrara en un embudo con papel filtro. Se sometió la raíz recuperada nuevamente a un segundo reflujo. Una vez filtrado se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar. La misma raíz, una vez seca, se sometió al mismo procedimiento primero con metanol y luego con agua.

### **7.1.2. Separación de Fracciones**

#### **7.1.2.1. Cromatografía en columna**

Para la separación de compuestos de los extractos acuoso, hexánico y metanólico, se utilizaron columnas de 50 cm de longitud y 2 cm de diámetro empaquetadas con gel de sílice de 60 micras de tamaño de partícula 0.063-0.2 mm. Como eluyentes se utilizaron disolventes purificados previamente por destilación fraccionada, realizando mezclas con hexano, acetato de etilo y metanol, con un incremento de gradiente del 20%. Las fracciones se recolectaron por goteo, se concentraron en el Rotavapor y se les realizó una placa cromatográfica en capa fina para juntar aquellas que presentaron similitud de factor de referencia en la elución. Este procedimiento se realizó para cada uno de los extractos obtenidos.

#### **7.1.2.2. Cromatografía en Capa Fina**

A cada una de las fracciones de cada extracto se les realizó esta cromatografía de manera preliminar, mediante cromatofolios comerciales de vidrio y aluminio recubiertos

con gel de sílice 60 F254 Merk, como fase estacionaria y como eluyentes se utilizaron agua, hexano, acetato de etilo y metanol. Siguiendo la siguiente metodología:

1. Corte de las placas a la medida adecuada.
2. Sobre la placa se depositó una gota de los extractos fraccionados, con ayuda de un capilar a distancia de 1 cm del extremo de la placa.
3. Cada placa se introdujo en un recipiente hermético, previamente acondicionado con el solvente seleccionado y se mantuvieron en la cámara hasta que se eluyera la muestra. Se retiró de la cámara y dejó secar el disolvente.
4. Se sometió a revelado con luz ultravioleta para determinar su posición relativa.

#### **7.1.2.3. Resonancia Magnética Nuclear**

Los espectros de Resonancia Magnética de Protón (RMN de  $^1\text{H}$ ) y de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ), se determinaron en un equipo Varian a 400 MHz y a 100 MHz respectivamente utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y cloroformo deuterado como disolvente.

#### **7.1.3. Determinación de alcaloides**

Esta técnica se implementó en el laboratorio de productos naturales en la Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. El objetivo fue corroborar la presencia de alcaloides en la planta *J. dioica*.

#### **Extracto metanólico**

Se colocaron 100g de raíz de la planta *J. dioica* previamente seca y molida en una bolsa de tela y se dejó en maceración con Metanol por 6 horas. Se retiró el disolvente y se concentró el extracto a presión reducida con ayuda del rotavapor. Se realizó una segunda extracción con la misma raíz en las mismas condiciones por 14 horas y finalmente una tercera extracción por 4 días para asegurar un mejor rendimiento.

Una vez concentrado el resultado de las 3 extracciones se realizó una prueba de presencia de alcaloides con revelado de reactivo Dragendorff en un cromatofolio.

#### **7.1.3.1. Técnica de determinación de alcaloides por acidificación y basificación**

Se colocó la muestra seca del extracto metanólico en un vaso de precipitados, se acidificó con HCl (ácido Clorhídrico) al 5% mezclándolo continuamente. Se pasó por papel filtro y el filtrado se colocó en un embudo de decantación al cual se le agregó cloroformo y se agitó lentamente y se recuperó el cloroformo para eluir los compuestos polares. Se realizaron 3 lavados de cloroformo. A la parte que quedó en el embudo se le agregó amoniaco para llegar a un pH básico, que se midió con tiras reactivas. A cada uno de los lavados se hace una prueba con reactivo de Dragendorff para observar presencia de alcaloides. Se realizaron 3 lavados con cloroformo para la parte básica.

Cada una de las soluciones obtenidas de los lavados clorofórmicos (la parte ácida y básica) se sometieron a 2 lavados de agua destilada en un embudo de decantación y se recuperaron las partes inferiores no acuosas. Finalmente se agregó sulfato de anhidro y se dejó reposar 24 horas para eliminar totalmente la humedad.

A cada una de las soluciones ácidas ( $H^+$ ) y básicas ( $OH^-$ ) se concentraron y se realizó la prueba de alcaloides con el reactivo Dragendorff:

##### Reactivo de Dragendorff

Solución A: 85g de Nitrato básico de bismuto en una mezcla de 10ml de ácido acético y 40ml de agua destilada.

Solución B: 8g de Yoduro de potasio KI en 20ml de agua destilada.

Se mezclaron 5ml de cada una de las soluciones A y B y se agregaron 20ml de ácido acético, aforando a 100ml con agua destilada. Finalmente se dejó reposando en refrigeración.

A cada una de estas fracciones se les realizó cromatografía en columna. La fracción básica (0.0391g) se metió a cromatografía de columna, se obtuvieron 23 fracciones en gradiente de concentración con mezclas de cloroformo:metanol. Se realizó el mismo procedimiento con la parte fracción ácida (0.1579g) de la cual se obtuvieron 18 fracciones. Se realizaron placas cromatográficas de cada fracción para identificar aquellas que eran similares.

#### **7.1.3.2. Placa preparativa**

De la parte OH-, se juntaron las fracciones de la 2-5 y se realizó una placa preparativa en cromatofolio de vidrio Kleselgel tamaño de partícula 60f 254, de 20x20cm y grosor 0.25mm. Se disolvió la muestra en cloroformo y se sembró con un capilar en la placa y se colocó en la cubeta previamente saturada con el sistema hexano 1:3 cloroformo.

Se dejó el corrimiento de la placa y cuando finalizó se retiró y se colocó en campana de extracción para secarla. Utilizando luz UV se marcan rápidamente las manchas observadas para evitar que se descompongan los compuestos. Un extremo se corta para revelar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los compuestos visualizados se rasparon y se recuperaron con lavados de metanol y cloroformo, en un embudo con frica. Se dejaron al aire libre para evaporar el solvente y se les realizó RMN.

#### **7.1.3.3. Columna flash**

Con la parte restante del extracto en la acidificación a la cual llamaremos borra, se realizó cromatografía en columna Flash. Se adsorbió la borra en silica hasta formar un polvo seco. En un embudo con frica se colocó papel filtro cubierto por silica y en la parte superior la muestra. Finalmente se cubrió con algodón. Se fueron obteniendo las fracciones de 100ml utilizando los solventes en orden creciente de polaridad comenzando con hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo y finalmente con metanol. Cada fracción se obtiene utilizando como apoyo un sistema de vacío. Las fracciones se concentraron en el Rotavapor, se realizó cromatografía en capa fina y se juntaron las fracciones similares.

## **7.2. Determinación genotóxica**

### **7.2.1. Selección de la muestra Biológica**

Se utilizaron ratones macho adultos mayores de 8 semanas de vida de la cepa ICR, con un peso aproximado de 30 g que se adquirieron en el bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Los ratones se mantuvieron en cajas de policarbonato con cama de viruta comercial estéril, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, a temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ , agua y alimento *ad libitum* con dieta balanceada para roedores. Los experimentos se realizaron en las instalaciones del bioterio dentro del área aislada y asignada.

Cabe mencionar que el manejo zootécnico y el sacrificio de los animales utilizados en esta investigación, se realizó acorde a la NOM-062-ZOO-1999 y el manejo con respecto a la disposición final de productos biológicos, excretas y cadáveres fue realizado de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

### **7.2.2. Preparación tradicional de la decocción de la raíz de *J. dioica***

La decocción se preparó siguiendo el esquema tradicional, se calentaron a ebullición 250 ml de agua purificada y se agregó 1 gramo de raíz previamente molida y seca, se dejó hervir por 5 minutos y se pasó por una coladera de plástico para su inmediata administración.

### **7.2.3. Ensayo Cometa**

El ensayo cometa se realizó de acuerdo a la siguiente técnica descrita por Tice y col, 2000:

1. Se formaron 3 lotes de animales de 6 ratones cada uno los cuales se pesaron y marcaron (3, 9, 15 y 21 horas) y dosis diferentes: 14.88mg de planta/kg para la dosis de decocción baja (DDB), 42.84mg de planta/kg para la dosis de decocción media (DDM) y 85.68mg de planta/kg para la dosis de decocción alta (DDA), se administraron usando una cánula intragástrica. Estas dosis se basan en lo equivalente al consumo de 250 ml (1 Taza), 750 ml y 1.5 litros de la decocción, en relación al consumo diario de agua recomendado para una persona adulta de aproximadamente 70Kg. Un lote pertenecería al control positivo el cual fue suministrado con CF a una dosis de 50 mg/kg, la cual fue inyectada vía intraperitoneal. Como control negativo se administró agua purificada de la marca e-pura usando el volumen equivalente a la dosis mayor.
2. Se prepararon 50  $\mu$ L de agarosa al 1% (Borinnger) en agua destilada y colocó en un vaso Coplin, donde se introdujeron portaobjetos, de manera que quedó adherida a ellos una fina capa de agarosa y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Los microgeles se deshidrataron a 37 °C hasta el momento en que se obtuvieron los órganos.
3. A las 3, 9, 15 y 21 horas luego de la administración (v.o) del té con ayuda de una jeringa con cánula intragástrica. Se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron el hígado y riñones, dichos tejidos se maceraron con PBS frío libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , dejando reposar la suspensión celular en hielo.
4. Se procedió a extraer el fémur, se limpió el tejido muscular y se realizó un corte en ambas epífisis para descubrir los canales del hueso, se arrastró la médula con 1 mL de PBS y se recibió el tejido en un tubo Eppendorf, manteniendo la muestra en hielo.
5. Se fundió agarosa de bajo punto de fusión (BPF) (Marca Sigma) al 0.75 % en PBS y se mantuvo en baño maría a una temperatura de 37°C; de ella se tomaron 75 $\mu$ L que se colocaron en un tubo Eppendorf junto con una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión celular, mezclando de manera que las células quedaran embebidas en ella.

6. La mezcla anterior se vertió sobre el microgel de agarosa, expandiéndose con un cubreobjetos y dejando gelificar sobre una placa de hielo; este procedimiento se realizó por duplicado.

7. Una vez solidificado el gel, se retiró el cubreobjetos y se adicionó otra capa de agarosa BPF, se expandió con el cubreobjetos y se dejó gelificar en hielo. Se retiró el cubreobjetos del microgel y se introdujeron las laminillas en un vaso Coplin protegido de la luz y con solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1 % Tritón, 10 % DMSO, pH 10) a 4°C; durante 24 horas.

8. Los microgeles tratados con la solución de lisis se introdujeron en la cámara de electroforesis. Posteriormente se agregó la solución amortiguadora (pH>13) hasta cubrir las laminillas y se dejaron reposar en esta solución por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó el corrimiento electroforético por 20 minutos, ajustando la fuente de poder a 300mA y 25V.

9. Al terminar la electroforesis las laminillas se neutralizaron por goteo con la solución amortiguadora de neutralización, dejándola actuar por 5 minutos; repitiendo el proceso en dos ocasiones más. Se desecaron en metanol absoluto por 5 min y se almacenaron en un lugar seco para su posterior análisis.

10. Las laminillas se tiñeron con 50µl de bromuro de etidio (Sigma) (0.02mg/mL) expandiéndolo con un cubreobjetos para rehidratar el gel. Finalmente se realizó un análisis microscópico con epifluorescencia para determinar la longitud y momento de la cola del cometa con el programa COMET 2, analizando 100 células por ratón por órgano a las cuales se les evaluó el índice de daño y se les asignaron valores del 0 al 4, de acuerdo a los criterios de Dhawan (Olive, 1990).



Figura 5. Diagrama general del Ensayo cometa

## VIII. ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de la determinación genotóxica se utilizó el paquete estadístico InStat que incluye pruebas de ANOVA y t de Student con correlación Welch para momento y longitud de la cola. Para el ID, la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se estableció un intervalo de confianza (IC) del 95% y valor de  $P < 0.05$ , para definir y vincular la matriz nuclear. Para todos los análisis se utilizó el software estadístico GraphPad InStat V 3.1 y Microsoft Office Excel 2007.

## IX. RESULTADOS

### 9.1. ANÁLISIS QUÍMICO

#### 9.1.1. Obtención de extractos

Para los extractos acuoso, hexánico y metanólico se usaron 40g de raíz seca y molida. El rendimiento y el número de fracciones obtenidas de cada uno de los extractos se muestra en la Tabla 4.

EXTRACTO	GRAMOS OBTENIDOS	RENDIMIENTO %	FRACCIONES/ml OBTENIDOS
ACUOSO	<b>1.39</b>	<b>3.47</b>	<b>74 (50ml)</b>
METANÓLICO	<b>2.74</b>	<b>6.85</b>	<b>72 (100ml)</b>
HEXANICO	<b>3.9</b>	<b>9.75</b>	<b>143 (10ml)</b>

**Tabla 4.** Rendimientos de los extractos de 40g de raíz de *J. dioica*

Posteriormente cada extracto se sometió a cromatografía en columna con gradientes de menor a mayor polaridad como se muestra en la Tabla 5. Seguir este orden de polaridad permite separar la mayoría de los compuestos, comenzando con hexano que tiene baja

polaridad y cambiando gradualmente la solución al 20% con otros disolventes aumentando su polaridad, hasta llegar a metanol que es altamente polar y con ayuda de cromatografía en capa fina se reúnen los compuestos similares.

Las tres cromatografías en columna se realizaron de acuerdo con la cantidad de extracto que se obtuvo del sistema de extracción por reflujo previo y también diferentes fracciones, eluyendo en cada una diferente cantidad: 10 ml para hexano, 100 ml para metanol y 50 ml para agua (Tabla 4).

