

FITOFÁRMACOS NANOTRANSPORTADOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

Rocio Guadalupe Casañas Pimentel¹, Juan Maldonado Cubas², Exsal Manuel Albores Méndez³, Laura Esther López Ruíz³, Rocio Alejandra Mata Villanueva³, Eduardo San Martín Martínez^{3*}

¹CONACYT-Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, Legaria 694, Irrigación, Miguel Hidalgo, 11500, Ciudad de México.

²Universidad La Salle, Grupo de Investigación en Procesamiento Digital de Señales Biomédicas, Facultad de Ingeniería, Benjamín Franklin 47, Condesa, Cuauhtémoc, 06140, Ciudad de México.

³Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, Legaria 694, Irrigación, Miguel Hidalgo, 11500, Ciudad de México.

*esanmartin@ipn.mx

<https://doi.org/10.3926/oms.404.7>

Casañas-Pimentel, R.G., Maldonado Cubas, J., Albores Méndez, E.M., López Ruíz, E., Mata Villanueva, R.A., & San Martín-Martínez, E. (2020). Fitofármacos nanotransportados en el tratamiento de cáncer de mama. En E. San Martín-Martínez (Ed.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen II*. Barcelona, España: OmniaScience. 125-150.

Resumen

El cáncer de mama es un problema de salud pública en el mundo, esta enfermedad es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres; por ello, es fundamental sumar esfuerzos para el desarrollo de estrategias que permitan mitigar su impacto social, económico y a la salud. Las moléculas activas derivadas de las plantas (fitofármacos) son una fuente prometedora de soluciones para esta problemática y su mejoramiento con la aplicación de sistemas de liberación de fármacos de base nanotecnológica es sin duda, una estrategia que debe ser evaluada para ofrecer alternativas para el tratamiento de los pacientes oncológicos. La consideración correcta de los factores que impactan en el éxito de estas estrategias es primordial, por ello, en este capítulo se exponen los fundamentos teóricos para la obtención de fitofármacos nanotransportados para el tratamiento del cáncer de mama, así como una breve introducción a esta neoplasia; el concepto de fitofármacos, sus métodos de obtención y las características de calidad que deben cumplir; así mismo, se describen los sistemas nanométricos para el transporte de fármacos contra el cáncer y las características fisicoquímicas y de calidad que estos deben cumplir para su éxito. Finalmente, se exponen algunos avances que este grupo de investigación ha logrado en el desarrollo de fitofármacos nanotransportados para el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: Fitofármacos; Nanotransportadores; Cáncer de mama; Sistemas de liberación.

1. Introducción

1.1. El cáncer tiene alta incidencia y mortalidad

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, con una incidencia y mortalidad que van en aumento. Se estima que en 2018 se produjeron 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer en el mundo [1].

Los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial son el cáncer de pulmón y el cáncer de mama (Figura 1), cada uno representó en 2018 el 11.6 % del total de nuevos casos de cáncer diagnosticados [1].

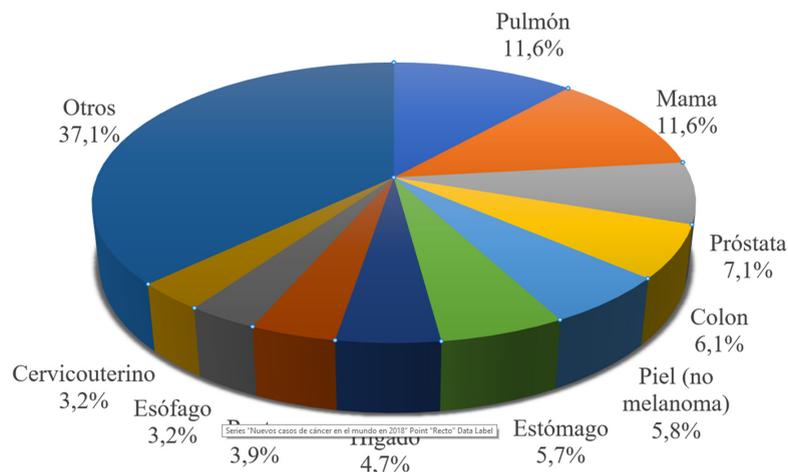


Figura 1. Distribución por tipo para los nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2018.

Dentro de estos, el cáncer de pulmón es el que causa un mayor número de muertes, seguido del cáncer de mama y del cáncer de próstata [1]

La mayoría de las muertes por cáncer ocurren en países con ingresos medios y bajos [1] y esto es en gran parte debido a que estos países no cuentan con un adecuado sistema de salud para una detección temprana.

1.2. El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres

En las mujeres, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado y es la principal causa de muerte por cáncer, seguida del cáncer

colorrectal y del cáncer de pulmón, en incidencia, y del cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal, en mortalidad [1].

El cáncer de mama se clasifica en diversos subtipos (Tabla 1) en función de la expresión de diversos biomarcadores: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), el factor de proliferación celular Ki-67, y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [2].

Tabla 1. Clasificación de los subtipos de cáncer de mama en función de la expresión de biomarcadores específicos.

Subtipo de cáncer de mama	ER	HER2	Ki-67	PR
<i>Luminal A</i>	Positivo	Negativo	Bajo	Alto
<i>Luminal B</i>	Positivo	Negativo	Alto	Bajo
<i>HER2-positivo</i>	Negativo	Sobreexpresado	Incierto	Negativo
<i>Triple negativo</i>	Negativo	Negativo	Incierto	Negativo

Actualmente, el cáncer de mama es tratado empleando quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía e inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, debido a la alta incidencia y mortalidad relacionadas con el cáncer de mama, y a la falta de efectividad, elevados costos y severos efectos secundarios derivados de la terapia actual para tratar este cáncer, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias preventivas, de diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Las nuevas terapias para el tratamiento del cáncer de mama buscan tener un enfoque dirigido, que reduzca los efectos secundarios y potencialice la efectividad terapéutica [2].

