

## Efectos citotóxicos de los extractos de hoja de *Annona Cherimola* Mill (Annonaceae)

### Cytotoxic effects of leaf extracts of *Annona Cherimola* Mill (Annonaceae)

Miguel Marín-Gómez<sup>1</sup>, Carmen Pineda-Rojas<sup>2</sup>, Consuelo Medina-Armijos<sup>2</sup>, Luis Morocho-Yaguana<sup>3</sup>, Segundo Marín-Gómez<sup>4</sup>, Miguel Barría-Maldonado<sup>5</sup>, Masao Nishikawa<sup>6</sup> y Antonio Camins-Espuny<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Director de proyecto. Centro de Biotecnología. Universidad Nacional de Loja (UNL), ECUADOR. [mimarin007@hotmail.com](mailto:mimarin007@hotmail.com)

<sup>2</sup>Técnica de Laboratorio. Centro de Biotecnología UNL – ECUADOR. [karmita90@hotmail.com](mailto:karmita90@hotmail.com), [consuelomedina@hotmail.com](mailto:consuelomedina@hotmail.com)

<sup>3</sup>Técnico de Laboratorio. Unidad de Fitoquímica - Laboratorio de Análisis Químico UNL-ECUADOR. [luismorocho02@gmail.com](mailto:luismorocho02@gmail.com)

<sup>4</sup>Asesor - Secretaria Nacional del Agua. Loja, ECUADOR. [segundo248@hotmail.com](mailto:segundo248@hotmail.com)

<sup>5</sup>Asesor - Docente – Investigador de la Universidad Austral de CHILE. [mbarriam@uach.cl](mailto:mbarriam@uach.cl)

<sup>6</sup>Asesor – Investigador de la Agencia de Cooperación Internacional Japonesa (JICA) JAPON. [masaonishikawa061748@gmail.com](mailto:masaonishikawa061748@gmail.com)

<sup>7</sup>Asesor Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Biomedical Research Networking Center in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain

#### Resumen

*Annona cherimola* (*A. cherimola*) es una planta tropical presente en el sur de Centro América y unas partes de Asia, que se utiliza principalmente para el tratamiento de la diabetes, etc. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto citotóxico de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de las hojas de *A. cherimola* en líneas celulares de cáncer y en células mononucleares humanas normales. Los extractos etanólico y clorofórmico mostraron una fuerte actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer en relación al efecto contra las células normales. El efecto citotóxico de los extractos etanólico y clorofórmico fue comparable a aquella de Fluorouracilo o Cisplatino (controles positivos). Los efectos citotóxicos de los extractos acuosos fueron bastante débiles en comparación con los efectos de los extractos en etanol y clorofórmico. A partir de estos resultados, se sugiere que *A. cherimola* podría tener componentes capaces de ser utilizados para el tratamiento terapéutico para el cáncer humano y también valdría la pena estudiar más a fondo su mecanismo de acción.

**Palabras clave:** *Annona cherimola*, efecto citotóxico, cáncer, extractos.

#### Abstract

*Annona cherimola* Mill (*A. cherimola*), a tropical plant present at the South of Centro America and at several places of Asia, is mainly used for the diabetes treatment. The aim of this study was to determine the cytotoxic effects of aqueous, ethanolic and chloroformic extracts from leaves of *A. cherimola* on cancer cell lines and normal human mononuclear cells. The ethanolic and chloroformic extracts showed the stronger cytotoxic activity against cancer cell lines than that against normal cells. The cytotoxic effect of ethanolic and chloroformic extracts was comparable with those of Fluorouracil or Cisplatin (positive control). The cytotoxic effect of the aqueous extracts was rather weak when compared with the effects of ethanolic and chloroformic extracts. From these results, it was suggested that *A. cherimola* could have constituents to be able to use in a therapeutic treatment for human cancer and also it would be worth to study further the mechanism of action.

**Keywords:** *Annona cherimola*, cytotoxic effect, cancer, extracts.

<sup>1</sup> Autor de correspondencia Miguel Marín-Gómez Carrera de Medicina de la Universidad Nacional de Loja. Campus Universitario Isidro Ayora. Correo electrónico: [miguel.marin@unl.edu.ec](mailto:miguel.marin@unl.edu.ec)