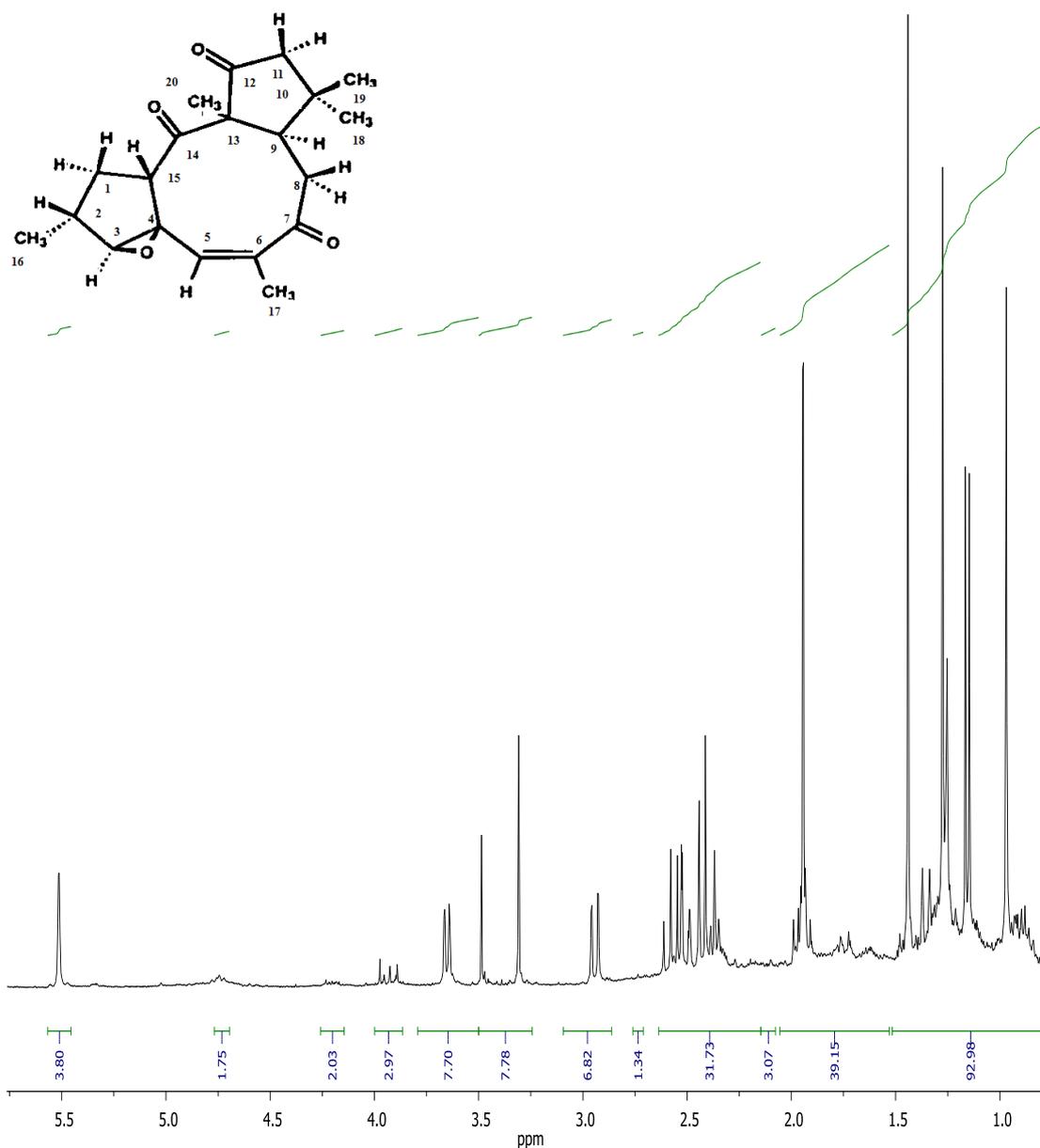
ORDEN DE POLARIDAD	
100% HEXANO	80% ACoEt- 20% METANOL
80% HEXANO- 20% ACoEt	60% ACoEt- 40% METANOL
60% HEXANO- 40% ACoEt	40% ACoEt- 60% METANOL
40% HEXANO- 60% ACoEt	20% ACoEt- 80% METANOL
20% HEXANO- 80% ACoEt	100% METANOL
100% ACoEt	

**Tabla 5.** Orden de Polaridad

#### **Extracto Acuoso de la raíz de *J. dioica***

Al someter la raíz molida al sistema de extracción acuoso se obtuvieron 1.39 g de extracto seco que fue sometido a cromatografía en columna y se obtuvieron mezclas de sustancias polares difíciles de identificar, aunque en las primeras fracciones (2 y 3) eluidas con 80:20 hexano:AcOEt se obtuvo un polvo sólido blanco cuyo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostró señales en 5.51 ppm que corresponde a un protón vinílico, en 1.94 ppm se observa una señal doble correspondiente a un metilo vinílico, en 1.44 ppm una señal simple que puede corresponder a un metilo o vecino a un carbonilo, en 1.27 y 0.96 ppm se observan dos señales simples de metilos correspondientes a metilos geminales, y otra señal doble en 1.15 ppm que caracteriza a un metilo secundario. En la región de 2.3 a 3.7 ppm se observan señales múltiples que corresponden a hidrógenos alfa al carbonilo y bases de oxígeno (Tabla. 6, Figura. 6). En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron 20 señales, tres se encuentran arriba de 200 ppm correspondientes a

carbonilos, dos en la región de 130 a 150 ppm correspondientes a un enlace doble y el resto debajo de 80 ppm de metilos, metilenos y carbonos tri y tetrasustituídos (Tabla. 7, Figura 7). Con estos resultados y analizando la literatura concluimos que corresponde a la ya conocida y aislada previamente citlalitriona, un diterpeno tricíclico aislado de *Jatropha dioica* var. *sessiliflora* con actividad inhibidora de tumores (Yang, 2003), propiedades antibacterianas, purgativas y antitumorales (Villareal, 1988).



**Figura 6.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz de Citlalitriona obtenida en las fracciones 2-16 del extracto Acuoso en CHCl<sub>3</sub>

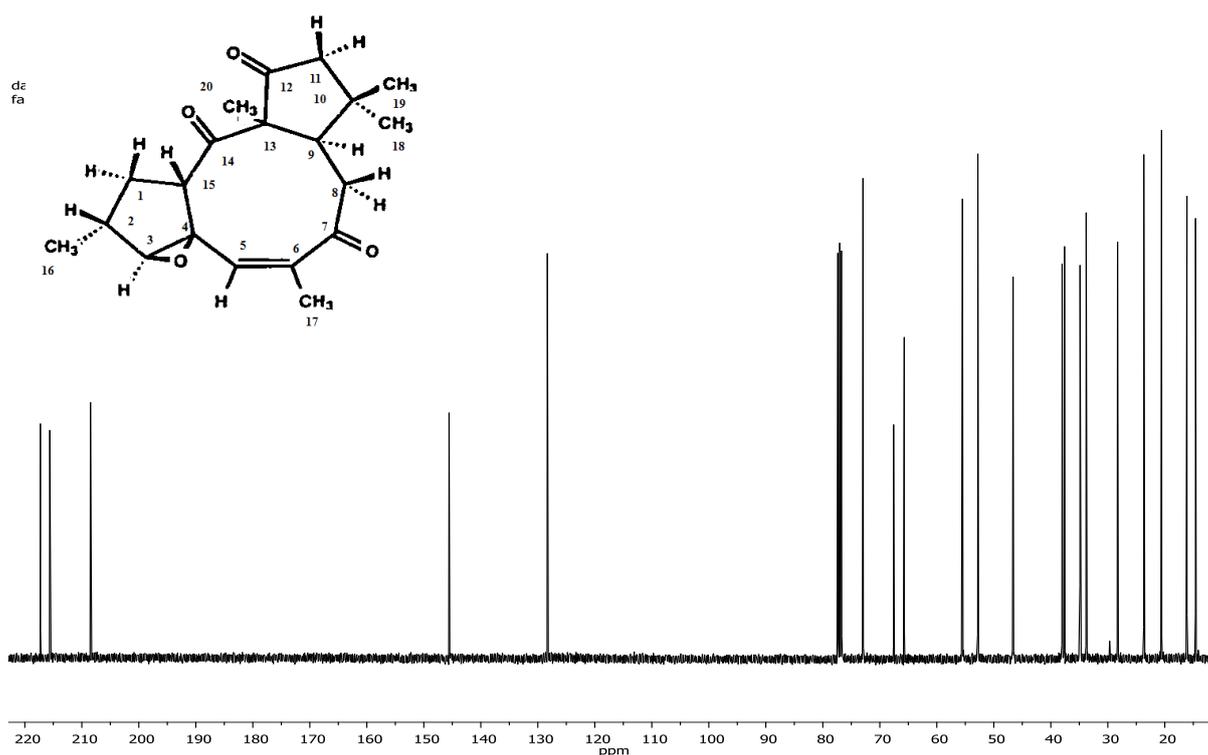


Figura 7. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de las fracciones 2-16 (citlaltiriona) del extracto MeOh en  $\text{CDCl}_3$

C	Citlaltiriona $\text{C}_6\text{H}_6$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) reportado en la literatura (Villareal,1998)	Citlaltiriona $\text{CDCl}_3$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) Experimental	Jatrophastriona $\text{CDCl}_3$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) reportado en la literatura (Sterling, 1976)
1	35 (t)	<b>34.83</b>	34.1 (t)
2	34.3 (d)	<b>35</b>	36.6 (d)
3	72.5 (d)	<b>72.95</b>	131.8 (d)
4	67.9 (s)	<b>67.58</b>	124.4 ( ( s)
5	128.9 (d)	<b>128.53</b>	116.7 (d)
6	144.9 (s)	<b>145.67</b>	126.8 (s)
7	208.1 (s)	<b>208.48</b>	193.8 (s)
8	38.1 (t)	<b>38.01</b>	34.5 (t)
9	52.9 (d)	<b>52.8</b>	47.2 (d)
10	37.1 (s)	<b>37.59</b>	35.2 (s)
11	55.5 (t)	<b>55.5</b>	51 (t)
12	215.1 (s)	<b>215.63</b>	198.8 (s)
13	65.7 (s)	<b>65.71</b>	59.1(s)
14	216.8 (s)	<b>217.7</b>	196.2 (s)
15	46.8 (d)	<b>43.63</b>	46.8 (d)
16	16.2 (q)	<b>16.12</b>	19.2 (q)
17	20.3 (q)	<b>20.56</b>	19.2 (q)
18	23.3 (q)	<b>23.68</b>	21.6 (q)

<b>19</b>	27.8 (q)	<b>28.29</b>	25.6 (q)
<b>20</b>	14.9 (q)	<b>14.16</b>	13 (q)

**Tabla 6.** to químico en RMN de  $^{13}\text{C}$  de Citlalitona y Jatrophatriona

H	Citlalitriona $\text{Me}_2\text{CO-d}_6$ ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura (Villareal,1998)	Citlalitriona $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ /ppm) Experimental	Jatrophatriona $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura (Sterling, 1976)
<b>H-1<math>\alpha</math></b>	1.21	<b>1.35</b>	2.2-3.0
<b>H-2<math>\beta</math></b>	1.85	<b>2.3-2.62</b>	2.2-3.0
<b>H-2</b>	2.23	<b>2.3-2.62</b>	4.08 (1H, t ancho)
<b>H-3</b>	3.09	<b>2.94 o 3.31</b>	6.08 (1H, m)
<b>H-5</b>	5.48	<b>5.51</b>	5.82 (1H, m)
<b>H-8<math>\alpha</math></b>	2.47	<b>2.3-2.62</b>	2.2-3.0
<b>H-8<math>\beta</math></b>	2.50	<b>2.3-2.62</b>	2.2-3.0
<b>H-9</b>	3.16	<b>2.3-2.62</b>	2.2-3.0
<b>H-11<math>\alpha</math></b>	2.30	<b>2.3</b>	2.2-3.0
<b>H-11<math>\beta</math></b>	2.37	<b>2.2-3.0</b>	2.2-3.0
<b>H-15</b>	3.55	<b>3.65</b>	2.2-3.0
<b>H-16</b>	1.10	<b>1.15</b>	1.11 (3H,d)
<b>H-17</b>	1.94	<b>1.94</b>	1.93 (3H,s ancha)
<b>H-18</b>	0.96	<b>0.97</b>	0.91 (3H,s)
<b>H-19</b>	1.30	<b>1.27</b>	1.23 (3H,d)
<b>H-20</b>	1.37	<b>1.44</b>	1.47 (3H,s)

