

# TRABAJOS ORIGINALES

## ► Diferentes efectos sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos por extractos de *Buddleja incana*

EMILIO GUIJA POMA<sup>1</sup>, JOSÉ AMIEL PÉREZ<sup>1</sup>, ALEJANDRO FUKUSAKI YOSHIZAWA<sup>1</sup>, ÓSCAR REÁTEGUI ARÉVALO<sup>1</sup>, DAVID AMIEL PEÑA<sup>1</sup>, JAVIER ENCISO GUTIÉRREZ<sup>1</sup>, ELFER VALDIVIA<sup>2</sup>, RAFAEL RODRÍGUEZ BAYONA<sup>3</sup>, KATIA NEYRA LANDA<sup>3</sup>, NATHALY ENCISO BENAVIDES<sup>4</sup>

### RESUMEN

*Buddleja incana* es una planta andina, de uso medicinal por los nativos, para reumatismo, resfriado, empleada además como analgésico en humanos, y en casos de queratitis, úlceras, papilomas y heridas en veterinaria; así se registra en publicaciones de la colonia y del siglo pasado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos de los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico, acuoso e hidroalcohólico de la *B. incana*, a dosis de 769, 253 y 154  $\mu\text{g/mL}$ , y la relación con su capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles y flavonoides. La capacidad antioxidante fue medida por el método FRAP, el contenido de polifenoles por el método que mide Ac Gálico/100g ms, y el de flavonoides mediante el método que mide mg de Catequina (+)/100 g ms. El efecto sobre la proliferación de fibroblastos expresado en Tasa de Inhibición Celular (TIC) y Tasa

de Estimulación Celular (TEC) empleando el 5-Fu como droga estándar, se midió según la técnica XTT, que mide la producción de formazán por células vivas evidenciado por colorimetría en un lector de ELISA a 450-655 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos demuestran efectos contrarios sobre la proliferación celular según el tipo de extracto, así, el extracto acuoso (TIC:59,4%), n-hexánico (TIC:45,8%) y clorofórmico (42,9%) tienen efectos inhibitorios a las 48 horas, manteniéndose a las 72 horas, mientras que los extractos metanólico (TEC: 282,6%) e hidroalcohólico (TEC:180,6%) tienen elevados efectos estimulantes de la proliferación de fibroblastos independientemente de la dosis usada y es mayor a las 24 horas para descender a las 48 y 72 horas. Se concluye que la *B. incana* tiene efectos inhibitorios y estimulantes de la proliferación de fibroblastos normales según

<sup>1</sup> LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

<sup>2</sup> LABORATORIO DE BIOLOGÍA (MICROBIOLOGÍA), UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

<sup>3</sup> INSTITUTO DE TRASPLANTES DE ÓRGANOS Y TEJIDOS, FFAA y PNP.

<sup>4</sup> ESTUDIANTE, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

el tipo de extracto que se use, por lo que es necesario determinar diferencialmente las fracciones de los extractos que cumplen estos efectos, así como contrastar en células tumorales e in vivo potenciales efectos antitumorales y/o regeneradores de tejido.