1.3. Los fitofármacos son alternativas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer

Los fármacos desarrollados a partir de especies vegetales, o fitofármacos, son una fuente potencial para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. En diversos estudios se ha evaluado la eficacia y seguridad de los fitofármacos en la quimioterapia contra el cáncer, al administrarse como terapia única o de forma combinada con los quimioterapéuticos convencionales. La curcumina, el resveratrol, la artemisinina, el paclitaxel, la berberina, la piperina, la noscapina, el extracto de muérdago, el extracto de té verde y otras especies vegetales o metabolitos

secundarios derivados de plantas han sido evaluados por diversos autores; estos fitofármacos se han combinado con quimioterapéuticos como el tamoxifeno, el celecoxib, el 5-fluorouracilo, el cisplatino, la vinorelbina, la doxorubicina y el bavituximab, entre otros quimioterapéuticos, para tratar diversos tipos de cáncer, incluyendo los cánceres de: mama, colon, cabeza y cuello, próstata, páncreas, hígado, ovario, pulmones, esófago, estómago, leucemia y mieloma, entre otros [3,4]. Se ha sugerido que la inclusión de los fitofármacos en la quimioterapia contra el cáncer es rentable y podría ayudar a reducir la mortalidad del cáncer y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Más aún, la polifarmacología derivada del uso de fitofármacos ofrece la oportunidad de desarrollar fármacos con múltiples blancos moleculares que pueden mejorar el tratamiento del cáncer [3].

El potencial de los fitofármacos ya ha sido ampliamente demostrado en la clínica. Las plantas medicinales, o los productos derivados de plantas medicinales, incluyendo moléculas puras, extractos o fracciones de extractos, han sido históricamente la mayor fuente de los fármacos anticáncer que hoy en día están aprobados para su uso en humanos; la fitofarmacología ha dado lugar a fármacos altamente exitosos en la clínica, incluyendo a los taxanos, los alcaloides derivados de la vinca [4], las epipodofilotoxinas y los derivados de camptotecina [5].

La mayoría de los principios activos de los fitofármacos presentan una pobre solubilidad en agua, lo que limita su biodisponibilidad, su capacidad para atravesar las membranas biológicas y, por lo tanto, su aplicación efectiva en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. La estabilidad de los fitofármacos y su baja especificidad, también son aspectos relevantes en su aplicación clínica [6]. La administración de los fitofármacos puede hacerse de una manera más eficiente al utilizar la nanotecnología, combinando ambos aspectos en un concepto denominado fitonanotecnología [7].

1.4. La nanotecnología ofrece ventajas para el tratamiento del cáncer

En el tratamiento del cáncer, el uso de la nanotecnología para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos ha demostrado ventajas sobre la administración convencional de fármacos. Esto se debe a que las nanopartículas permiten transportar a los fármacos al sitio de acción deseado (Figura 2), minimizando los efectos secundarios en el tejido sano y disminuyendo la dosis requerida para la acción del fármaco. Estos sistemas protegen al fármaco de una rápida degradación y eliminación, mejorando la eficacia y la biodistribución. Entre los sistemas de

administración de fármacos nanoparticulados, los preparados a partir de polímeros poseen una estabilidad mejorada en soluciones de electrolitos y fluidos biológicos, además de una buena capacidad de almacenamiento y biodisponibilidad. Los sistemas de administración de fármacos poliméricos nanoparticulados pueden ser diseñados para cargar uno o más fármacos de diversa naturaleza química y permiten, además, el desarrollo de terapias personalizadas mediante cambios en la química de la superficie o por la conjugación de moléculas biológicas, lo que promueve una administración eficiente de agentes terapéuticos de manera controlada, específica y con capacidad de reingeniería [8].

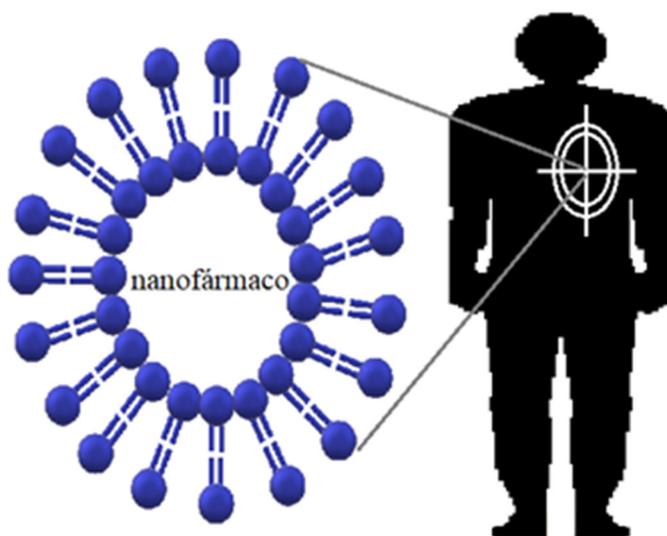


Figura 2. El uso de la nanotecnología para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos permite llevar a los fármacos hasta el sitio de acción deseado, generando múltiples ventajas para la terapia del cáncer.

Los sistemas de administración de fármacos poliméricos incluyen nanopartículas presentadas como nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas consisten en un sistema de tipo matriz compuesto por una red polimérica en la que se dispersa el fármaco; mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares donde el fármaco está confinado en una cavidad rodeada por una red polimérica [8] (Figura 3).

Otros sistemas nanométricos que han sido empleados para la liberación de fármacos (Figura 3) son:

- ◆ **Nanopartículas de base lipídica:** incluye a las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y a los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). Las primeras son partículas coloidales formadas con lípidos, estas son capaces de permanecer en estado sólido a temperatura corporal, presentan un tamaño promedio de 50 a 1000 nm, el cual depende de la técnica de fabricación y de la proporción y tipo de materiales utilizados, las SLN pueden presentar problemas con la capacidad para liberar el fármaco encapsulado y su capacidad de carga es relativamente baja. Por su parte, los NLC son fabricados con una mezcla de lípidos sólidos y líquidos a temperatura ambiente, los NLC permanecen en estado sólido una vez construidos, tienen un tamaño promedio de 50 a 1000 nm y son capaces de almacenar una mayor cantidad de fármaco. Ambos, los SLN y los NLC, tienen la ventaja de ser biocompatibles por estar construidos con lípidos [9].
- ◆ **Liposomas:** son vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos y esteroides y se pueden clasificar dependiendo del número de capas que los constituyen, pudiendo ser liposomas unilamelares, constituidos por una sola bicapa fosfolipídica con tamaños que oscilan de los 20 a más de 100 nm, o multilamelares, constituidos por varias capas separadas por una delgada película de agua y con tamaños superiores a los 500 nm. Tanto el tamaño como el número de capas son los dos factores principales que determinan el tiempo de vida medio de estas nanoestructuras [10].
- ◆ **Fitosomas:** son complejos formados por fosfolípidos y compuestos activos de plantas, su unión se da por la formación de puentes de hidrógeno. Los fitosomas se construyen incorporando el principio activo de origen natural a los fosfolípidos, su arreglo en estas nanoestructuras mejora la biodisponibilidad de las moléculas activas por su similitud con las membranas biológicas. Los fitosomas tienen tamaños similares a los liposomas y difieren de estos en que los liposomas tienen contenido en su interior al principio activo en comparación con los fitosomas, en los cuales, el principio activo es un constituyente de la membrana de la vesícula [11].
- ◆ **Dendrimeros:** son macromoléculas ramificadas construidas a base de monómeros, capaces de acarrear fármacos. En su estructura se identifican tres componentes: un núcleo, ramificaciones llamadas dendrones y grupos funcionales. El fármaco puede encontrarse unido a los grupos funcionales o quedar atrapado en las cavidades que se forman entre los dendrones: la capacidad de utilizar diversos tipos de grupos funcionales los convierte en una