**Tabla 7.** Desplazamiento químico en RMN de  $^1\text{H}$  de Citlalitona y Jatrophatriona

### Extracto metanólico

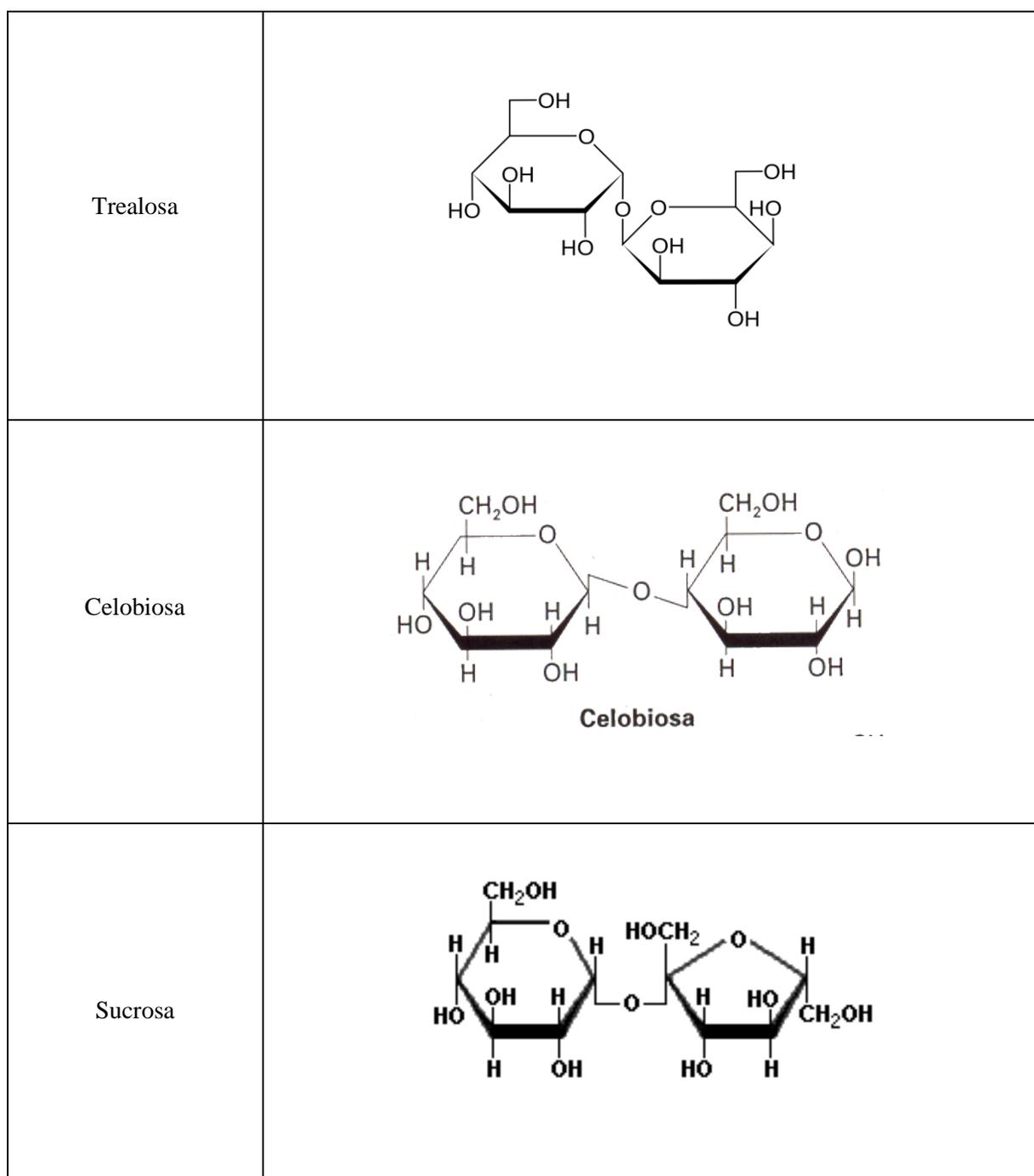
Al someter la raíz molida al sistema de extracción metanólico se obtuvo un rendimiento de 5.4 g de extracto seco por cada 100g, realizando dos extracciones de la misma raíz, que se sometieron a cromatografía en columna y se usaron los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol con un incremento de gradiente de 20%. En las fracciones 115-121 se obtuvo un sólido que presentó en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  señales múltiples en la región de 2.5 a 5.5 ppm como se muestra en la Figura 9, esto indica que corresponde a un compuesto polioxigenado característico de un disacárido; comparando los espectros obtenidos en este estudio con los ya reportados en la literatura de disacaridos  $\alpha,\beta$  trealosa,  $\alpha$ -celobiosa,  $\beta$ -celobiosa y sucrosa (Tabla 8) se observa que

presentan características similares con datos que se acercan a los que se observan en el espectro experimental (Tabla 8); varias señales coinciden y dentro de las más parecidas observamos la sucrosa y celobiosa. Como se puede observar los datos de la sucrosa obtenidos del libro de Eberhard Breitmaier y Wolfgang Voelter, son los que más coinciden con el disacárido obtenido de *J. dioica*, aunque se desconoce en qué disolvente fueron determinados dichos espectros, los datos son los que más se parecen lo que lleva a pensar que el compuesto obtenido podría corresponder a la sucrosa o sacarosa.

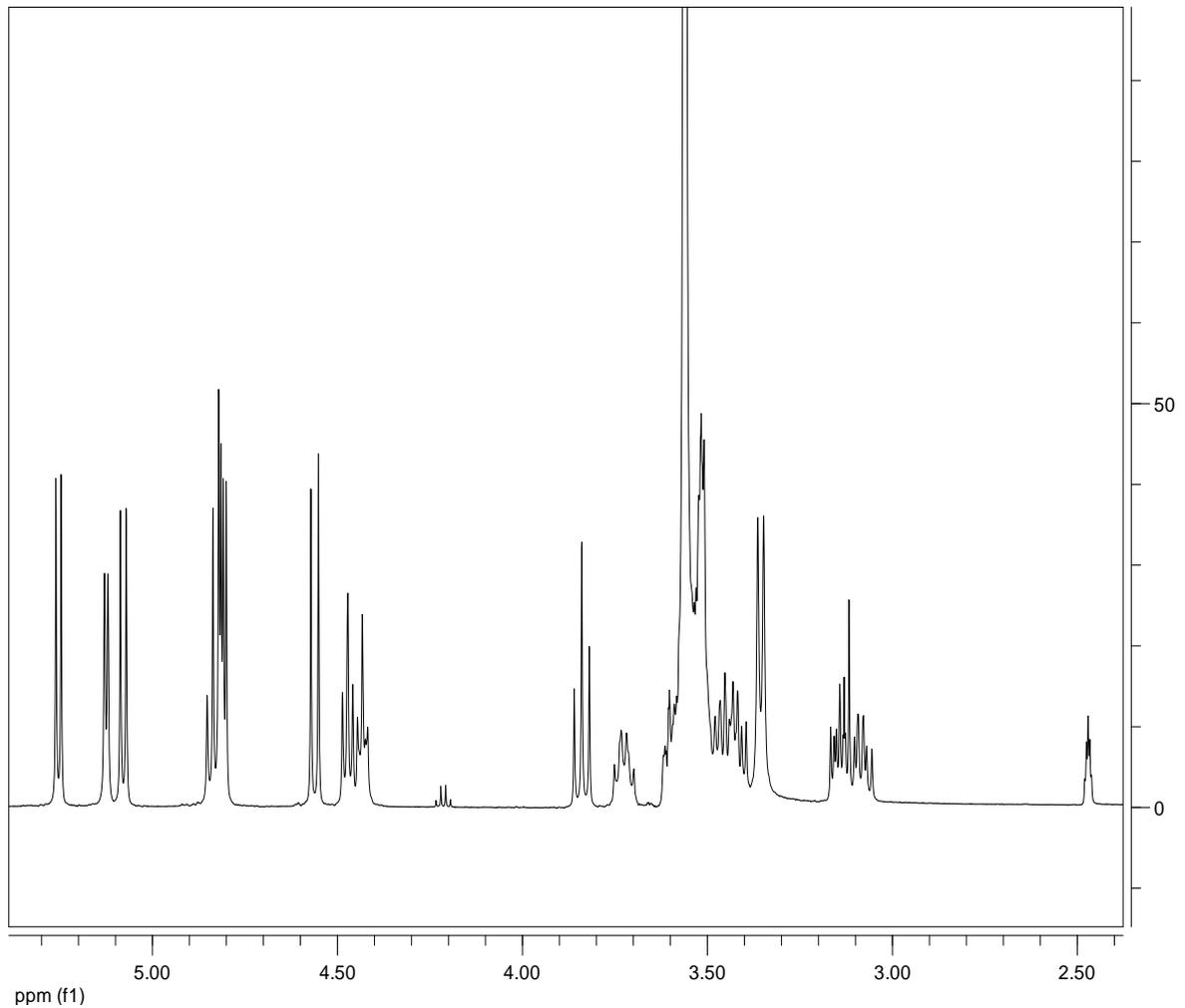
C	$\alpha,\beta$ trealosa D <sub>2</sub> O ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura	$\alpha$ -celobiosa * ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura **	Disacárido de jatropa DMSO ( $\delta$ /ppm) Experimental	$\beta$ -celobiosa * ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura **	Sucrosa D <sub>2</sub> O ( $\delta$ /ppm) reportado en catálogo Aldrich	Sucrosa * ( $\delta$ /ppm) reportado en la literatura **
1	100.9	103.3	<b>104.2</b>	103.3	<b>106.4</b>	104.4
2	72.4	74.1	<b>62.2</b>	74.1	<b>65.1</b>	63.3
3	73.8	76.5	<b>74.4</b>	76.5	<b>76.7</b>	75.0
4	70.4	70.4	<b>70.0</b>	70.4	<b>71.9</b>	70.2
5	73.6	76.8	<b>77.1</b>	76.8	<b>79.1</b>	77.4
6	61.6	61.6	<b>62.3</b>	61.6	<b>62.8</b>	63.4
1'	103.6	92.7	<b>92.0</b>	96.6	<b>94.9</b>	92.9
2'	74.1	72.3	<b>73.1</b>	74.9	<b>73.8</b>	73.6
3'	76.4	72.3	<b>73.0</b>	75.3	<b>75.3</b>	73.3
4'	70.4	79.6	<b>82.7</b>	79.5	<b>84.1</b>	82.2
5'	77.0	71.0	71.8	75.6	<b>75.1</b>	72.0
6'	61.6	61.1	<b>60.6</b>	61.1	61	61.1

**Tabla 8.** Desplazamiento químico en RMN de  $^{13}\text{C}$  de los disacáridos  $\alpha,\beta$ -trealosa,  $\alpha,\beta$ -celobiosa, sucrosa y el encontrado en *J. dioica*. \* Nota: en la referencia no se describe el disolvente. \*\* Eberhard Breitmaier, Wolfgang Voelter, Carbon-13 NMR Spectroscopy:

High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry.  
Third, completely revised edition 1987, Editorial VCH (Federal Republic of Germany).