**Palabras clave:** *Buddleja incana*, proliferación de fibroblastos, tasa de inhibición celular, capacidad antioxidante

## DIFFERENT EFFECTS ON THE PROLIFERATION OF PRIMARY CULTURES OF FIBROBLASTS BY EXTRACTS OF *BUDDLEJA INCANA*

### ABSTRACT

*Buddleja incana* is a plant whose medicinal use by andean natives, for rheumatism, colds and as an analgesic in humans, and in cases of keratitis, ulcers, papilloma and wounds in veterinary are registered in the colony and the last century. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity and content of polyphenols and flavonoids, to itself as the effect on the proliferation of primary cultures of fibroblasts of extracts hexane, chloroform, methanol, aqueous and hydroalcoholic *B. incana*, at doses of 769, 253 and 154 mg / mL. The antioxidant capacity was measured by the FRAP method, the polyphenol content by Ac. Gallic method and flavonoids by the method of Catechine (+)/ 100g, effect on fibroblast proliferation was measured by XTT technique that measures the production of formazan by living cells, using microplates of 96 wells, RPMI-2640 added with 10% FBS and maintained at 37 ° C in an incubator with 5% CO<sub>2</sub>, the reading was done at 24, 48 and 72 hours in an ELISA reader at 450-655 nm wavelength. The results demonstrate opposite effects on cell proliferation depending on the extract and the aqueous extract (59.4%), n-hexane (45.8%) and chloroform (42.9%) have significant inhibitory effects on 48 hours, remaining at 72 hours, while the hydroalcoholic extract (180.6%) and methanolic (282.6%) have high stimulatory effects on fibroblast proliferation independent of the dose used and greater than 24 hours to descend at

48 and 72 hours. We conclude that the *B. incana* inhibitory and stimulating effects of the proliferation of normal fibroblasts by the type of extract used, so it is necessary to identify differentially fractions of extracts that meet these effects, as well as contrast in tumour cells and in vivo potential effects antitumor and / or regenerative tissue.

**Key words:** *Buddleja incana*, fibroblast proliferation, antioxidant

### INTRODUCCIÓN

*Buddleja incana*, conocida en las comunidades andinas como Quishuar, pertenece al género *Buddleja* de la familia *Loganiaceae*, este género es representado en Perú por 21 especies de árboles y arbustos, tiene hojas grandes de más de 5 cm de largo, cremosas y con pelos muy finos de color verde oscuro brillante. Su hábitat está entre 2.500 y 3.800 msnm mayormente en Huánuco, Pasco, Junín, Lima, Cuzco, La Libertad y Amazonas (1).

Del uso de esta planta con fines medicinales poco se ha publicado. Siglos atrás Ruiz y Pavón (2) la describen como uno de los remedios médicos nativos utilizado para curar el reumatismo, verrugas, el resfriado, o mezclado con orina para aliviar el dolor. En veterinaria es utilizada en ciertas comunidades para tratar la "enfermedad del sueño" en ovinos; para la curación de queratitis, úlceras y heridas en general (3). En la actualidad, se le atribuyen efectos antibacterianos y antimicóticos ginecológicos, así como el de ser estimulante de la proliferación del endometrio y regeneradora de la piel (4), habiéndose demostrado su efecto inhibitorio de la COX-2 en un modelo de inflamación gastrointestinal aguda en ratones (5).

Sin embargo, diversas plantas de este mismo género han sido estudiadas en su composición química y efectos biológicos. Se han descrito fenoles que inhiben la oxidación de L-dopa (6), glicósidos con actividad analgésica y antipirética (7), terpenoides con acción inhibitoria de la síntesis de eicosanoides, otros con acción inhibitoria de COX y de 5-lipoxigenasa (8), triglicósidos flavonoides (9), una saponina triterpenoide llamada mimengoside B (10), otros triterpenoides con acción anti *Mycobacterium tuberculosis* (11), iridoides, glicósidos phenylpropides y un glicósido flavonoide con efectos citotóxicos en

cultivo de hepatocitos (12), verbascocides y otros con actividad antibacteriana, antimicótica y anticáncer (13,14,15), derivados del ácido cafeico y flavonoides con fuerte efecto antioxidante y estimulante de la reparación y cicatrización de heridas (16), flavonoides con efectos antioxidantes y antiinflamatorios (14,15, 17,18), catalpol y efectos antihepatotóxicos (19).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los extractos hexánico, metanólico, clorofórmico, hidroalcohólico y acuoso sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos fetales de ratón y relacionarlos con la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides de la *Buddleja incana*.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Planta

La *Buddleja incana* fue colectada en Cerro de Pasco, la identificación fue realizada en el Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima).

### Obtención de extractos

Se siguió un procedimiento descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (20).