opción viable para incorporar principios activos de distinta naturaleza, los cuales pueden estar unidos por interacciones débiles para facilitar la liberación del fármaco en el sitio indicado [12].

- ◆ **Xerogeles de sílice:** son materiales obtenidos por la vía del sol-gel, biocompatibles y no tóxicos, que se degradan sin dificultad y que durante su síntesis permiten la incorporación de distintas sustancias, tanto hidrofílicas como lipofílicas, de una manera muy homogénea, formando una estructura microporosa. Estos son candidatos para la incorporación de fármacos para un direccionamiento y liberación específicos [13].
- ◆ **Nanotubos de carbono:** son moléculas construidas con una o varias láminas de grafeno enrolladas en forma de cilindro, con diámetros tan pequeños como 1 nm y de longitud variable. Los nanotubos de carbono tienen la capacidad de ser funcionalizados para que se puedan incorporar distintos tipos de fármacos y para que sean direccionados a las células de interés, además de que por su forma cilíndrica pueden ser retenidos por más tiempo en los ganglios linfáticos, convirtiéndolos en buenos candidatos para dirigir la acción terapéutica a esta parte del cuerpo [14].
- ◆ **Nanopartículas magnéticas:** cuentan con un núcleo ferromagnético fabricado normalmente con hierro, cobalto, níquel o tierras raras, tienen la ventaja de que se facilita su direccionamiento por la exposición a un campo magnético externo. Además de ser utilizadas para la liberación de fármacos, también pueden ser utilizadas para termoablación

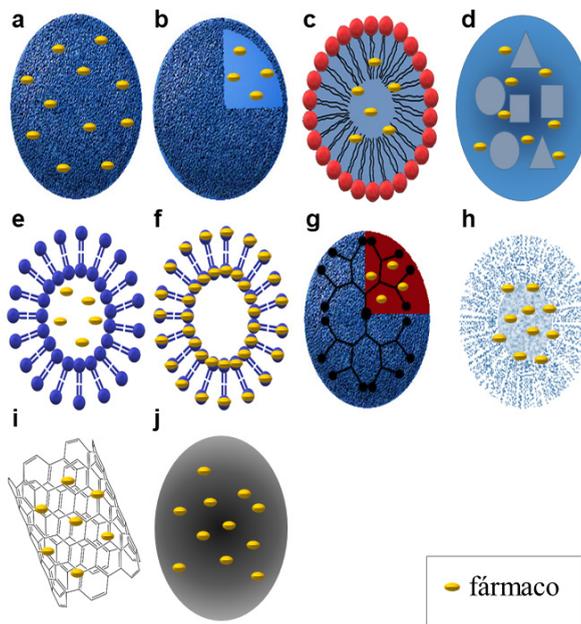


Figura 3. Sistemas nanoparticulados empleados en la liberación de fármacos a) nanoesferas, b) nanocápsulas, c) nanopartículas sólidas lipídicas, d) acarreadores lipídicos nanoestructurados, e) liposomas, f) Fitosomas, g) dendrímeros, h) xerogeles, i) nanotubos de carbono, j) nanopartículas magnéticas.

por radiofrecuencia y para ubicar las zonas tumorales, ya que pueden ser vistas con técnicas como la imagenología por resonancia magnética [15].

1.5. Retos para el desarrollo de nanofitofármacos para el tratamiento de cáncer

Son múltiples los desafíos a vencer para el desarrollo de los nanofitofármacos, en primera instancia, es necesario identificar a las especies vegetales, sus extractos o sus moléculas, que tengan potencial para el tratamiento del cáncer. Esto se determina generalmente en estudios *in vitro* que evalúan el efecto de estos compuestos en la viabilidad celular, la morfología y en las vías de señalización celular.

La técnica que se elegirá para obtener a los compuestos activos a partir de especies vegetales (fitofármacos) dependerá de la naturaleza química y de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, además de las características del material vegetal con el que se va a trabajar. Es importante considerar que dichos compuestos se encuentran inmersos en una matriz compleja que incluye estructuras vegetales que dificultan su obtención, además de biomoléculas con diferentes grupos funcionales y polaridades [16].

El objetivo fundamental es lograr que el compuesto de interés sea arrancado de la matriz vegetal y se transfiera al disolvente, del que posteriormente será recuperado. Este proceso obedece a fenómenos de difusión a diferentes niveles, primero es necesario que el disolvente penetre en la matriz vegetal, una vez en el interior, éste tiene que disolver al compuesto de interés, éste compuesto disuelto, difunde hasta las paredes del material vegetal y posteriormente, hacia el exterior, para distribuirse de manera homogénea en el líquido. El intercambio de materia va a continuar con la entrada de disolvente fresco al material vegetal y la extracción de un mayor número de moléculas del compuesto de interés, hasta que se alcance el equilibrio [17].

Para facilitar el proceso de extracción es conveniente realizar un pretratamiento al material vegetal, reduciendo su tamaño, para incrementar el área superficial que entrará en contacto con el disolvente y disminuir así la distancia que tienen que recorrer el disolvente y el compuesto de interés durante la extracción [17].

El proceso de transferencia puede ser acelerado utilizando técnicas como la extracción asistida por ultrasonido; en ella, la mezcla del material vegetal y el disolvente es colocada en un baño ultrasónico que induce una tensión mecánica

sobre las partículas de material vegetal mediante la producción de burbujas de cavitación, lo que genera la ruptura de la pared celular, facilitando la liberación del compuesto de interés [18]. Otras técnicas de extracción como la maceración, Soxhlet y tecnologías de fluidos supercríticos e irradiación asistida por microondas, también son empleadas con regularidad [19].