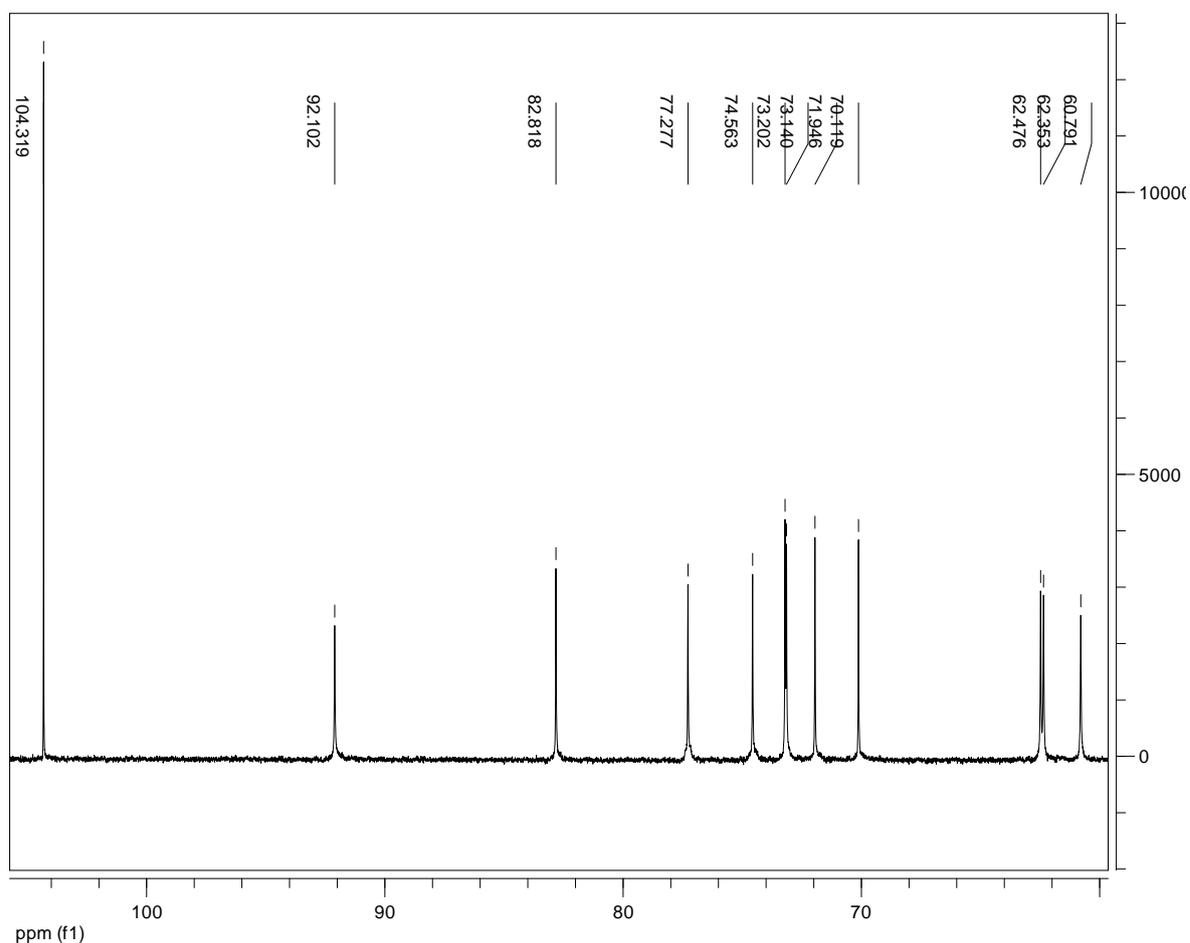


**Figura 8.** Estructuras químicas de disacáridos trealosa, celobiosa y sucrosa.



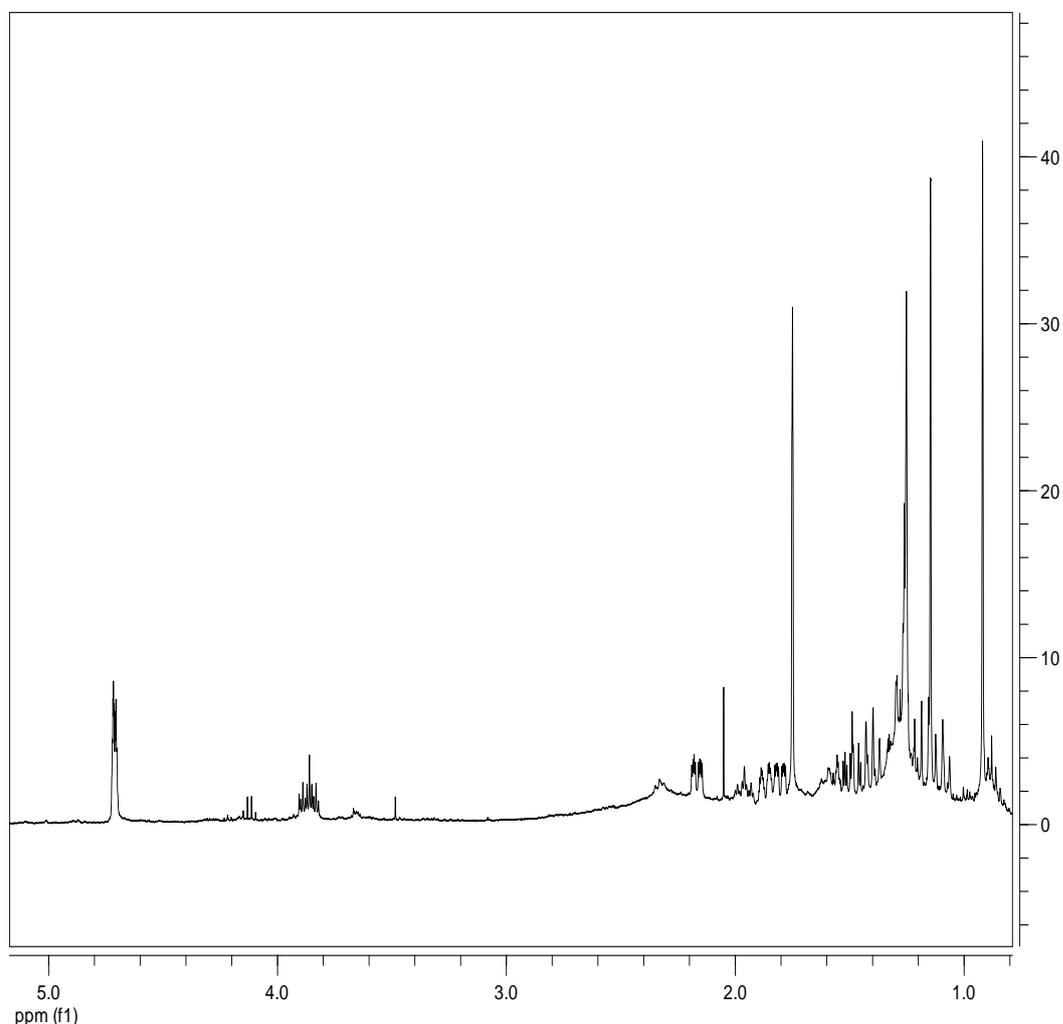
**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de las fracciones 115-121 del extracto MeOH

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 10), se observaron 12 señales en la región de 60 a 105 ppm también características de carbonos unidos a oxígeno, lo que indicaría que se trata de un disacárido.



**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de las fracciones 115-121 (cristales) del extracto MeOH en DMSO

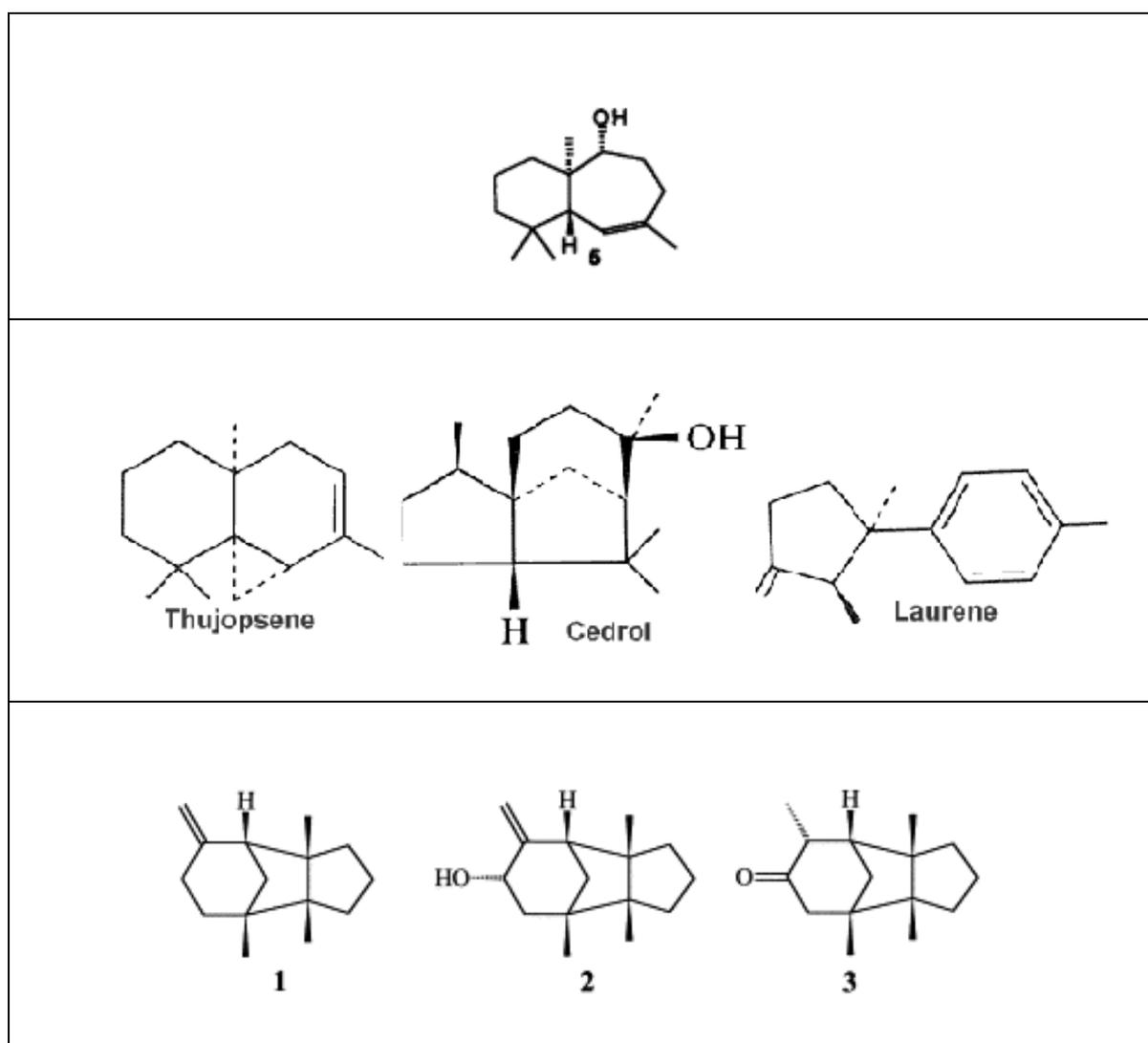
En la cromatografía en columna del extracto metanólico en la fracción 89 se obtuvo otro compuesto que mostró en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  señales para cuatro metilos 0.91, 1.14, 1.25, 1.75 a campo alto y una señal en 4.71 ppm que podría ser de un protón vinílico y una señal múltiple en 3.86 de un protón base de oxígeno acoplado a otros hidrógenos vecinos. También se distinguen dos señales dd en 2.16 ppm (Figura 11).



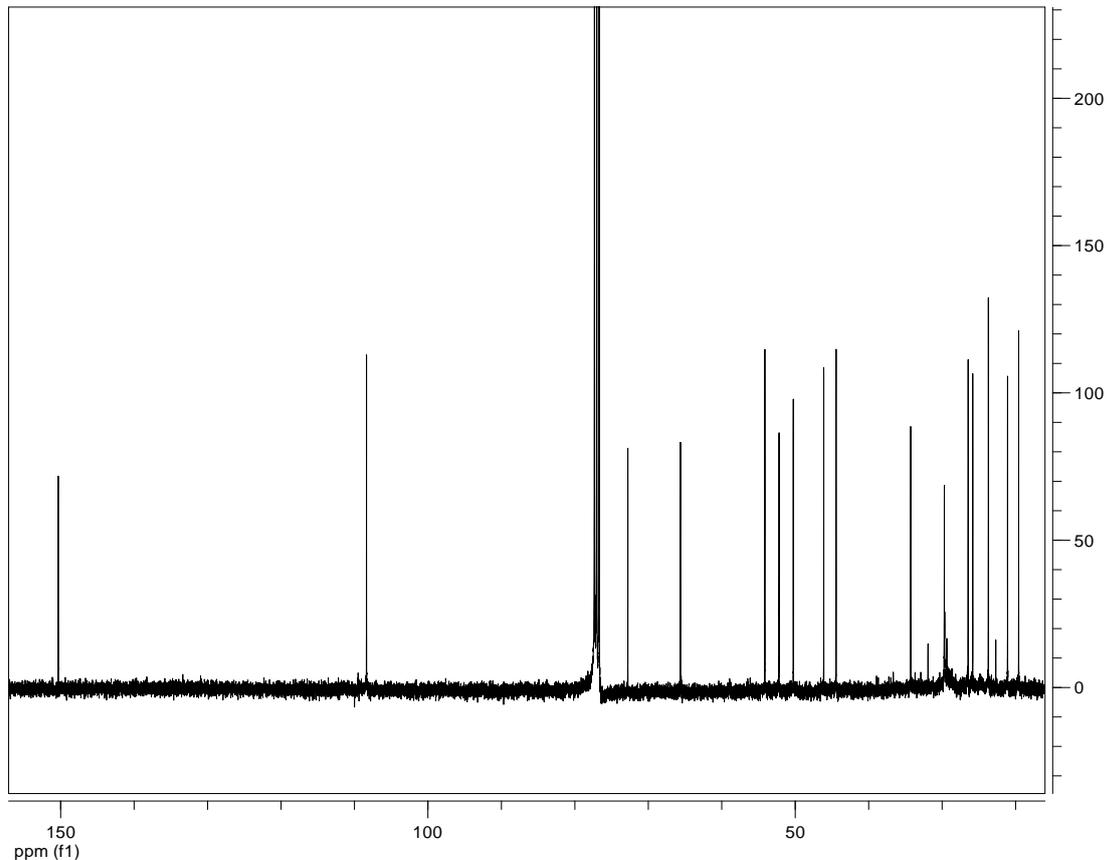
**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de la fracción 89 del extracto MeOH en  $\text{CDCl}_3$

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 13) se distinguen 16 señales en 150.3, 108.3 que representan a un enlace doble, una señal en 72.7, 65.6, 54.1, 52.1, 50.2, 46.1, 44.4, 34.2, 29.6, 26.4, 25.8, 23.6, 21.0 y 19.5. Las señales que están en 65.6 y 72.7 son señales de carbonos que están unidos a oxígeno y el resto son de señales de metilos, metilenos y metinos. Después de revisar la literatura aún no se concreta la estructura que coincida con estos datos, pero enseguida se muestran algunos esqueletos que coinciden con algunas características espectrales con el compuesto aislado (Fig. 12), dichas características son esqueletos sesquiterpénicos que tienen metilos unidos a carbonos

cuaternarios, un metilo unido a un alqueno, un hidrogeno vinílico y un hidrogeno unido en un carbono base de oxígeno. No todas las imágenes que se presentan en la Figura 12 coinciden con estas características pero pudiera haber en la literatura reportado alguno con este esqueleto y que cumpla con dichas características. El espectro de  $^{13}\text{C}$  muestra las señales que aparecen en 150.3 y 108.3 indican un posible doble enlace y las señales que salen en 72.7 y 65.6 pueden ser carbonos unidos oxígenos. Se muestra solo el esqueleto aunque falta encontrar el que cumpla con los datos de RMN. Lo observado nos sugiere que la estructura del compuesto analizado corresponde a un sesquiterpeno.