### Preparación de muestras para pruebas bioquímica

Se pesó 20 mg del extracto hidroalcohólico seco, el cual se diluyó en 10 mL de una solución hidroalcohólica (80:20). En ciertos casos fue necesario realizar diluciones adicionales para que las lecturas en el espectrofotómetro estuviesen comprendidas dentro de la curva patrón. Las determinaciones analíticas se realizaron utilizando las técnicas que a continuación se describen.

### Determinación de la capacidad antioxidante

Se utilizó la técnica propuesta por Szollosi y Varga (21). La densidad óptica se leyó a 593 nm en un espectrofotómetro Spectronic modelo Genesys 6. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado; se elaboró una curva patrón utilizando diversas concentraciones de sulfato ferroso, curva que se utilizó para realizar los cálculos.

### Determinación de polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó utilizando el método de Spanos y

Wrolstad (1990) (22), las densidades ópticas se leyeron en el espectrofotómetro a 765 nm. Para realizar los cálculos se preparó una curva patrón utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico.

### Determinación de flavonoides

Se utilizó la técnica propuesta por Jia (1999) (23). La densidad óptica se leyó a 510 nm. Para realizar los cálculos se utilizó una curva patrón preparada con concentraciones variables de catequina.

## Actividad sobre la proliferación celular

### Células

Fetos de ratón Balb/c de 16 días de gestación, procedentes del Instituto Nacional de Salud, fueron sometidos a procesamiento para la obtención de células de cultivo primario según protocolo convencional descrito previamente por nuestro grupo (20), empleando medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) y mantenido en incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Obtenido el cultivo celular primario, se realizaron 4 pasajes en las mismas condiciones de medio de cultivo, 10% de suero fetal bovino (SFB), 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C de temperatura; posteriormente, a partir de frascos con cultivo confluyente de células del último pasaje se realizó la siembra de las microplacas de 96 pocitas para el experimento de proliferación celular, usando tripsina al 0,5% como agente disociador de células y solución de Hank's sin Mg para el lavado.

### Protocolo de medición de proliferación celular

#### Tratamiento con extractos

Las placas de cultivo celular de 96 pocitas fueron sembradas con 5.000 células cada una y cultivadas en 200 µL de medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino mantenidas por 24, 48 y 72 horas en un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se añadió 50 µL de la solución del reactivo XTT a cada pocita y se incubó por 2 horas agitando uniformemente para luego medir la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450-655 nm.

Cada extracto de planta fue evaluado en 3 diferentes dosis: 154,84 µg/mL, 253,83 µg/mL y 769,20 µg/mL, con 3 repeticiones por cada dosis. Como controles se utilizó:

1.- Medio de cultivo con igual número de células denominado control proliferativo

(C) con el cual se aplica la fórmula para obtener la Tasa de Inhibición (TIC) y Tasa de Estimulación (TEC) de la Proliferación,

2.- 5-fluouracilo (5-Fu) como control positivo referencial. Las pozas de los bordes superior e inferior de la placa para cultivo celular de 96 pocitas no fueron utilizadas para evitar contaminaciones.

### Técnica de medición de la proliferación

La proliferación celular se midió mediante un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide conocido como XTT) a sales de formazán, mediante la acción de deshidrogenasas mitocondriales que se producen de forma natural cuando las células son viables, denominada prueba XTT (24). Se utilizó una fórmula que mide la tasa de inhibición del crecimiento celular (TIC) expresada en porcentaje obtenido en base a la densidad óptica medida en lector de ELISA a una longitud de onda de 450-655 nm (25), tomando como DO referencial la obtenida por el control proliferativo (C) que corresponde a cultivo celular en medio RPMI-1640 con adición de 10% de suero fetal bovino sin tratamiento con extracto alguno.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas y tallos de *B. incana* fueron tratados con diversos solventes habiéndose producido la mayor cantidad de extracto equivalente a 8,17g (16,35%) con el hidroalcohólico, seguido por el extracto metanólico con 6,60g (12,06%), mucho menos produjo el extracto acuoso 1,51g (3,03%) y el extracto hexánico 1,15g (2,3%), en tanto que el cloroformo solo produjo 0,80g (1,60%) de extracto (Tabla N° 1). De acuerdo a la polaridad de los solventes usados, se determinó que el 88,96% del total

de los extractos corresponde a los obtenidos con solventes polares y solo el 11,04% fue obtenido por los solventes apolares. Por no haber estudios previos sobre esta planta no es posible hacer comparaciones sobre el rendimiento obtenido.