La polaridad del disolvente que se mezcla con el material vegetal debe ser la adecuada, dependiendo de las características fisicoquímicas del compuesto que se pretende recuperar; además, el disolvente debe tener un punto de ebullición bajo, para que pueda eliminarse del compuesto de interés con facilidad y no debe reaccionar con el compuesto de interés [20]. Si es difícil elegir el disolvente ideal, se puede realizar una extracción secuencial utilizando inicialmente un disolvente de polaridad baja, posteriormente uno de polaridad intermedia y, finalmente, uno de polaridad alta, ya que con cada tipo de disolvente se obtendrán extractos con diferente composición [21], para posteriormente identificar con cuál de ellos se extrajo el compuesto de interés.

Una vez terminado el proceso de extracción, lo más probable es que el compuesto de interés se encuentre formando parte de una mezcla de diferentes compuestos que también fueron extraídos con éste. Es posible realizar un fraccionamiento del extracto guiado por bioensayo, para ello, se realiza una separación del extracto y las fracciones obtenidas son evaluadas mediante ensayos biológicos para identificar aquellas que desencadenan la actividad deseada; este proceso de fraccionamiento-bioensayo se repite hasta obtener un compuesto lo más puro posible o hasta obtener una actividad biológica adecuada con concentraciones bajas de la fracción evaluada [20].

La obtención del fitofármaco también impone algunos retos para el investigador al requerir que la técnica para su obtención sea accesible para asegurar una cantidad adecuada del producto, por lo menos para realizar las pruebas *in vivo*, y dicho producto deberá ser obtenido con la suficiente pureza para permitir su caracterización con fines de elucidar su estructura para su posible síntesis [22].

Los fitofármacos deben ser caracterizados fisicoquímica y biológicamente, de acuerdo a la normatividad, sustentando con ello su calidad y su actividad biológica. Para tal efecto es importante determinar características como su estado físico, espectros UV e IR, composición química, peso molecular y estabilidad, además es necesario estandarizar su obtención, establecer controles de calidad, identificar mecanismos de acción, órganos diana, toxicidad y cumplir con los

requerimientos de buenas prácticas, documentación y evaluación preclínica y clínica que permitan garantizar su trazabilidad, eficacia y su seguridad. El desarrollo de fitofármacos, aunque puede derivarse de la medicina tradicional, se caracteriza porque se apega a un control farmacológico. El desarrollo adecuado de los fitofármacos ha dado lugar a la inclusión de diversos compuestos naturales o extractos herbolarios en las farmacopeas china, europea, alemana, inglesa, francesa, suiza y americana, entre otras [23].

La aplicación de la nanomedicina en el tratamiento del cáncer de mama ha permitido mejorar la estabilidad de los medicamentos, reducir los efectos secundarios, aumentar el índice terapéutico y los parámetros farmacocinéticos [24]. Estas ventajas son un ejemplo de la importancia del uso de la nanomedicina para el desarrollo de nuevas terapias para tratar al cáncer de mama, que también son aplicables para el desarrollo de fitofármacos, con mejoras en la especificidad, la bioseguridad y la efectividad.

Los nanofármacos protegen al compuesto activo de su interacción inespecífica con el organismo y lo llevan hasta el tumor, donde el compuesto activo es liberado y actúa causando la muerte de las células tumorales, esto reduce las dosis del fármaco necesarias para alcanzar el efecto terapéutico, al controlar la distribución del fármaco en el organismo [8]. Para que los nanofármacos actúen de manera efectiva se debe prolongar su tiempo de circulación en el organismo, para ello se sugiere que estos tengan una superficie hidrofílica para evitar que los macrófagos los eliminen y para evitar la adsorción de proteínas plasmáticas en su superficie. Los nanofármacos preferentemente deben poseer un diámetro menor a 100-50 nm y carga superficial neutra [24].

Los nanofármacos usados en el tratamiento del cáncer pueden ser sencillos o complejos, y emplearse únicamente como acarreadores farmacológicos o ser incluso acoplados a moléculas que modifican en microambiente tumoral, moléculas sensibles al ambiente, moléculas reporteras que se visualizan por imagenología, partículas que responden a señales físicas o químicas, etc. [8].

Para el desarrollo de nanofármacos es fundamental tomar en cuenta la factibilidad técnica y económica de las metodologías propuestas, emplear reactivos de bajo costo, evaluar la escalabilidad de las metodologías empleadas. Apegarse a la normatividad empleando reactivos aceptados para su uso en humanos y siguiendo protocolos de buenas prácticas en cada etapa de evaluación. Demostrar la reproducibilidad de las características físicoquímicas y del efecto biológico de

los nanofármacos desarrollados, más aún cuando estos nanofármacos contienen a un fitofármaco.

Las entidades reguladoras como la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), la *International Conference on Harmonization* (ICH), la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, la *European Medicines Agency* (EMA), la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), el Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar (MHLW) Japonés y la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitario (COFEPRIS) en México, entre otras, han publicado pautas para pruebas de toxicidad preclínicas para sustancias químicas y farmacéuticas, así como guías de calidad para la realización de estudios de seguridad en humanos. Es importante atender las normatividades aplicables durante el desarrollo de nanofitofármacos, para conocer los aspectos de seguridad y eficacia para su aplicación en el ser humano.

Fundamentado en estos antecedentes, el grupo de investigación de biomateriales del CICATA-IPN ha trabajado durante varios años en el desarrollo de estrategias farmacológicas para tratar al cáncer de mama, particularmente mediante el desarrollo de nanofármacos. Estos avances se exponen en este capítulo.

2. Metodología

2.1. Recolección y clasificación de material vegetal

Se realizó una investigación etnofarmacológica de especies vegetales que crecen en México, empleadas tradicionalmente para el tratamiento del cáncer. Así mismo, se investigaron los antecedentes científicos sobre la caracterización química y los efectos biológicos de dichas especies vegetales. Con esa información, se seleccionaron especies con potencial aplicación en el tratamiento del cáncer. Esas especies fueron recolectadas en el territorio Nacional y clasificadas por herbarios nacionales de la Universidad Nacional Autónoma de México y de la Universidad Autónoma de Chapingo, en donde se almacenaron ejemplares.