**Figura 12.** Estructuras químicas de sesquiterpenos



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de la fracción 89 del extracto MeOH EN  $\text{CDCl}_3$

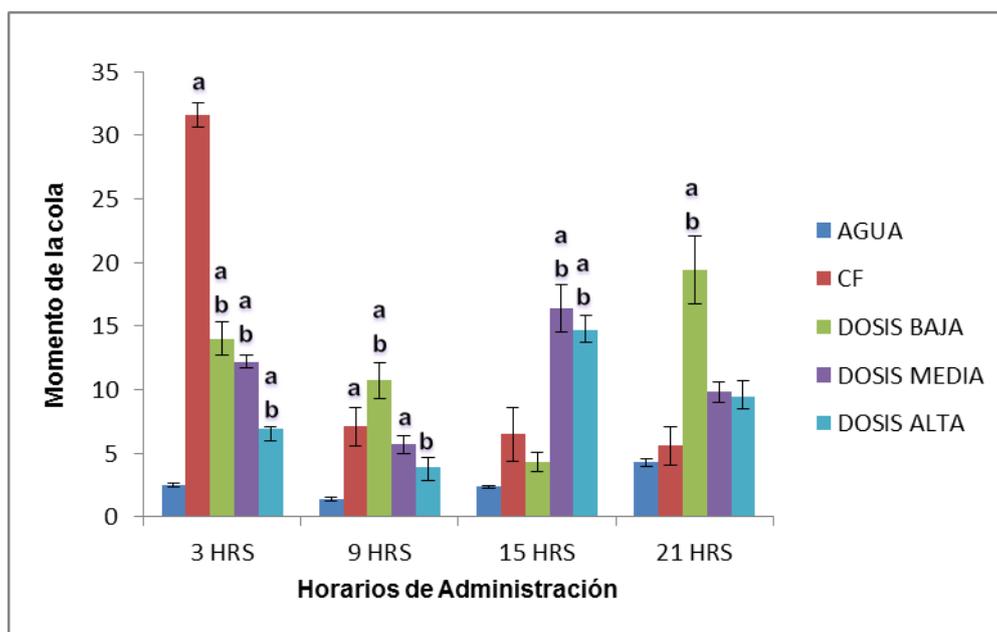
## 9.2. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de *J. dioica* en células hepáticas

### 9.2.1. Momento de la cola en células hepáticas

Los resultados en la gráfica 1, muestran el efecto en células de hígado de los ratones tratados con la decocción de la raíz de *J. dioica* a diferentes dosis, observando que a las 3 hrs de administración hay fragmentación del DNA, siendo las dosis baja y media las que presentan el mayor daño con diferencia estadísticamente significativa en comparación con los testigos positivo (CF) y negativo (Agua). A las 9 horas podemos observar que el grupo administrado con la dosis baja de la decocción fue la que presentó mayor fragmentación de DNA con una diferencia significativa en comparación a los testigos, en donde ambos mostraron bajos niveles. En el horario de 15 horas el

daño del DNA se observó mayor en las dosis media y alta sobrepasando con diferencia significativa a los testigos. Finalmente en el horario de 21 horas se volvió a observar que la dosis baja presentó mayor porcentaje de fragmentación del DNA con diferencia significativa para el control positivo y negativo. Sorpresivamente el tratamiento con CF el control positivo no muestra momentos de cola altos en todos los horarios, siendo solo a las 3 horas que causa mayor fragmentación del DNA en comparación con los demás horarios con diferencias significativas con relación al control negativo.

Mientras que en el control negativo (agua), se observa que los niveles de degradación del DNA, puedan alcanzar momento de la cola con valores menores a 5, tomando entonces estos como grados de daño basal que ocurre en las células de estos ratones sin tratamiento fitoquímico o farmacológico.

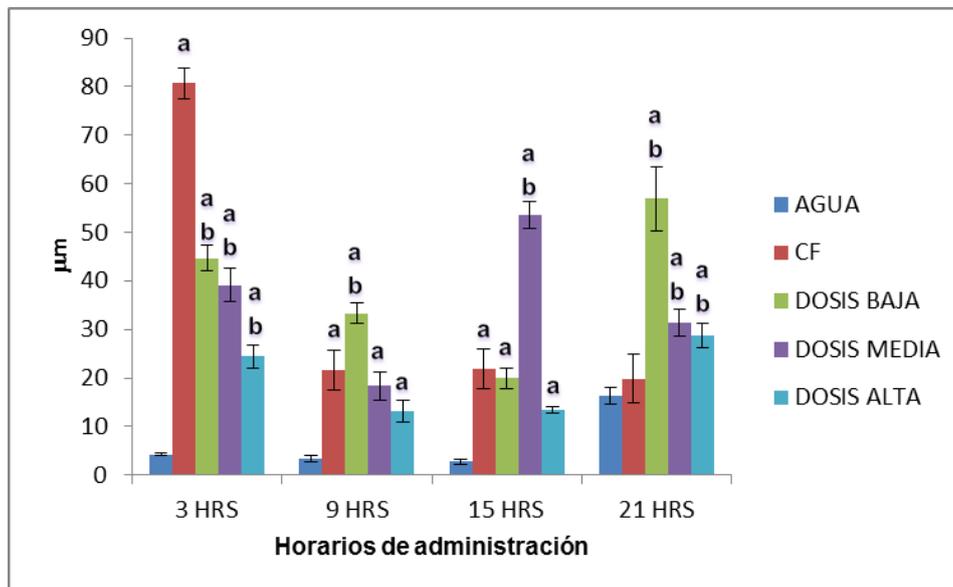


**Gráfica 1. Momento de la cola de células del hígado tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica* estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$  a: contra testigo negativo b: contra testigo positivo**

### 9.2.2. Longitud de la cola en células hepáticas

La grafica 2 nos muestra las diferencias obtenidas en la longitud de la cola indicando que en el horario de 3 horas, el efecto del testigo positivo se mostró incrementado en comparación con los demás grupos con diferencia significativa. Además que al igual que lo observado con momento de la cola, es el único horario con el que se observaron longitudes de cola mayores. Entre las tres dosis de la decocción en este mismo horario también se presenta diferencia significativa con menor longitud de la cola en el grupo con dosis alta con respecto a las otras dosis. A las 9 horas de administración, la dosis baja presentó mayor longitud de la cola con diferencia significativa pero menor al horario anterior, en comparación con los grupos testigos. En el caso del horario de 15 horas la dosis media presentó el valor de longitud de cola más grande en comparación con los demás grupos. Interesantemente, a las 21 horas los testigos positivo y negativo tuvieron las menores longitudes de la cola en comparación con los grupos de las decocciones, que presentan colas de cometa de longitud más larga con diferencia significativa; se vio mayor longitud en dosis baja.

El control positivo tiende a disminuir su valor de longitud de cola y se correlaciona con los valores obtenidos de momento de la cola, similar al control negativo, el cual aumenta ligeramente hasta valores cercanos a 15  $\mu\text{m}$ , tomando entonces estos niveles como basales de daño.



**Gráfica 2. Longitud de la cola de células del hígado tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$  **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo

### 9.2.3. Índice de daño celular hepático

Como podemos observar en la tabla 8, en el control negativo el mayor porcentaje de nucleoides se encuentran entre grado 0 y 1 en todos los horarios, lo que indica así como lo han reportado otros estudios, que se encuentra en un nivel basal sin daño o con daño mínimo (Arencibia, 2011); el control positivo presentó la mayoría de nucleoides en grados 3 y 4 con porcentajes de 37.2 y 41.6 respectivamente, en el horario de 3 horas; en los demás horarios el daño fue variable oscilando entre los grados 0 y 4. Las células observadas de los ratones tratados a diferentes dosis de la decocción empleadas oscilan mayoritariamente entre grado de daño 0 y 1 en las 9 y 15 hrs, a las 3 hrs la dosis media mostró grados de daño principalmente en 2 y 3 y a las 21 horas las dosis baja y media muestra porcentajes principalmente en grado 1 y 2.

Los índices de daño basales van desde 70-84 unidades comparando con el control positivo que causa un daño importante más a las 3 horas. Las dosis de tratamiento muestran índices de daño moderado entre ellas sin diferencia aparente en su efecto pero superiores al nivel de daño basal (agua) y similares al control positivo excepto a las 3 horas.

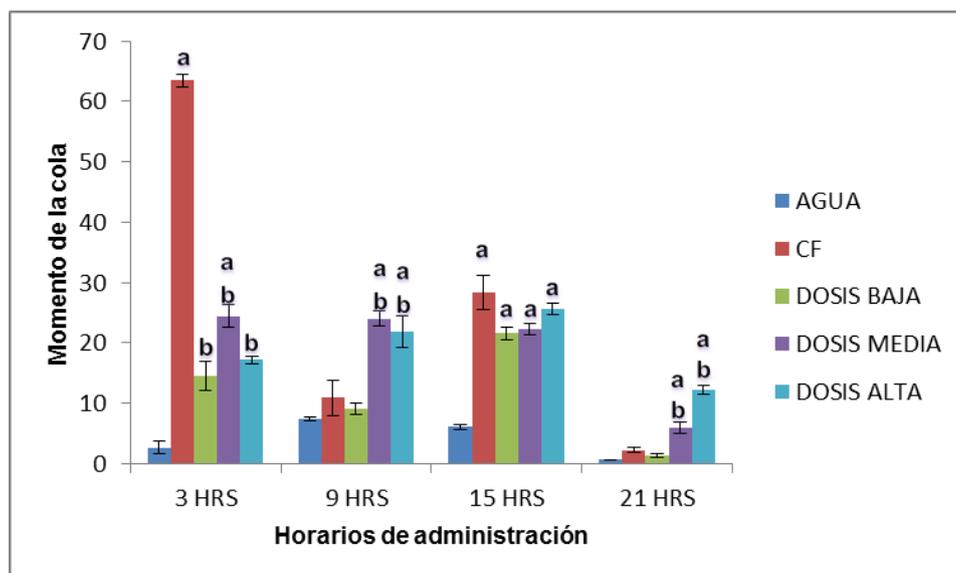
**Tabla 8. Índice de daño en células de hígado tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica* Estadísticamente significativo con la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis con un IC 95% y  $p < 0.05$ . **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo**

CLASIFICACION DEL DAÑO		GRADO					INDICE DE DAÑO
		0	1	2	3	4	
3 HORAS	Tratamiento	%	%	%	%	%	
	AGUA	44	47	5.6	1.8	1.6	70±7.39
	CF	1.2	2.8	17.2	37.2	41.6	315±16.35
	DOSIS BAJA	15.2	65.8	11.4	7.2	0.4	112±4.17 <b>b</b>
	DOSIS MEDIA	13.2	50.8	19.6	15.6	0.8	140±5.93 <b>a,b</b>
	DOSIS ALTA	22.2	40.4	18.2	11.6	7.6	142±11.03 <b>a</b>
9 HORAS	AGUA	44.4	46.2	5.4	3	1	70±10-15
	CF	32.8	38.8	12.4	14.4	1.6	113±16.64
	DOSIS BAJA	17.2	56.8	16.4	9	0.6	119±13.23 <b>a</b>
	DOSIS MEDIA	29.2	61.4	5.4	4	0	84±10.22
	DOSIS ALTA	28.4	36.6	23	9.6	2.4	121±9.60 <b>a</b>
15 HORAS	AGUA	25.2	63.8	9.4	1.6	0	78±3.65
	CF	9.6	34.6	24	27.8	4	182±29.22
	DOSIS BAJA	30.6	52.4	10	6.8	0.2	94±8.37
	DOSIS MEDIA	17.6	51.4	16.6	13.6	0.8	129±8.68 <b>b</b>
	DOSIS ALTA	22.2	45.4	18	12.2	2.2	127±9.41
21 HORAS	AGUA	19.2	72.6	8	0.2	0	89±2.88
	CF	18	23.2	30	26	2.8	172±18.36
	DOSIS BAJA	9.6	52.6	23.4	12.8	1.6	144±10.01
	DOSIS MEDIA	7.8	63.2	15.4	13	0.6	135±4.611
	DOSIS ALTA	15.8	54.8	12.4	15	2	133±25.106

### 9.3. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de *J. dioica* en células renales

#### 9.3.1. Momento de la cola en células renales

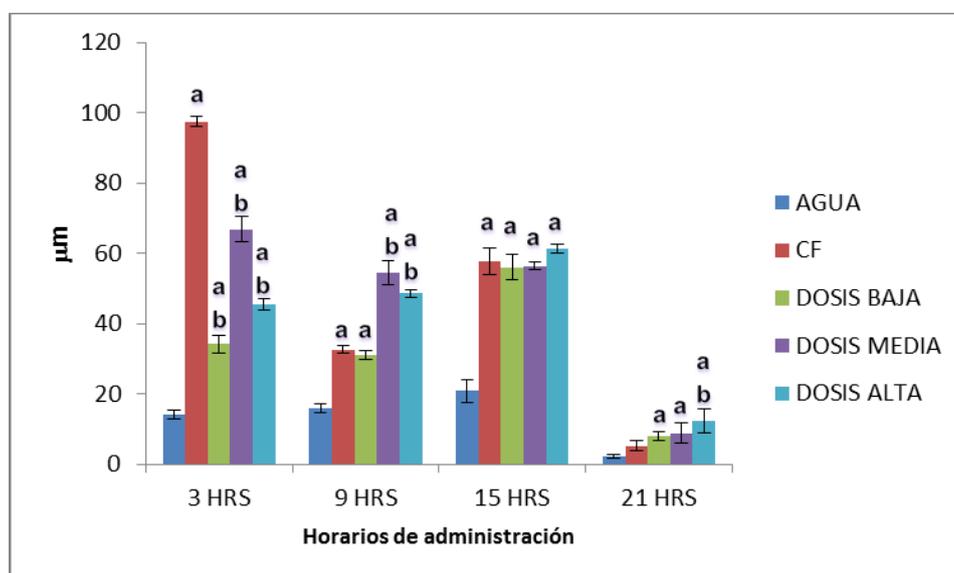
Podemos observar en la Gráfica 3, que en células renales de los animales tratados con el control positivo a las 3 horas se presentó el mayor grado de fragmentación en el DNA, teniendo con los demás grupos una diferencia significativa. A las 9 horas los grupos administrados con las dosis media y alta de la decocción muestran mayor daño del DNA con diferencia significativa contra los testigos. En las 15 horas tanto el testigo positivo como las tres dosis de decocción muestran valores similares de fragmentación con diferencia significativa comparado contra el control negativo. Finalmente a las 21 horas se observa que las rupturas del material genético fueron menores en todos los grupos. Nuevamente se observa que en el caso de la CF, los valores de momento de cola se ven disminuidos a partir de las 9 hrs, pero con respecto a la lectura de 3 hrs volvemos a observar que los valores basales de daño (agua) no sobrepasan el valor de 10 en éste parámetro.