Sin embargo, lo podemos correlacionar con los efectos sobre cultivos de fibroblastos; así, los extractos hidroalcohólico y metanólico, que son los que en mayor cantidad se encuentran, tienen efectos estimulantes de la proliferación, mientras que los extractos hexánico, acuoso y clorofórmico, que corresponden a menor peso en el proceso de extracción, tienen efectos inhibitorios de la proliferación de fibroblastos, relevando el alto efecto inhibitorio de la proliferación del extracto acuoso que es superior al del control 5-fluouracilo.

En la Tabla N° 2, se muestran los resultados obtenidos al medir la capacidad antioxidante empleando el método FRAP en extracto hidroalcohólico, la baja capacidad antioxidante (0,82 mM/100 y ms) contrasta con el alto contenido de polifenoles (11,78 g Ac.gálico/100 g ms) y con los de flavonoides (112,86 mg equivalentes de catequina (+)/100 g ms). La baja capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico en este estudio difiere con lo que encontraron en otras especies de *Buddleja*, mientras que flavonoides y polifenoles han sido descritos relacionados a diversos efectos biológicos (6,9,12,14,17,18).

En este trabajo se determina que el contenido de polifenoles y flavonoides en el extracto hidroalcohólico de la *Buddleja incana* es alto, superior a lo descrito para otras plantas medicinales peruanas empleando la misma técnica para su determinación (20), pudiendo explicar la correlación de estos niveles altos con el efecto estimulante de la proliferación de fibroblastos del extracto hidroalcohólico de todas las plantas estudiadas en el mencionado trabajo, incluyendo la

TABLA N° 1

PESO EN GRAMOS Y PORCENTAJE DE LA MUESTRA ORIGINAL DE DIFERENTES EXTRACTOS DE *BUDDLEJA INCANA*

Solventes	Extracto hexánico	Extracto clorofórmico	Extracto metanólico	Extracto acuoso	Extracto hidroalcohólico
Peso en gramos	1,1524	0,8001	6,6030	1,5129	8,1798
Porcentaje de muestra	2,3	1,6	12,06	3,03	16,35

TABLA N° 2

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Buddleja incana*.

Planta	Polifenoles (g Ac. gálico/100 g ms)	FRAP (mM/100 g ms)	Flavonoides (mg Catequina(+)/100 g ms)
Buddleja incana	11,78	0,82	112,86

*Buddleja incana*, desconociéndose el contenido de ellos en los extractos usando otros solventes.

Es importante resaltar que en este trabajo los efectos en la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos, medidos por inhibición o estimulación celular, no guardan relación con el tipo de solvente utilizado; así, efectos diferentes se observan en los extractos obtenidos usando solventes polares, como la alta tasa de inhibición celular mostrada por el extracto acuoso, y contrariamente, el extracto metanólico muestra la más alta tasa de estimulación celular, lo que permite especular que las moléculas responsables de estos efectos son arrastrados individualmente por el agua o el metanol, no por ambos, debiendo considerarse tal vez el grado de polaridad. Podríamos inferir que las moléculas responsables de la inhibición celular son muy polares por lo que son solubles en agua, en tanto que las moléculas responsables de la estimulación celular deben ser poco polares y por lo tanto solubles en alcohol.