2.2. Acondicionamiento del material vegetal

Se realizó una limpieza del material vegetal para eliminar tierra y contaminantes macroscópicos, posteriormente, el material vegetal se lavó con agua corriente y se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio. Las muestras se secaron a

la sombra y posteriormente fueron trituradas en molino pulverizador y tamizadas hasta obtener polvos finos cercanos a los 180 μm . Las muestras se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente.

2.3. Obtención de los extractos

Se realizó una extracción asistida por baño ultrasónico utilizando disolventes en un gradiente de polaridad (éter de petróleo, etanol y agua), o etanol como único disolvente, por triplicado; los extractos obtenidos fueron concentrados en evaporador rotatorio y desecados hasta su totalidad en horno de vacío.

2.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos en cultivos celulares de cáncer de mama

La actividad citotóxica de los extractos en células de cáncer de mama se empleó para identificar aquellos extractos con potencial efecto anticáncer.

Se emplearon tres líneas celulares, dos de adenocarcinoma de glándula mamaria MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) y MCF7 (ATCC HTB-22) y una no tumorigénica de epitelio de glándula mamaria MCF 10A (ATCC CRL-10317), las cuales fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection*. El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 se cultivaron en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Caisson Labs*), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, ATCC), mientras que la línea celular MCF 10A fue cultivada en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12* (DMEM-F12, GIBCO) suplementado con 10 % de FBS, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Sigma), 0.25 U/mL de insulina (Pisa Biotec) y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de hidrocortisona (Sigma). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C, en cámara húmeda con 5 % de CO_2 hasta alcanzar confluencias cercanas al 80 %. Las células fueron tripsinizadas, contadas y sembradas en placas de 96 pozos, en donde se administraron diferentes concentraciones de los extractos con $n > 6$ para cada concentración y se incubaron las células con los tratamientos por periodos de 24, 48 y/o 72 h, estos experimentos se realizaron por triplicado. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se disolvió el reactivo MTT (Sigma-Aldrich) en buffer de fosfatos salino (PBS) a una concentración de 5 mg/mL, adicionando 20 mL de la solución a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 2 h a 37 °C en oscuridad. Una vez completado el tiempo de incubación se retiró

el medio de cultivo y se adicionaron 100 μL de DMSO para diluir los cristales de formazán que se formaron en el fondo de cada pozo. Las muestras fueron analizadas por espectroscopia en un lector de ELISA (*Labssystem Multiskan Ms*) a 570 nm y la absorbancia se comparó contra un control sin tratamiento para estimar el porcentaje de viabilidad alcanzado con los tratamientos. Se emplearon controles con DMSO al 0.2 % v/v para el vehículo y células tratadas con 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de paclitaxel como control positivo.

Se determinó el valor de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), concentración necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50 %, y con estos valores se determinó cuáles extractos presentaron mayor efecto citotóxico en los cultivos celulares de cáncer de mama, así mismo, se buscó una diferencia en la citotoxicidad inducida sobre las células no tumorales.

2.5. Fraccionamiento de los extractos activos

Los extractos con mayor actividad citotóxica fueron estudiados con el fin de mejorar su actividad citotóxica al obtener a los compuestos activos con mayor pureza. Se evaluaron distintas estrategias de fraccionamiento, que incluyen desde la separación de las estructuras de la planta (tallos, hojas, raíces, corteza) hasta la aplicación de estrategias como la crioprecipitación o el fraccionamiento por cromatografía en columna.

2.6. Caracterización de las fracciones activas

Las fracciones con actividad citotóxica fueron evaluadas mediante diversas técnicas, que incluyen espectroscopia FT-IR y UV-Vis, cromatografía en capa fina (TLC) acoplada a diversos sistemas de revelado, cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía líquida con detector de masas (HPLC-MS).

2.7. Desarrollo de sistemas de nanoencapsulación

Se generaron diferentes sistemas para la nanoencapsulación de fitofármacos, incluyendo liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas y acarreadores lipídicos nanoestructurados; para ello se estudiaron diferentes componentes y metodologías de síntesis.

La incorporación de los fitofármacos a los sistemas de nanoencapsulación fue similar en la mayoría de los procesos (Figura 4). De manera general, las metodologías consisten en la mezcla de 2 fases: una orgánica y otra acuosa, donde la fase orgánica contiene al polímero (o lípido), al fitofármaco y a un disolvente orgánico; mientras la fase acuosa contiene agua y uno o más surfactantes. Ambas fases se mezclan en agitación mecánica y posteriormente se elimina el disolvente a temperatura ambiente, en rotavapor o mediante el proceso de secado por aspersión. Finalmente, se llevan a cabo los procesos de purificación respectivos.

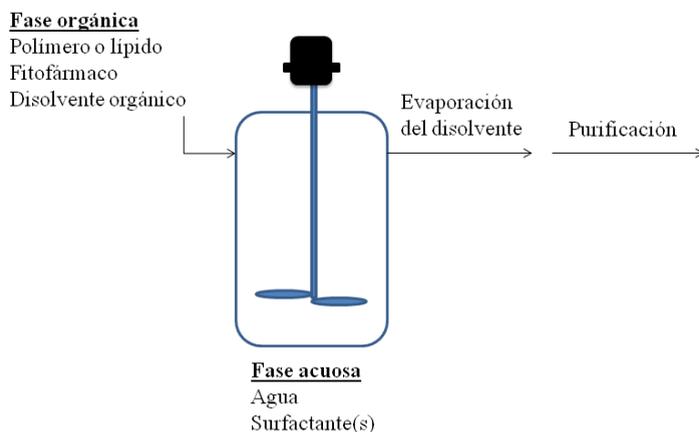


Figura 4. Metodología general empleada para la incorporación de los fitofármacos a los sistemas de nanoencapsulamiento.

La caracterización de las partículas obtenidas se llevó a cabo evaluando el tamaño de partícula mediante microscopía electrónica de barrido y dispersión de luz dinámica, la complejidad de la técnica de síntesis, la estabilidad de las partículas a través de la determinación del potencial zeta, la eficiencia de atrapamiento de los fitofármacos cuantificada por espectroscopia UV-Vis o HPLC-DAD, la tasa de liberación en PBS a 37 °C cuantificada por espectroscopia UV-Vis o HPLC-DAD, la reproducibilidad, el rendimiento y la factibilidad teórica y práctica del escalamiento del proceso.