Gráfica 3. Momento de la cola de células de riñón tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica* estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$ . a: contra testigo negativo b: contra testigo positivo

### 9.3.2. Longitud de la cola en células renales

En el parámetro de longitud de la cola de los cometas evaluados, como podemos observar en la gráfica 4, en el horario de 3 horas el control negativo muestra que las rupturas del DNA son menores significativamente con respecto al testigo positivo y las tres dosis de tratamiento. A las 9 horas de administración las dosis media y alta presentaron diferencia estadística en comparación con los controles indicando mayor fragmentación de DNA comparado con el testigo negativo, observando que la CF muestra daño parcial del DNA en éste horario. Las células de ratones administrados a las 15 horas tanto del control positivo como de las tres dosis de decocción mostraron comportamiento similar teniendo mayor longitud de la cola en comparación con el testigo negativo. En el horario de 21 horas la dosis alta presentó mayor fragmentación incluso que la CF con diferencia significativa, todas las longitudes de cola medidas están en el rango considerado como basal que suele presentar el control negativo (agua).



**Gráfica 4. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$ . **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo

### 9.3.3. Índice de daño en células renales

Con respecto al índice de daño en riñón como se muestra en la Tabla 9, el control negativo mostró la mayoría de nucleoides en grado 0 y 1 para todos los horarios. El control positivo se comportó de la misma manera que en hígado, a las 3 hr la mayoría de sus nucleoides se observaron en grados 3 y 4, a las 9 y 15 horas en grados 1 a 3 y para 21 horas en grados 2 y 3. Los índices de daño en las decocciones, la dosis baja y dosis media oscilaron en grados de 1 al 3 en los diferentes horarios; la dosis alta presentó mayoría de daño a las 3 horas en todos los grados de manera muy homogénea, en los horarios de 9 y 15 hrs fluctuó entre 0 y 3 y en el horario de 21 hrs se observó un gran número de nucleoides con grado de daño 3.

Con relación a los índices de daño calculados, los valores basales fluctúan entre 82 y 107 unidades, para el control negativo son entonces estos valores de daño basal en las células de riñón. Mientras que el control positivo se observó un índice de daño dos veces superior en todos los horarios. Las dosis de tratamiento muestran índices de daño similares entre ellas pero superiores al nivel de daño basal (agua) y similares al control positivo excepto a las 3 horas.

**Tabla 9. Índice de daño en células de riñón tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** Estadísticamente significativo con la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis con un IC 95% y  $p < 0.05$ . **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo.

CLASIFICACION DEL DAÑO		GRADO					INDICE DE DAÑO
		0	1	2	3	4	
3 HORAS	Tratamiento	%	%	%	%	%	
	AGUA	28.6	63.4	5.6	2.4	0	82±6.79
	CF	0	2.8	7.2	51.2	38.8	326±18.17
	DOSIS BAJA	8	55	23.2	11.2	2.6	145±11.89 <b>b</b>
	DOSIS MEDIA	6.4	11.8	14.2	65	2.6	246±20.90 <b>a</b>
	DOSIS ALTA	10.6	26	22.4	18.4	22.6	216±8.95

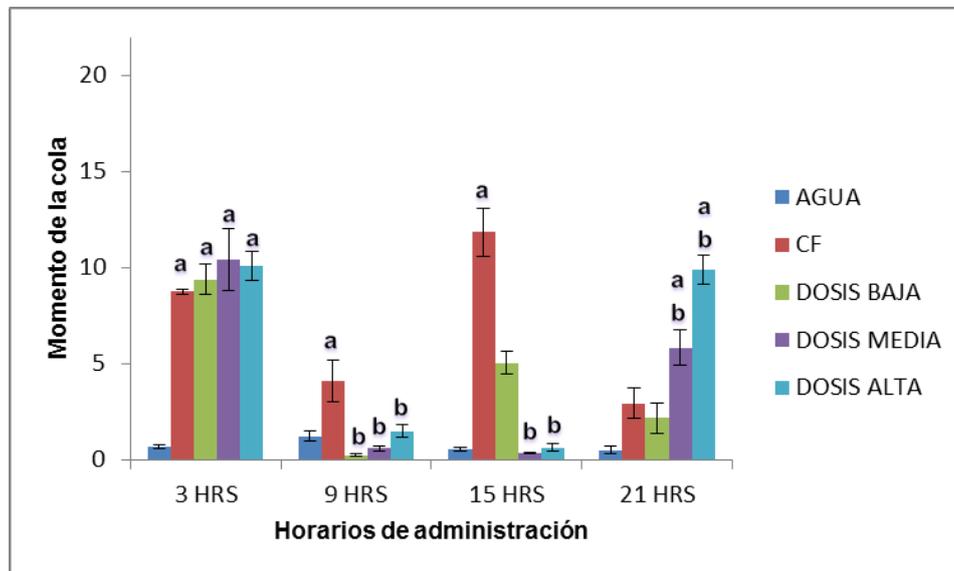
9 HORAS	AGUA	39.4	43	11.8	4.6	1.2	85±3.21
	CF	10.8	24.8	14.8	43.6	6	209±22.88
	DOSIS BAJA	9.4	38.2	34.4	16.6	1.4	162±7.31 a
	DOSIS MEDIA	7.8	61.6	23.2	7	0.4	131±11.07
	DOSIS ALTA	19.8	38.4	17.2	16.8	7.8	154±14.40
15 HORAS	AGUA	14.4	66	18.2	1.4	0	107±3.54
	CF	6.8	19.2	16.6	48.2	9.2	234±34
	DOSIS BAJA	7.2	17.2	32.6	39.8	3.2	215±14.137 a
	DOSIS MEDIA	13.6	47.6	16.8	21.6	0.4	148±9.125
	DOSIS ALTA	15	38	24.8	17.6	4.6	159±8.726
21 HORAS	AGUA	17.6	63.4	15.8	3.2	0	105±2.90
	CF	9.2	13.6	20.4	43.2	13.6	238±37.58
	DOSIS BAJA	6.2	37.4	34.8	21.2	0.4	172±8.49
	DOSIS MEDIA	7	28.2	26.2	35.2	3.4	200±24.87
	DOSIS ALTA	7.8	14.4	6.8	63.6	7.4	248±15.25 a

#### 9.4. Cinética del efecto genotóxico de la raíz de *J. dioica* en células de médula ósea

##### 9.4.1. Momento de la cola en células de médula ósea

En células de médula ósea a las 3 horas, los grupos administrados con la decocción y el testigo positivo presentaron fragmentación similar del DNA y se observó que tuvieron diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo (Grafica. 5). En el caso de las 9 horas, el grupo que presenta mayor número de rupturas del DNA es el testigo positivo mostrando significancia estadística contra las tres dosis de la decocción con momentos de la cola muy bajos. Se puede observar que a las 15 horas el grupo de CF obtuvo el mayor daño seguido por la dosis baja presentando diferencia estadística contra agua; las dosis media y alta muestran momentos de la cola similares al control negativo. A las 21 horas la dosis media y alta presentaron mayor fragmentación de

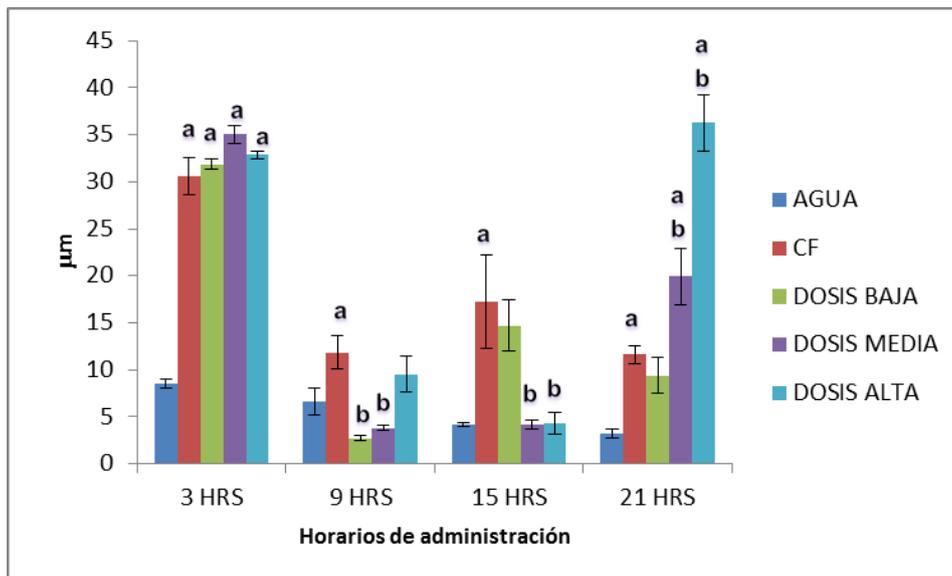
DNA, incluso que el testigo positivo, con diferencia estadística también contra el control negativo, el cual muestra sus valores más bajos de momentos de cola.



**Gráfica 5. Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$ . **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo

#### 9.4.2. Longitud de la cola en células de médula ósea

Se observó (Gráfica. 6), que el grupo administrado con CF y las tres dosis de la decocción a las 3 hrs de administración mostraron longitud de cola con comportamiento similar y muy elevada, con diferencia significativa comparada con el testigo negativo, similar a la gráfica anterior de momento de cola. A las 9 horas las dosis baja y media presentaron una longitud de la cola menor a los demás grupos, mostrando diferencia significativa contra el testigo positivo. A las 15 horas de administración las dosis media y alta tuvieron similitud a la del testigo negativo, mientras que la dosis baja se comporta similar al control positivo, quienes tienen los valores más altos. En el horario de administración a las 21 horas las dosis media y alta mostraron valores de longitud de cola más altas con diferencia estadística en comparación de los testigos.



**Gráfica 6. Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** estadística realizada con prueba de comparación múltiple de t de Student-Newman-Keuls con un IC de 95% y  $p < 0.05$   
**a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo

#### 9.4.3. Índice de daño en células de médula ósea

En las células de médula ósea se observó (Tabla. 10), que el control negativo no reporto daño conservando sus valores de daño basales en grados de 0 y 1. El control positivo solo a las 3 horas mostró un grado de daño entre 2 y 3 principalmente ya que en los demás horarios osciló entre grados 0 y 2. Las dosis de la decocción tuvieron un comportamiento similar al control negativo ya que la mayoría de sus nucleoides mostraron porcentajes de daño de grado 0 y 1 en todos los horarios.

Con respecto a los índices de daño calculados, se observa que para el control negativo se obtienen valores cercanos a 50 U, mientras que el control positivo únicamente muestra valores de índice de daño a las 3 hrs superiores hasta 4 veces más que el control. En cuanto a las decocciones, no se muestra un índice de daño en los tratamientos a excepción de la dosis media en el horario de 3 hrs, la dosis alta a las 9 hrs y la dosis baja a las 15 hrs.

**Tabla 10. Índice de daño en células de médula ósea tratadas con 3 dosis de decocción de la raíz de *J. dioica*** Estadísticamente significativo con la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis con un IC 95% y  $p < 0.05$ . **a:** contra testigo negativo **b:** contra testigo positivo

CLASIFICACION DEL DAÑO		GRADO					INDICE DE DAÑO
		0	1	2	3	4	
3 HORAS	Tratamiento	%	%	%	%	%	
	AGUA	55.6	39.2	3.2	2	0	52±4.26
	CF	0	8.2	37.4	46.4	8	254±27.92
	DOSIS BAJA	54.6	42	2.8	0.6	0	49±4.98 <b>b</b>
	DOSIS MEDIA	34.8	29.6	15.4	20.2	0	121±7.43 <b>a</b>
	DOSIS ALTA	37.6	38	16.6	6.6	1.2	96±7.97 <b>b</b>
9 HORAS	AGUA	53.2	38.8	5.4	2.6	0	57±1.5
	CF	41.6	36	6.4	14	2	90±22.49
	DOSIS BAJA	52	27	13	7.2	0.8	78±4.294
	DOSIS MEDIA	45.6	48.4	4.2	1.8	0	62±4.28
	DOSIS ALTA	42.8	22.6	8	14	12.6	131±9.53 <b>a</b>
15 HORAS	AGUA	60.4	34.8	4	0.8	0	45±1.02
	CF	29	21	32	14	4	143±17.19
	DOSIS BAJA	26	32	26	13	3	135±5.84 <b>b</b>
	DOSIS MEDIA	54.6	44.2	1.2	0	0	47±3.05 <b>b</b>
	DOSIS ALTA	65	19	8	5.8	2.2	61±5.67
21 HORAS	AGUA	52.8	43.8	3.4	0	0	51±3.45
	CF	44.4	24.8	12	16	2.8	108±29.07
	DOSIS BAJA	57	34	6	2.8	0.2	55±5.09
	DOSIS MEDIA	33.8	44.2	15.2	6.6	0.2	95±9.89
	DOSIS ALTA	45.4	39	5.6	6	4	84±8.59

## X. DISCUSIÓN

A la raíz de la planta *J. dioica* se le realizaron estudios fitoquímicos y análisis a través de tamizaje. El tamizaje consiste en un conjunto de técnicas que permiten evaluar alguna posible acción farmacológica así como la toxicidad que pudiera causar (Osorio, 2009). A través de estas metodologías se pueden determinar los principales grupos químicos en la planta y aislar los compuestos de mayor interés. Los estudios previos realizados en la planta se han enfocado a los compuestos de la fracción no polar habiéndose aislado los diterpenos rialozatriona y citlalitriona (Rosales, 2001). También se ha reportado la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, cumarinas y saponinas. Por lo tanto, en este tamizaje se realizaron extracciones con diferentes polaridades como se ha descrito en la bibliografía para encontrar compuestos que no hayan sido reportados y que pudieran aparecer en la fracción polar o no polar, e incluso identificarlos (Barrón, 2011) (Osorio, 2009).