Al medir el efecto de diversos tipos de extractos según el solvente usado sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos fetales de ratón, encontramos que los extractos acuoso, hexánico y clorofórmico produjeron un efecto inhibitorio de la proliferación expresado en una moderada Tasa de Inhibición

Celular (TIC), la cual fue de 59,4% y 53,1% a las 48 horas con el extracto acuoso a dosis de 154,84  $\mu\text{g/mL}$  y 253,83  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, mientras que el extracto n-hexánico produjo una TIC de 45,8% con dosis de 253,83  $\mu\text{g/mL}$ , y el extracto clorofórmico produjo una TIC de 42,9% (Figura 1). Estas TIC son ligeramente superiores al 5-fluouracilo (43,1%) mientras que a otras dosis los tres extractos produjeron inhibición de la proliferación pero a menor tasa que el control 5-fluouracilo. Este efecto inhibitorio de la proliferación de fibroblastos similar al efecto del control 5-FU sugiere posibles efectos citotóxicos en otras células normales y también en células tumorales como ha sido demostrado en otras especies de este mismo género (12,13,14).

En tanto que los extractos hidroalcohólico y metanólico produjeron altas tasas de estimulación de la proliferación que van de 78,8% a 282,6% a las 24 horas disminuyendo a las 48 y 72 horas. El extracto metanólico es el que tiene el mayor efecto estimulante dosis dependiente siendo la tasa más alta a dosis de 769,2  $\mu\text{g/mL}$  (282,6%). Este efecto puede atribuirse al alto contenido de flavonoides, los cuales están presentes en otra especie de *Buddleja* y han demostrado fuerte efecto estimulante de la reparación y cicatrización (16), eventos en los cuales participan decisivamente los fibroblastos.