3. Resultados y discusión

3.1. Selección de las especies vegetales a emplear

Se estudiaron las partes aéreas de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*), la hierba del sapo (*Eryngium comosum F. Delaroché*) y el muicle (*Justicia spicigera*

Schult.), la corteza de la raíz de cancerina (*Semialarium mexicanum* (Miers) Mennega), la corteza del tronco del cuachalalate (*Hypopterygium adstringens* Schldl.), la parte foliar del árbol de tejocote (*Crataegus gracilior* J.B. Phipps) y toda la estructura del aranto (*Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier).

Se obtuvieron extractos en disolventes de diferentes polaridades, obteniendo los mejores resultados de citotoxicidad con las especies presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de los extractos que presentaron mejor actividad citotóxica contra células de cáncer de mama

Nombre común	Nombre científico	Disolvente en el que se obtuvo el extracto	IC ₅₀ a 72 h		
			MDA-MB-231	MCF7	MCF 10A
Muicle	<i>Justicia spicigera</i> Schldl.	Éter de petróleo	26.3 µg/ml	64.7 µg/ml	52.0 µg/ml
Tejocote	<i>Crataegus gracilior</i> J.B.Phipps	Éter de petróleo	49.4 µg/ml	45.4 µg/ml	44.7 µg/ml
Cancerina	<i>Semialarium mexicanum</i> (Miers) Mennega	Éter de petróleo	56.6 µg/ml	75.8 µg/ml	66.8 µg/ml
Aranto	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier	Etanol	18.53 µg/ml		25.00 µg/ml

Dos de las especies vegetales estudiadas han sido evaluadas a mayor profundidad, realizando ensayos de fraccionamiento para mejorar la actividad biológica de sus extractos citotóxicos, estas son: la cancerina y el aranto. El tejocote y el muicle pudieran ser evaluados en el futuro, sin embargo, es importante señalar que el extracto de muicle indujo citotoxicidad en células del sistema inmunológico (PBMC, determinado por el ensayo WST-1), lo que sugiere que probablemente no sea adecuado para su uso en humanos.

3.2. Fraccionamiento y caracterización de los extractos citotóxicos con potencial uso en el tratamiento de cáncer de mama

3.2.1. Extracto de cancerina en éter de petróleo

El extracto de cancerina fue caracterizado químicamente y fraccionado por crioprecipitación, generando 2 fracciones altamente citotóxicas y una fracción que induce proliferación de las células tumorales, que limitaba la actividad citotóxica del extracto crudo. La citotoxicidad de las fracciones activas fue selectiva para las células de cáncer de mama, en comparación con las células de tejido mamario sano (MCF 10A) y las células del sistema inmune (PBMC). Estas fracciones tienen un alto potencial para el desarrollo de fitofármacos para tratar el cáncer de mama. En ambas fracciones se identificó a la pristimerina como el compuesto predominante, ambas fracciones generaron valores de IC_{50} cercanos a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las células tumorales tras 72 h de tratamiento, y presentaron rendimientos similares (Maldonado-Cubas et al., 2018). Dado que ambas fracciones tienen actividad similar y patrones cromatográficos similares, ambas fracciones fueron combinadas para incrementar el rendimiento global del fitofármaco, el pool de estas fracciones generó valores de IC_{50} de 9.1 y 10.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células MDA-MB-231 y MCF7, respectivamente, tras 72 h de tratamiento.

La pristimerina se identificó por HPLC-DAD a 420 nm con un tiempo de retención de 24.435 min. La pristimerina es un compuesto predominante, con el mayor porcentaje de área bajo la curva en las 2 fracciones activas del extracto en éter de petróleo de cancerina. La pristimerina inhibe la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*, la angiogénesis y los procesos metastásicos, induce efectos en el ciclo celular, la apoptosis, la actividad del proteasoma y en la generación de especies reactivas de oxígeno, así como en las vías NF- κ B, AKT/mTOR y MAPK/ERK [25].

3.2.2. Extracto de aranto en etanol

El extracto de aranto fue positivo para bufadienólidos en ensayos de TLC. Este se obtuvo inicialmente usando la planta completa, en un segundo estudio, la planta fue separada en tallos, hojas y raíces y cada uno de estos extractos fue evaluado individualmente. El extracto etanólico de la raíz de aranto presentó la actividad citotóxica más alta. No se observó citotoxicidad para las células del sistema inmune (PBMC), por lo que esta fracción tiene un alto potencial para el desarrollo de fitofármacos para tratar al cáncer de mama.

En el extracto etanólico de la raíz de aranto se identificaron tentativamente por HPLC/MS los bufadienólidos: kalandaignremosido y $3\beta,5\beta,11\alpha,14\beta,19$ -pentahidroxi-12-oxo-bufa-20,22-dienolido, con valores de m/z de 475.231891 y 493.133433, ambos compuestos fueron previamente identificados en extractos acuosos de la raíz de aranto (*K. daigremontiana*) junto con otros bufadienólidos [26]. Los bufadienólidos tienen actividad citotóxica ante diferentes líneas celulares cancerígenas. Se ha reportado que el género *Kalanchoe* contiene potentes bufadienólidos, como son la bersaldegenina-1, 3, 5-ortoacetato y briofilina B que poseen actividad citotóxica [27].

3.3. Desarrollo de sistemas de nanoencapsulación de fitofármacos

3.3.1. Sistemas de nanoencapsulación para el fitofármaco derivado de cancerina

Se evaluaron diversos sistemas de liberación de fármacos, incluyendo nanopartículas sólidas lipídicas (diámetro hidrodinámico de 270 nm), acarreadores lipídicos nanoestructurados (diámetro hidrodinámico de 15 nm), nanopartículas poliméricas de policaprolactona obtenidas por nanoprecipitación (diámetro hidrodinámico de 200 nm) y nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico co-glicólico obtenidas mediante secado por aspersión (500 nm) y por nanoprecipitación. Se evaluaron los efectos de las variables de síntesis sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial Z.