De los diferentes extractos realizados de la raíz de *J. dioica*, el del hexano mostró mayor rendimiento seguido por el de metanol y el acuoso, lo cual permite suponer que las sustancias solubles mayoritarias en esta planta son compuestos no polares, que se encuentran proporcionalmente hasta dos veces más abundantes que los del extracto acuoso. Para la finalidad de este estudio de genotoxicidad son los compuestos polares los de principal interés, ya que se experimentó el consumo de la decocción en un modelo biológico de la raíz usando como disolvente el agua debido a que la gente así lo consume para el tratamiento de algunos padecimientos (Sánchez, 2005). Sin embargo, es importante conocer los compuestos que se obtienen de diferente polaridad ya que al tomar la decocción se pueden ingerir trazas de la raíz y a través del proceso digestivo se pueden absorber sustancias no polares de manera independiente o sinérgica que podrían causar alguna actividad biológica debido a que el proceso incluye un colado y no un filtrado.

Todos los extractos mostraron presencia de alcaloides, según la prueba de Dragendorff, que son sustancias orgánicas nitrogenadas generalmente con característica básica, de

estructuras complejas, lo que hace que sean capaces de ejercer diferentes acciones fisiológicas (Arango, 2008). Entre las principales actividades biológicas de los alcaloides, podríamos mencionar su uso en el tratamiento de cáncer, actuando como agente citotóxico; un ejemplo de algunos alcaloides es el de la vinca que se considera un veneno del huso mitótico ya que se une a la tubulina e interviene con su formación, de ahí su utilidad en estas afecciones (Barroso, 1999).

Se han estudiado raíces de otras especies de *Jatropha* como de *J. gaumeri*, *J. zeyberi*, *J. curcas*, *J. gossypifolia*, *J. macrorbiza* y *J. dioica* (Villareal, 1988) donde también se han reportado terpenos como  $\alpha$  y  $\beta$ -amyrin, jatrofona, jatrofholonas, jatrofhatriona, riolozatriona, citlalitriona, entre otras, que presentan actividad antibacteriana, antiinflamatoria y antitumoral (Can, 2004). En este estudio, al someter el extracto acuoso en cromatografía, se encontró una fracción sólida eluída con polaridad 80:20 hexano: AcoEt sometida al espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que corresponde con la ya conocida citlalitriona, un diterpeno tricíclico que ha sido estudiado para el desarrollo de agentes anticancerígenos y que podrían tener actividad citotóxica, antitumoral y antimicrobiana, como ocurre con otros diterpenos (Devappa, 2011). Con relación al extracto metanólico, se obtuvo un sólido en las fracciones 115-121 que presentó señales en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que corresponden a un compuesto polioxigenado característico de un disacárido que hasta ahora no se ha reportado en la literatura. Otra fracción de interés de este extracto fue la 89 en la cual se encuentran señales en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para cuatro metilos a campo alto y una señal de protón vinílico, además en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se distinguen 16 señales todo correspondiendo a un sesquiterpeno y que en un futuro se deberá determinar la estructura completa del mismo.

Con las diferentes dosis de la decocción de la raíz de la planta *J. dioica* se exploró el efecto genotóxico por medio del ensayo cometa. En los estudios de genotoxicidad *in vivo* es sabido que se emplean sustancias mutagénicas conocidas como controles positivos (Arencibia, 2011). La CF fue seleccionada como testigo positivo como un

parámetro para poder establecer y comparar el potencial dañino de la decocción de *J. dioica* por micronúcleos y ensayo cometa (Arencibia, 2010).

En la evaluación de los momentos de la cola en células de los diferentes órganos, pudimos observar que en hígado las tres dosis de la decocción de la *J. dioica* a las tres horas de administración mostraron fragmentación del DNA, siendo la dosis baja la que presenta mayor daño genotóxico. Interesantemente, a las 9 horas de administración la dosis baja de la decocción de *J. dioica* se vio un aumento considerable de daño con respecto a los demás grupos, lo que se podría relacionar a la farmacocinética de algunos xenobióticos como el vanadio, que pueden causar importante daño al DNA, que administrado en dosis altas puede provocar apoptosis o necrosis y que en dosis bajas actúan como veneno del huso mitótico; por ello podríamos suponer que la dosis baja del té pudiera tener mayor actividad genotóxica pero habrá que comprobar los mecanismos a través del cual ejerce su acción genotóxica dosis dependiente (Rodríguez, 2006). El hígado es un órgano de biotransformación de numerosos fármacos y en él se alcanzan altas concentraciones de los mismos o de sus derivados metabólicos, que pueden producir efectos tóxicos, por ello la importancia de evaluar su daño genotóxico en este estudio (Bello, 2001). La disminución del efecto genotóxico de las otras dosis de la decocción, se puede deber a la acción de los flavonoides, que tienen su biotransformación en hígado por medio de reacciones con capacidad antioxidante que se sabe tienen efectos terapéuticos y disminuyen el riesgo a daño genotóxico; los flavonoides podrían ser menos biodisponibles a las 15 hrs y por ello no se observa el mismo efecto antioxidante sino que el daño se aumenta a la dosis media y dosis alta en este horario (Martínez, 2002). De manera ideal la mayoría del daño que se produce en el material genético debería ser reparado eficientemente por una compleja maquinaria enzimática de reparación. En el último horario de administración que fue de 21 hrs, en general no se observó daño al DNA, sin embargo en la dosis media de la decocción se muestra mayor genotoxicidad, lo que nos permite suponer que la defensa contra la acción de los agentes genotóxicos se vio disminuida y la mayoría del daño no pudo ser reparado y/o eliminado (Zuñiga, 2009).

El riñón participa activamente como filtro de desechos del flujo sanguíneo como fármacos, hormonas y xenobióticos, para su eliminación a través de la orina. Es el principal órgano de excreción a través de mecanismos que son realizados en diferentes partes de la nefrona, por ello la importancia de evaluar en este órgano el comportamiento del efecto genotóxico de la decocción de *J. dioica* (Bello, 2001). Pudimos notar en este órgano que la dosis media de la decocción mostró un comportamiento genotóxico similar al testigo positivo; incluso en longitud de la cola presentó mayor porcentaje de daño, siguiéndole la dosis alta y finalmente la baja. A las 9 y 15 horas la dosis baja mostró mayor genotoxicidad en comparación con los demás grupos. Se sabe que se han aislado en el riñón múltiples enzimas capaces de metabolizar xenobióticos. Una de ellas es la CYP2E1 que está relacionada a la toxicidad por ser fuente de metabolitos reactivos así como radicales libres de oxígeno, de ahí que es posible que pueda mostrar mayor actividad genotóxica de algunos componentes presentes en las dosis de la decocción que estén causando mayor daño (Net, 1999). Se puede observar a las 21 horas disminución en todos los grupos. Es posible que en este horario observemos menor daño debido a que cuando la exposición al xenobiotico causa la ruptura de las hebras del DNA, éste puede provocar aberraciones cromosomaticas, reparación del daño o apoptosis de las células dañadas. Probablemente lo que observamos a las 21 horas para momento y longitud de la cola es que las células podrían haber entrado en alguna de éstas posibilidades y visualmente nos indicaría que en apariencia el daño disminuye, pero para comprobar esta teoría se necesitarían realizar estudios más específicos debido a que no correlaciona con los valores de índice de daño observados, los cuales son altos (Jha N.A, 2008).

La médula ósea mostró que las tres dosis de la decocción a las 3 horas tuvieron un comportamiento de daño similar al testigo positivo tanto en momento como en longitud de la cola aunque no es muy alto en comparación con el observado en hígado y riñón. A las 9 hrs de administración las tres dosis de la decocción disminuyeron tanto en momento como en longitud de la cola mientras que a las 15 horas fue la dosis baja la que mostró mayor genotoxicidad en comparación que las demás dosis. Finalmente a las 21 horas la dosis alta muestra una tendencia de daño similar que a las 3 horas aunque

nuevamente el daño observado es mínimo con respecto a hígado y riñón. La médula ósea se evaluó debido a que esta planta es utilizada para el tratamiento de leucemias por lo que es importante saber si su ingesta podría causar efecto genotóxico en este órgano. La médula ósea es usada como diana para mutágenos ya que las aberraciones inducidas son de tipo cromatídico, está más vascularizado y contiene una población de células de ciclo muy corto las cuales pueden aislarse y tratarse con facilidad (Bello, 2001).

Con respecto al testigo negativo se observaron valores muy bajos para el momento y longitud de la cola (TM y TL) y el índice de daño, con lo cual se comprueba su efectividad como control negativo y que coincide con otros estudios, por lo que podemos tomar esos datos como daños basales que, ocurren de manera espontánea (Arencibia, 2010), permitiendo establecer un comparativo confiable comparado con el potencial genotóxico de la decocción.

El testigo positivo (CF) cumplió con los estándares de control en los tres órganos, sólo para el parámetro de índice de daño. En el hígado y riñón pudimos observar que en el momento y longitud de la cola en los parámetros evaluados, la CF mostró sus valores máximos de daño a las 3 horas después de su administración. Una vez atravesando el hígado, la CF se activa por CYTp450 e inicia su acción, ésta tiene una vida media de 3 a 12 hrs, por ello pudimos observar que sí cumplió como testigo positivo en este estudio tomando para TM y TL como referencia las 3 horas de administración, excepto para médula ósea (Baltar, 2010). La CF disminuye el funcionamiento del sistema inmune actuando sobre la síntesis de DNA, interfiriendo en la multiplicación de las células; su efecto mielosupresor se produce porque está involucrada en la duplicación de los linfocitos que son quienes controlan la función inmune, aunque en los resultados obtenidos no se observa un daño evidente en médula similar a lo que observó Arencibia (2010) en sangre periférica (Chile, 2003). En este estudio la CF no fue un adecuado control positivo por estas razones. La vida media de la CF antes de que se excrete en forma de metabolitos por riñón en un 85-90% es de 3 y 12 horas, es posible que debido a su metabolismo y posterior excreción, su efecto genotóxico se vea disminuido como lo vemos a partir de 9 hrs como en el caso del hígado (Baltar, 2010).

De manera global encontramos que el efecto genotóxico de la decocción de la raíz de *J. dioica* es dependiente de cada órgano y sigue una cinética particular, debido a que no se observa el mismo efecto genotóxico en los órganos probados. El daño observado es mayor en riñón hasta las 15 horas con un similar comportamiento en la mayoría de las dosis, seguido de hígado en el cual el daño más evidente es utilizando las dosis baja y media con diferentes variaciones de daño en los horarios. Es la médula ósea el órgano en el que hubo menor daño y que es equivalente a los daños más bajos observados en hígado y riñón de los ratones administrados con las decocciones. Es posible que este efecto esté altamente relacionado a la función característica de cada órgano, es por ello que se observan estas variaciones.

Las diferencias de daño que se observan en las gráficas de momento y longitud de la cola con las tablas de índice de daño se deben en primer lugar a que metodológicamente no son evaluadas las mismas células que son medidas por el programa COMET y las que son contabilizadas para clasificarse con el grado de daño. Además ésta clasificación es una medición subjetiva ya que la escala es visual es a criterio del observador y se pueden tomar en cuenta células que el programa no es capaz de identificar y por lo tanto de contabilizar.

Es necesario realizar más estudios para sugerir dosis adecuadas que causen mayor actividad citotóxica dependiendo de la cantidad de los componentes encontrados en la *J. dioica*, que puedan presentar actividad antitumoral, como taninos, terpenos, cumarinas, alcaloides, quinonas, etc. y así poder sopesar el riesgo-beneficio (Aguilar, 2009).

## XI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se obtuvo no solamente el extracto acuoso de la raíz de *J. dioica* para su análisis fitoquímico sino que además se obtuvieron los extractos metanólico y hexánico, logrando un mejor rendimiento con éste último. Se determinó que existe presencia de alcaloides en todos ellos.

Los componentes en dichos extractos se separaron por cromatografía, de los cuales a las fracciones más puras se les determinó su estructura química por RMN, encontrando que en el extracto acuoso se obtuvo un compuesto cuyas señales coinciden a la citlalitrona, ya reportada en la literatura y que ha sido extraída de otras variedades de *Jatropha*.

Del extracto metanólico se obtuvo un disacárido desconocido, similar a celobiosa y sucrosa. También se cree que en el extracto hexánico se determinó un sesquiterpeno, pero se necesitaran más estudios para determinar las estructuras de estos compuestos.

Se determinó por medio de ensayo cometa que la administración aguda de la decocción de la raíz de la planta *J. dioica* preparada y usada de manera tradicional, muestra genotoxicidad moderada, dependiente del órgano analizado.

El riñón es el órgano que mostró haber tenido el mayor daño genotóxico con las dosis baja y media, seguido por el hígado y finalmente la médula ósea.

## XII. RECOMENDACIONES

Sería interesante seguir realizando las separaciones químicas de la planta *J. dioica* para aislar y elucidar componentes no reportados en este trabajo y para hacer ensayos de actividad biológica.