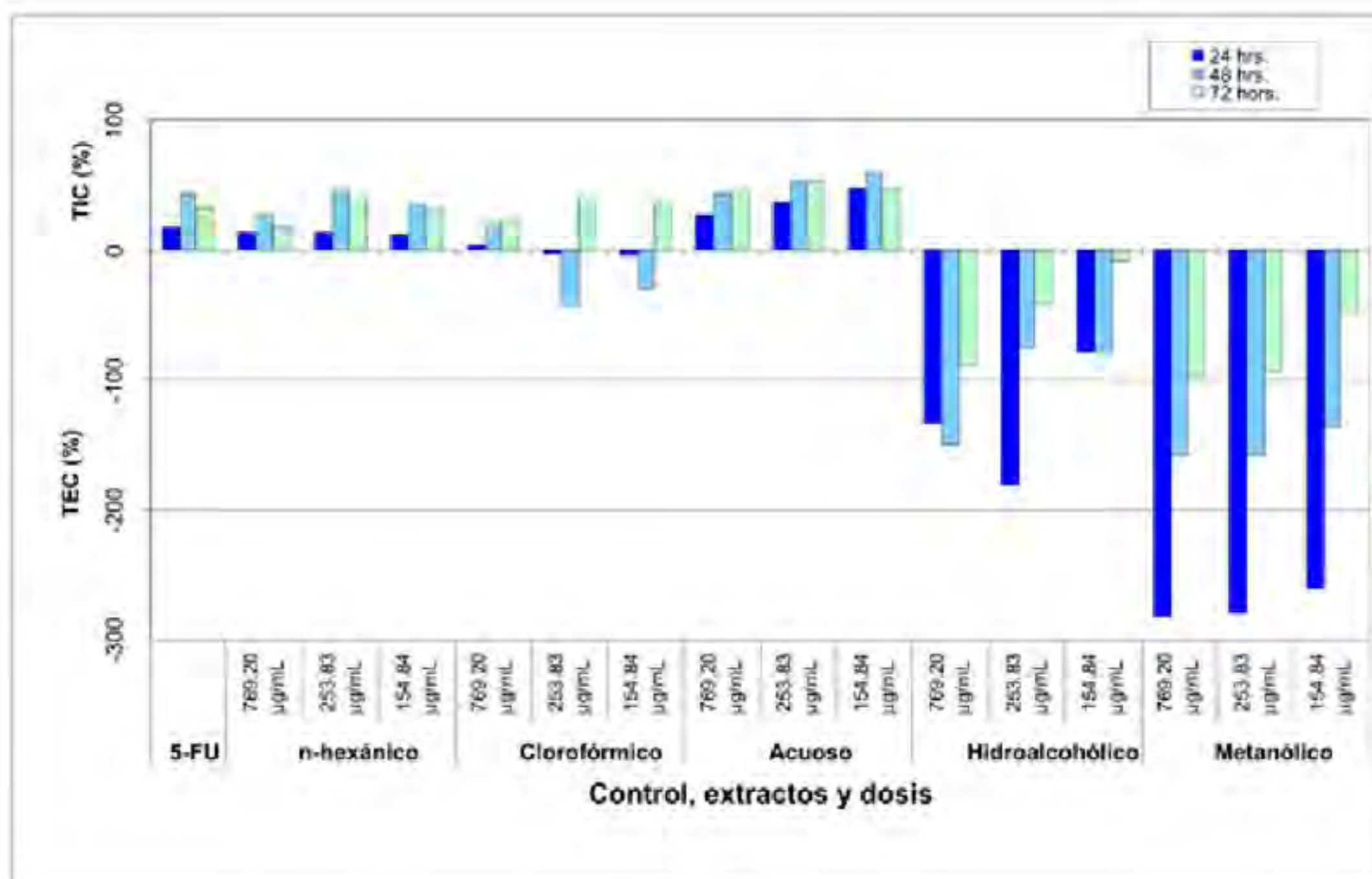


FIGURA Nº 1. TASA DE INHIBICIÓN Y ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS POR DIVERSOS EXTRACTOS DE *Buddleja incana* A DIFERENTES DOSIS Y TIEMPO

## CONCLUSIONES

1. Los extractos acuoso, n-hexánico y clorofórmico de la *Buddleja incana* tienen efectos inhibitorios de la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos fetales normales de ratón, expresados en TIC de 59,4%, 45,8% y 42,9% respectivamente, que son igual y ligeramente superior a la TIC del 5-fluoracilo.
2. Los extractos metanólico e hidroalcohólico tienen efectos estimulantes de la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos fetales

de ratón expresados en una TEC de 282,6% y 180,6% respectivamente.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú, por el financiamiento de la presente investigación mediante Contrato de Subvención: 016-2007-CONCYTEC-OAJ.

Al Hospital Militar Central del Perú por las facilidades que nos brindaron para la realización del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [http://www.minam.gob.pe/pdf/familias/D Magnoliophyta C Magnoliopsida O Gentianales F LOGANIACEAE.pdf](http://www.minam.gob.pe/pdf/familias/D_Magnoliophyta_C_Magnoliopsida_O_Gentianales_F_LOGANIACEAE.pdf). Consultado el 17.9.2009.
2. Ruiz y Pavón. J. Flora Peruviana, et Chilensis Prodrromus, *Sive Novorum Generum Plantarum Peruvianum et Chilensium Descriptiones et Icones*. 1794. Madrid. Tomo I. pp. 52. On Line. Accesado en <http://www.illustratedgarden.org/mobot/rarebooks/page.asp?relation=QK253R98317981802V2&identifier=0165>. 23.11.09. 8.55 pm.