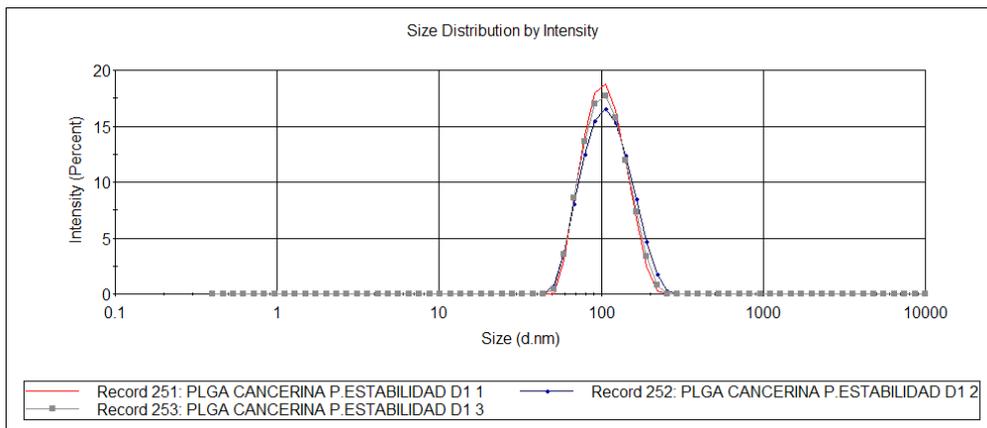


Figura 5. Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas cargadas con el fitofármaco de cancerina.

Las partículas obtenidas por nanoprecipitación, empleando ácido poliláctico co-glicólico, presentaron características adecuadas de tamaño y estabilidad. Las partículas obtenidas, con el extracto incorporado, mostraron un diámetro hidrodinámico de 100 nm (Figura 5) y un potencial Z de -20 mV. Almacenadas a 4 °C permanecieron estables durante el periodo evaluado (30 días). En una proporción 1:1 polímero vs fitofármaco mostraron una eficiencia de encapsulamiento de 50 % m/m.

Se evaluó la tasa de liberación en PBS pH 7.4, a 37 °C, en agitación, durante 1 mes. No se evidenció liberación de la pristimerina en el tiempo evaluado, probablemente por su naturaleza hidrofóbica.

3.3.2. Sistemas de nanoencapsulación el fitofármaco derivado de aranto

Para la generar nanopartículas cargadas con los fitofármacos de aranto se seleccionó inicialmente secado por nanoaspersión, las partículas mostraron un diámetro medio de 450 nm (mayor al requerido). Adicionalmente, se desarrolló una metodología para la síntesis de nanopartículas a base de gelatina y 1,1-carbonildiimidazol, empleando el método de desplazamiento de solventes modificado. Este sistema usa reactivos económicos y biocompatibles; el tamaño de partícula y el potencial Z, son modulables; la síntesis es reproducible y es escalable. Fue posible obtener partículas con diámetro hidrodinámico menor a 20 nm y valores de potencial Z cercanos a 0 mV, con tamaño de partícula estable por al menos

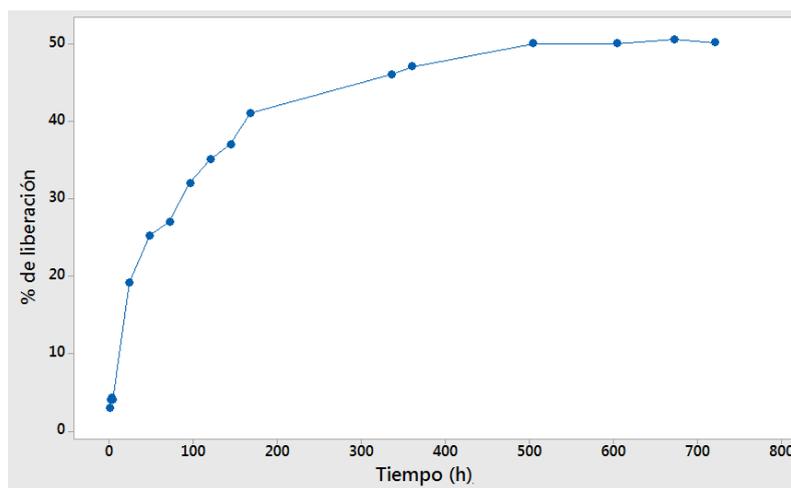


Figura 6. Cinética de liberación del fitofármaco obtenido de aranto.

30 días a 4 °C, estas características las hacen apropiadas para su acción farmacológica en el tratamiento del cáncer de mama. El fitofármaco de aranto fue incorporado en las nanopartículas obteniéndose una eficiencia de encapsulamiento de 40 % m/m, determinada por espectroscopia UV-Vis. Se evaluó la tasa de liberación en PBS pH 7.4, a 37 °C, en agitación, durante 1 mes (700 horas). La cinética de liberación está descrita por la gráfica que se presenta en la Figura 6. Se observa que la liberación ocurre a una mayor tasa durante las primeras 72 h, posteriormente, la tasa de liberación baja, alcanzándose una meseta a las 500 horas (20 días). Tras este tiempo, sólo el 50 % del fitofármaco atrapado fue liberado de las nanopartículas.

3.4. Evaluación de la citotoxicidad de los fitofármacos nanoencapsulados

Las nanopartículas cargadas con los fitofármacos fueron estudiadas en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 a 72 h.

La administración del fitofármaco de cancerina de manera nanoparticulada generó la reducción de los valores de IC_{50} (ver tabla 3). En las células MCF7, el IC_{50} de las nanopartículas fue de 4.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para la línea celular MDA-MB-231 se encontró un IC_{50} de 3.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 3. Valores de IC_{50} para el fitofármaco de cancerina libre y encapsulado.

Tipo celular	Prueba	IC_{50} a 72 h ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
MDA-MB-231	Fitofármaco de cancerina (<i>Semialarium mexicanum</i>)	9.1
	Nanopartículas poliméricas con carga de fitofármaco	3.83
MCF7	Fitofármaco de cancerina (<i>Semialarium mexicanum</i>)	10.5
	Nanopartículas poliméricas con carga de fitofármaco	4.28

Las partículas cargadas con el fitofármaco de aranto fueron citotóxicas para las células derivadas de cáncer de mama, el efecto del fitofármaco se vio potenciado al administrarse en una nanopartícula. Los valores de IC_{50} se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de IC₅₀ para el fitofármaco de aranto libre y encapsulado.

Tipo celular	Prueba	IC ₅₀ a 72 h (µg/mL)
MDA-MB-231	Fitofármaco de aranto (<i>Kalanchoe daigremontiana</i>)	17.21
	Nanopartículas poliméricas con carga de fitofármaco	10.97
MCF7	Fitofármaco de aranto (<i>Kalanchoe daigremontiana</i>)	18.71
	Nanopartículas poliméricas con carga de fitofármaco	13.74

La nanoencapsulación de los fitofármacos mejoró el efecto citotóxico de estos, reduciendo los valores de IC₅₀ en un 60 %. Con valores que, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI, USA), evidencian su potencial aplicación para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer [28].