La actividad biológica analizada por ensayo cometa en este estudio, fue por administración aguda. Se podrían complementar los resultados obtenidos con un estudio crónico para saber si de ese modo pudiera causar mayor o menor genotoxicidad.

En este estudio se administró a los ratones la decocción de la planta *J. dioica*, por lo que sería recomendable aislar y observar el efecto de distintos compuestos, los cuales podrían mostrar diferentes efectos biológicos, ya que las sustancias químicas se podrían encontrar en mayor concentración, lo que ayudaría a determinar incluso las dosis activas específicas para establecer los tratamientos potenciales.

Si bien es cierto que la raíz puede contener mayor concentración de sustancias químicas, sería interesante realizar los estudios en las partes aéreas de la planta y conocer si se alcanza un mejor rendimiento de los compuestos con posible actividad biológica.

Es necesario realizar más estudios para sugerir las dosis adecuadas que causen una mayor actividad citotóxica, dependiendo de la cantidad de los componentes encontrados en *J. dioica*, y que puedan presentar actividad antitumoral como taninos, terpenos cumarinas, alcaloides, quinonas, etc. y así poder sopesar el riesgo-beneficio (Aguilar, 2009).

Para posteriores estudios biológicos con esta planta u otro protocolo similar, se recomienda probar otro fármaco que sirva como testigo positivo, con una vida media mayor a la CF y que permita observar mejor el efecto de daño en todas las fases horarias a analizar, además de que tenga efecto evidente en médula ósea.

Para complementar los resultados de este estudio se recomienda realizar en futuros experimentos pruebas conjuntas que determinen la viabilidad celular, para identificar si las células analizadas en el estudio se encuentran en proceso de reparación, presentan aberraciones cromosómicas o en su defecto proceso apoptótico y así tener una mejor referencia del daño genotóxico.

Se sugiere realizar análisis de los TM y TL con la clasificación simultánea de índice de daño de la célula medida con el fin de homologar los parámetros de medición sin exclusión. Para obtener mejores resultados se podría emplear otro procedimiento de análisis que no excluya ningún grado de daño de células, para disminuir sesgos.

### XIII. BILIOGRAFIA

Aguilar, C.N. 2009. Técnicas y Tecnologías para aprovechamiento y Transformación de sangre de drago. DIA. Universidad Autónoma de Coahuila. Ponencia del Foro Temático de No Maderables: Situación actual y perspectivas de la fibra de lechuguilla, orégano y sangre de drago. Comisión Nacional Forestal. pp.1-25.

Aguilera, A. F., Augur, C., Prado, L. A., Aguilar, C. N. y Favela, E. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chemical Papers*. 2008; 62: 4, 440-444.

Arango A.G.J. Introducción al Metabolismo Secundario Compuestos derivados de ácido shikimico. Fac Quim Far, Univ de Antioquia. Medellin 2010. 1-43.

Arango A.G.J. Alcaloides y compuestos nitrogenados. *Med*. 2008: 1(1):83.

Arencibia A.F. y Rosario F.A. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa in vivo en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *Rev Toxic*. La Habana, Cuba. 2010: 1-12.

Arencibia A.F. y Rosario F.A. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Rev Tox en línea*. 2009; 24-41.

Arencibia A.F y Rosario F.A. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias. *Rev Toxic*. 2010;(27): 1-8.

Arencibia F.D., Vidal A., Rosario L.A, Suárez Y.E. y Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Vacci Monitor*. La Habana, Cuba. 2011; 20(1):28-33.

Arencibia F.D., Vidal N.A., Rosario L.A. y Suárez Y.E. Respuesta de ratas sprague dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica *Rev. Tox.* La Habana, Cuba. 2003; 21-35.

Arencibia F.D., Vidal N.A., Rosario L.A, Suárez Y.E. y Roche D.L. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de linfocitos de sangre periférica. *Rev. Tox.* Pamplona, España. 2011; 28(2) 152-157.

Ayambo S.L. Optimización del proceso de extracción etanólica de *Lepidium Peruvianum* Chacón, “maca”, Lima Perú. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.

Baltar J.M, Marin R. y Ortega F. Ciclofosfamida en glomerulonefritis primarias y secundarias. *NefroPlus* 2010; 3(1):9-15.

Barba Avila de los Dolores , M., M.C.H. Duque, and M. de la Cerda Lemus, Plantas útiles de la Región Semiárida de Aguascalientes.: Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2003

Barrón G.M.P., Corrujedo M.N., Garza P.R., Morales R.M., Neavéz T.F., Morales V.M. y Rodríguez G.R. Tamizaje fitoquímico y determinar la actividad amebicida, antioxidante y tóxica de los extractos metanólicos de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus calmadulensis*. III Congreso Internacional de Cambio Climático y Desarrollo Sustentable: Economía, Producción y Tecnología. Depto de Biología y genética de la UANL. 2011.

Barroso A.M. Navelvina: un nuevo alcaloide de la vinca. *Rev cubana oncol.* 1999; 15(2):141-2.

Bello G.J. y López C.S.A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ed Díaz de Santos. España, 2001;3-141.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Obtenido de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483>

Bermúdez T.D., Monteagudo J.E., Boffill M., Díaz C.L.E., Roca S.A., Betancourt M.E. y Silveira P.E.A. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 2007; 8(3): 1-7.

Bruice Y. P, Fundamentos de Química Orgánica. *Pearson Educación*. México. 1ª Ed;2007: 192-208.

Callejas C.M., Flora medicinal de San Bartolo Tutotepec. Tesis de Licenciatura. Pachuca de Soto Hidalgo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.

Can-A R, Erosa R.G., May P.F., Peña R.L.M. and Peraza S.S. Bioactive terpenoids from roots and leaves of *J. gaumeri*. *Rev. Soc. Quim*. 2004; 48:11-14.

Carmona, M.L, et al. Flora cactológica y especies asociadas en el área natural protegida Sierra Corral de los Bandidos, Nuevo León, México. *Rev Mex Biodiv*. 2008; 79:307-323.

Castillo P.M. Modelos de envejecimiento *in vitro* e *in vivo*, estrés oxidativo y protección antioxidante. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante. 2002; 19-30.

Centro Regional de Educación Fundamental para la América Latina. Manual de Homeopatía. Proyecto Especial, Meseta purépecha, coedición Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos SARH - OEA – CREFAL. 1988; OEA-92 (9):39-44.

Chakraborty P., Hossain S.U., Murmu N., Kumar D.J., Smarajit P. and Bhattacharya. Modulation of Cyclophosphamide-Induced Cellular Toxicity by diphenylmethyl selenocyanate in vivo, an enzymatic study. *J. Cancer Mol.* 2009. 4(6): 183-189.

Cortes C.J., Actividad biológica de extractos de plantas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo. Tesis Licenciatura. Pachuca de Soto Hidalgo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2005.

De la Garza-Sanmiguel, A.E. El uso de plantas medicinales en Matamoros, Tamaulipas y sus alrededores (Tesina). Diplomado Medicina Tradicional de México y sus Plantas Medicinales. México, Tlahui Edu A. C. 2009. p. 3-4.

Devappa, R.K., Makkar, H.P. y Becker, K. *Jatropha* diterpenes: a Review. *J Am Oil Chem Soc.* 2011. 88: 301-322.

Domínguez O.I., Estudio etnobotánico de plantas medicinales de Tunititlan, Hgo. y evaluación antibacteriana de la especie vegetal más empleada en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa. Tesis de Licenciatura. México, DF. Universidad Autónoma Metropolitana. 2006; 46-47.

González-Elizondo, M., López-Enriquez, I.L., González-Elizondo, M.S. y Tena-Flores, J.A. Plantas Medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas. CIIDIR Durango. México. Instituto Politécnico Nacional. 2004; 25-31, 127.

Gómez H.B., Extracción y acetilación de los componentes de la grana Cochinilla (*Dactylopius coccus* COSTA), Tesis de licenciatura. Pachuca de Soto Hidalgo. México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006.

Gorriti G.A., Zarate O.R. y Jurado T.B. Bioensayos en especies de bodens con actividad terapéutica. *Ciencia e Investigación.* 1998; 1(2).

Gutiérrez M.C. La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Boletín INTEPPER* (U.C.P.). 2002;129: 29-34.

Jha N.A. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutage*. 2008; 23(3): 207-221.

Liberman A.C., Drunker A.J., efojo D. y Azt E. Mecanismos moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras. *MEDICINA*. Argentina 2008; 68(6): 455-464.

Lock U.O., Villar L.M. y Villavicencio V.O. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Manual de Fitoterapia ESSALUD y OPS/OMS. Ed ISALUD.2000; 41-64.

Martínez F.S., González G.J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 2002; 17 (6): 271-278.

Martinez, M., Las plantas medicinales de México. 2004: Librería y Ediciones Botas.

Martínez G.M., Jiménez R.J., Cruz D.R., Juárez A.E., García R., Cervantes A. y Mejía H.R. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Botánica. 2002;73(2): 155-281.

Manzanero M.G., Flores M.A., Sandoval Z.V., Bye-Boettler R. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de sonora de la ciudad de México. *Polibotánica*. 2009; 27: 191-228.

Molina G.R., Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *cornutia pyramidata* l. (jorobté). Tesis de Licenciatura. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Montiel S & Montaña C. Vertebrate frugivory and seed dispersal of a Chihuahuan Desert cactus. *Plant Ecology*. 2000;146: 221–229.

Net A. y Roglan A. Fracaso renal agudo. Barcelona: *Springer-Verlag Ibérica*, 1999; 23: 140-52.

Olive, P.L., Banath J.P., and Durand R.E., Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “Comet” assay. *Radiat. Res.* 122, 86-94.

Olive L.P. and Durand E.R. Heterogeneity min DNA damage using the comet assay. *Cytometry*.2005; Part A 66A.:1–8.

Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. *OMS Ginebra*, 2002. Documento de referencia WHO/EDM/TRM/2002.1.

Osorio D.E.J. Aspectos básicos de farmacognosia. *Fac Quim Far*, Univ de Antioquia. Medellin 2009. 1-43.

Osti C.R. Estudio químico de *Mimosa xanti* A. Gray, *Mimosa albida* HBK, *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don., *Sedum moranense* HBK y *Gnaphalium purpurascens* DC. Tesis de Maestría. Pachuca de Soto Hidalgo, México. UAEH. 2008.

Pérez T.G. Los flavonoides: antioxidantes y prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2003; 22(1):48-57.

Repetto J.M. y Repetto-Khun G. Toxicología fundamental. 4º Ed. Ediciones Díaz de Santos. 2009.; 22-38.

Rodríguez M.J y Altamirano L.A. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev Int Cintam Ambient*. 2006; 22 (4)173-189.

Rosales C.M, González L.R.F y Rico M.R. Estudio polifenolico en sangregado (*Jatropha dioica*). *Ubamari*, 2001; 51: 13-20.

Sánchez G.A., Granados S.D. y Simón N.R. Uso Medicinal de las Plantas por los Otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 2008; 14 (3): 271-279.

Sosa M., Galarza J.L., Lebgue T., Soto R. y Puga S. Clasificación de las comunidades vegetales en la región árida del estado de Chihuahua, México. *Ecol. Apl.* 2006; 5 (1): 53-59.

Steinmann W.V., Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*. 2002; 61: 61-93.

Tenorio M.P.L., Contribución al conocimiento toxicológico de la decocción elaborada con la raíz de *Jatropha dioica* sessé ex cerv. Mediante la prueba de micronúcleos y un tamizaje fitoquímico in Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Licenciatura en Biología. 2012, UAEH: Pachuca de Soto, Hgo.

Tice R, Vasquez M. Protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. 1998. *Research Triangle Park*: 1-8.

Torres L.B., Plantas, curanderos y prospección biológica. *Ciencias*. 1999; 55-56.

Vandghanooni S. and Eskandani M. Comet Assay: a Method to evaluated geotoxicity of nano-drug delivery system. *BioImpacts*. 2011;1(2):87-97.

Villareal A.M and Dominguez X.A. Citlalitrione a new diterpene from *Jatropha dioica* var. *J Nat Prod*. 1988; 51(4): 49-153.

Yang M.S. The total syntheses of jatrophatrione, citlalitrione, and sclerophytin a studies toward the enantioselective synthesis of fomannosin photochemical rearrangement of 4-methoxy-4-vinyl-2-cyclopentenones. Doctoral Thesis. 2003. Ohio State University. [https://etd.ohiolink.edu/rws\\_etd/document/get/osu1062130125/inline](https://etd.ohiolink.edu/rws_etd/document/get/osu1062130125/inline)

Yang, J., Y.O. Long, and L.A. Paquette, Concise Total Syntheses of the Bioactive Mesotricyclic Diterpenoids Jatrophatrione and Citlalitrione. *J. Am. Chem Soc*, 2003. 125(6):1567-1574.

Wong-Paz E.J, Castillo-Inungaray L.M, López-López L.L, Contreras-Esquivel C.J, Nevárez-Moorillon V y Aguilar N.C. *Jatropha dioica*: Fuente Potencial de Agentes Antimicrobianos. *Rev Cient de UA de C*. 2010; 2 (4): 1-5.

Zuñiga V.L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomotorización humana. Tesis doctoral. Univ Barcelona. 2009. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3930/lazv1de1.pdf?sequence=1>

Chile,2003[http://www.printo.it/pediatricrheumatology/information/Chile/PDF/15\\_DRUG\\_Chile.pdf](http://www.printo.it/pediatricrheumatology/information/Chile/PDF/15_DRUG_Chile.pdf)