3. Bazalar H., McCorkle SM. Estudios etnoveterinarios en comunidades alto andinas del Perú. Serie comunidades. Reporte técnico 1989; No. 99, pp 58-60.
4. Villavicencio, O. La fitoterapia a través del tiempo. Fitoterapia en el Perú. ISBN 9972-785-34-3. On line, <http://www.maca-peruana.com/home.htm>, Consultado el 17.9.2009 a las 18.40 horas.
5. Enciso, J; Tsumura T. Inhibición de la ciclooxigenasa-2 por *Buddleja incana* en inflamación gastrointestinal en ratas: comunicación preliminar. Revista de la Academia Peruana de Farmacia. 2005; Vol. 20: 27-35.
6. Kubo, I; Yokokawa, Y; KINST-HORI, I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. J Nat Prod. 1995; 58(5):739-43.
7. Martínez-Vázquez, M; Ramírez-Apan, TO; Aguilera, H; Bye R. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of flavone linaris of *Buddleja cordata*. J Nat Prod. 1996; 58(5): 712-720.
8. Liao YH, Houghton PJ, Houlst JR. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. J Nat Prod. 1999; 62(9): 1241-5.
9. Emam Am, Elias R, Moussa AM, Faure R, Debrauwer L, Balansard G. Two flavonoid triglycosides from *Buddleja madagascariensis*. Phytochemistry. 1998; 48(4): 739-42.
10. Emam Am, Moussa AM, Faure R, Elias R, Balansard G. Isolation of mimengoside B, a triterpenoid saponin from *Buddleja madagascariensis*. J Ethnopharmacology 1997; 58(3): 215-7.
11. Bamuamba K, Gammon DW, Meyers P, Dijoux-Franca MG, Scott G. Anti-mycobacterial activity of five plant species used as traditional medicines in the Western Cape Province (South Africa). J Ethnopharmacol. 2008; 117(2): 385-90.
12. Houghton PJ, Hikino H. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. Planta Med 1989; 55(2): 123-6. ICTV. 2002. Virus Taxonomy Academic Press.
13. Li J, Zhao y, Wang B, CUI J. Phenylethanoid glucosides from flos *Buddlejae*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1997; 22(10): 613-5, 640.
14. Houghton PJ, Mensah AY, Iessa N, Hong LY. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. Phytochemistry 2003; 64 (2): 385-93.
15. Adedapo AA, Jimoh Fo, Koduru S, Masika PJ, Afolayan AJ. Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. BMC Complement Altern Med. 2009; 9(21).
16. Mensah Ay, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, Dunn M, Hughes Ma, Cherry GW. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. J Ethnopharmacol. 2001; 77(2-3): 219-26.
17. Peng QH, Yao XL, Wu QL, Chen M. Effects of extract of *buddleja officinalis* on prevention of dry eye in castrated rabbits. Zhonghua Yan Ke Za Zhi 2008; 44(11): 1011-9.
18. Lee YJ, Kang DG, Kim JS, Lee HS. *Buddleja officinalis* inhibits high glucose-induced matrix metalloproteinase activity in human umbilical vein endothelial cells. Phytother Res. 2008; 22(12): 1655-9.

19. El-Domiaty MM, Wink M, Abdel AAL MM, Abou-Hashem MM, Abd-Alla RH. Antihepatotoxic activity and chemical constituents of *Buddleja asiatica* Lour. *Z Naturforsch C*. 2009; 64(1-2): 11-9.
20. Enciso J; Amiel J; Guija E; Fukusaki A; Reátegui, O; Amiel D; Enciso N.; Valdivia E; Rodríguez R; Neyra K. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Revista Científica* 2008; Vol. 5 (3/4): 164-176.
21. Szollosi R, Varga I. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method) *Acta Biol. Szeg.* 2002; 46(3-4): 125-127.
22. Spanos Ga, Wrolstad Re. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 1565-1571.
23. Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64: 555-599.
24. Scudiero Da, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, and Boyd MR. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 1988; 48: 4827-4833.
25. Cui K, Nan KJ, Tian T, Guo YH, Zhao N, Wang L. Chinese medicinal compound delisheng has satisfactory anti-tumor activity, and is associated with up-regulation of endostatin in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in three-dimensional culture. *World J Gastroenterol* 2007; 13(41): 5432-5439.

E-MAIL: JENCISO333@YAHOO.COM.MY

RECEPCIÓN:  
28 DE MAYO DE 2009

ACEPTACIÓN:  
18 DE JUNIO DE 2009