4. Conclusiones

Hemos desarrollado dos nanofármacos que causan la muerte de las células de cáncer de mama por apoptosis y que cumplen criterios internacionales que sugieren su potencial aplicación en el tratamiento del cáncer de mama (NCI, USA). Estos nanofármacos están diseñados para dirigirse de manera específica a los tumores mamarios y ejercer su efecto terapéutico localmente, reduciendo con ello la probabilidad de presentar efectos secundarios. Los nanofármacos que hemos desarrollado están elaborados con materiales aprobados para su uso en humanos por la FDA. Las metodologías de obtención toman en cuenta rendimientos, costos, inocuidad, reproducibilidad y escalabilidad de los procesos de obtención.

En este estudio se ha demostrado nuevamente que las plantas poseen potencial para generar productos con efectos biológicos significativos y que la tecnología ayuda a generar procesos y productos de calidad. La combinación de la nanotecnología con la fitofarmacología promete resultados mejorados, al ofrecer potenciar la acción farmacológica, tener un efecto dirigido a los órganos blanco, la capacidad de desarrollo de medicina personalizada y la reingeniería de los productos.

Son muchos los aspectos a considerar para el desarrollo de nanofitofármacos pero un trabajo colaborativo de especialistas en múltiples áreas puede dar lugar a la generación de productos exitosos, eficaces y seguros.

Actualmente, estos productos están en ensayos preclínicos para evaluar su seguridad en modelos animales.

Bibliografía

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Chan, C.W.H., Law, B.M.H., So, W.K.W., Chow, K.M., & Waye, M.M.Y. (2017). Novel Strategies on Personalized Medicine for Breast Cancer Treatment: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112423>
3. Chaudhary, T., Chahar, A., Sharma, J.K., Kaur, K., & Dang, A. (2015). Phytomedicine in the Treatment of Cancer: A Health Technology Assessment. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(12), XC04-XC09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15701.6913>
4. Cheng, Y.-T., Yang, C.-C., & Shyur, L.-F. (2016). Phytomedicine—Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacological Research*, 114, 128-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.022>
5. Desai, A.G., Qazi, G.N., Ganju, R.K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A.K. et al. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9(7), 581-591. <https://doi.org/10.2174/138920008785821657>
6. Conte, R., Luca, I., Luise, A., Petillo, O., Calarco, A., & Peluso, G. (2016). New Therapeutic Potentials of Nanosized Phytomedicine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16, 8176-8187. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12809>
7. Khan, T., & Gurav, P. (2018). PhytoNanotechnology: Enhancing delivery of plant based anti-cancer drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.01002>

8. Espinoza, S.M., Patil, H.I., San Martín-Martínez, E., Casañas Pimentel, R., & Ige, P.P. (2020). Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(2), 85-126. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1539990>
9. Nasirizadeh, S., & Malaekheh-nikouei, B. (2020). Journal of Drug Delivery Science and Technology Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55(July 2019), 101458. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101458>
10. Olusanya, T.O.B., Ahmad, R.R.H., Ibegbu, D.M., Smith, J.R., & Elkordy, A.A. (2018). Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*, 23(4), 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
11. Babazadeh, A., Zeinali, M., & Hamishehkar, H. (2017). Nano-Phytosome: A Developing Platform for Herbal Anti-Cancer Agents in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, 18(999), 1-1. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170508095250>
12. Mendes, L.P., Pan, J., & Torchilin, V.P. (2017). Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. In *Molecules*, 22(9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>
13. Czarnobaj, K. (2008). Preparation and characterization of silica xerogels as carriers for drugs. *Drug Delivery*, 15(8), 485-492. <https://doi.org/10.1080/10717540802321495>
14. Elhissi, A.M.A., Ahmed, W., Hassan, I.U., Dhanak, V.R., & D'Emanuele, A. (2012). Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/837327>
15. Farzin, A., Etesami, S.A., Quint, J., Memic, A., & Tamayol, A. (2020). Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Healthcare Materials*, 9(9), 1-29. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901058>
16. Majik, M.S., Gawas, U.B., & Mandrekar, V.K. (2019). Analytical methods for natural products isolation: Principles and applications. In *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00024-0>

17. Zhang, Q.W., Lin, L.G., & Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. In *Chinese Medicine (United Kingdom)* 13(1), 20. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
18. Panda, D., & Manickam, S. (2019). Cavitation technology-the future of greener extraction method: A review on the extraction of natural products and process intensification mechanism and perspectives. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/app9040766>
19. Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-de la Cruz, G., Ramírez de León, J.A., & Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
20. Pandey, A., Tripathi, S., & Pandey, C.A. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 115(25), 115-119.
21. Yeo, Y.L., Chia, Y.Y., Lee, C.H., Sheng Sow, H., & Sum Yap, W. (2014). Effectiveness of Maceration Periods with Different Extraction Solvents on in-vitro Antimicrobial Activity from Fruit of *Momordica charantia* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 16-23. <https://doi.org/10.7324/japs.2014.401004>
22. Sarker, S.D., Latif, Z., & Gray, A.I. (2006). Natural Products Isolation: an overview. In *Natural Products Isolation*, 864(July). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>
23. Yang, B., & Liu, P. (2012). Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1578-1590. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5671>
24. Allahverdiyev, A.M., Parlar, E., Dinparvar, S., Bagirova, M., & Abamor, E.Ş. (2018). Current aspects in treatment of breast cancer based of nano-drug delivery systems and future prospects. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), S755-S762. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1511573>

25. Maldonado-Cubas, J., San Martín-Martínez, E., Quiroz-Reyes, C.N., & Casañas-Pimentel, R.G. (2018). Cytotoxic effect of *Semialarium mexicanum* (Miers) Mennega root bark extracts and fractions against breast cancer cells. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(6), 1185-1201. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0580-x>
26. Moniuszko-Szajwaj, B., Pecio, Ł., Kowalczyk, M., & Stochmal, A. (2016). New bufadienolides isolated from the roots of *Kalanchoe daigremontiana* (crassulaceae). *Molecules*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/molecules21030243>
27. Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
28. van Maarseveen, C., & Jetter, R. (2009). Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. *Phytochemistry*, 70(7), 899-906. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.011>