---

## Introducción

El cáncer sigue siendo un problema de salud importante en términos de morbilidad y mortalidad, a pesar de los avances en la detección temprana y la mejora en las opciones de tratamiento. El cáncer es una enfermedad hostil, que si no se detecta en una etapa temprana puede producir metástasis en otros órganos del cuerpo, lo que podría producir la ineficacia de ciertos tratamientos como la quimioterapia. La carcinogénesis es el desarrollo del cáncer mediante varias etapas que están fuertemente relacionadas con diferentes factores tales como la edad, hábitos alimentarios y el equilibrio hormonal (Kotecha, Takami et al. 2016). El cáncer de pulmón es una de las principales amenazas entre todos los tipos de cáncer, con una agregación de casi 1.4 millones de casos por año (Siegel, Naishadham et al. 2012). Por otra parte, el cáncer de colon y recto es una enfermedad común en los países en desarrollo (Deen, Silva et al. 2016, Song y Giovannucci 2016, Sparling, Song et al. 2016). Aunque se han desarrollado muchos fármacos contra el cáncer, la resistencia a estos fármacos es ubicua. Por consiguiente, la investigación y el desarrollo de fármacos nuevos y seguros es necesaria (Ravi, Arunkumar et al. 2015, Lin, Huang et al. 2016).

Cada vez hay más pruebas de que el aumento del consumo de frutas y verduras reducen el riesgo de cáncer de colon (Shirzad, Taji et al. 2011, Xu, Du et al. 2012, Jia, Jin et al. 2013, Chambers, Valentova et al. 2015). Muchas plantas comestibles y medicinales constituyen un recurso potencial para la investigación y el desarrollo de los agentes quimiopreventivos para el cáncer (Novio, Cartea et al. 2016, Stanisavljevi, Ili et al. 2016). Las plantas contienen metabolitos secundarios bioactivos y debido a su estructura compleja, investigaciones en este campo están siendo llevadas a cabo por los científicos (De Marino, Festa et al. 2014, Ghasemzadeh, Jaafar et al. 2015, Farzaei, Bahramsoltani et al. 2016). Para determinar el efecto que poseen los compuestos de las plantas sobre los diferentes tipos de patologías, se recogen diferentes partes de plantas, se preparan extractos y se ponen a prueba para la búsqueda de nuevos y novedosos productos quimioterapéuticos para tratar el cáncer, así como infecciones virales y microbianas. La evaluación citotóxica de las plantas constituye un importante procedimiento preliminar para identificar compuestos activos de las mismas (Viveros-Valdez, Oranday-Cárdenas et al. 2015).

***Annona cherimola (A. cherimola)*** es un miembro de la familia Annonaceae, y se puede encontrar en el sur de Centro América y también en algunas partes de Asia (Adarsh Verma, Ajay Kumar et al. 2011, Verma, Kumar et al. 2011). Esta planta contiene alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos, carbohidratos, proteínas,

compuestos fenólicos, fitoesteroles y aminoácidos (Tsuchiya 2015, He, Bai et al. 2016), los cuales podrían poseer cierta actividad citotóxica sobre las células cancerígenas. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad citotóxica de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de la hoja de *A. cherimola* en la línea celular de cáncer de colon (RKO), línea celular de adenocarcinoma alveolar (A549) y células mononucleares humanas normales.

## **Materiales y métodos**

### **Reactivos**

Ficoll Hypaque (HISTOPAQUE-1077), RPMI 1640 y DMSO se adquirieron de Sigma-Aldrich, EE.UU. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### **Planta (*Annona cherimola*)**

Las plantas de *A. cherimola* fueron obtenidas en la población de Quinara (1.612 msnm, clima subtropical), la cual se encuentra ubicada al sur del cantón Loja, en marzo de 2015. La especie fue identificada por el Sr. Bolívar Merino, especialista en taxonomía de plantas del herbario "Reinaldo Espinoza" de la Universidad Nacional de Loja. El material recogido se lavó con solución de hipoclorito de sodio (0.5%), se eliminó el exceso de agua y se dejó secar a temperatura ambiente durante dos semanas.

### **Preparación de extracto de hoja de *A. cherimola***

Del material seco (hojas) se tomaron 200 g, se agregó cloroformo y se agitó con agitador magnético durante 48 horas. Los extractos se concentraron en rotavapor a 30°C. La extracción se repitió tres veces y todo el concentrado se liofilizó y se refrigeró. El material restante de la extracción con cloroformo se secó y la metodología de extracción se repitió usando consecutivamente etanol y agua. Los extractos etanólicos se concentraron a 45°C y los acuosos a 55°C.

### **Líneas celulares y cultivo celular**

Células RKO (línea celular de cáncer de colon humano, ATCC, CRL-2577) y células A549 (línea celular de adenocarcinoma alveolar humano, ATCC, CCL-185) fueron adquiridas de la sección de Genética Humana y Microbiología Clínica del Departamento de Bioquímica de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

## Preparación de células mononucleares

Sangre periférica (heparinizada) se recogió de voluntarios sanos y se diluyó con el mismo volumen de PBS (o solución salina). Las células mononucleares (linfocitos B y T) se prepararon utilizando HISTOPAQUE-1077 (Ficoll Hypaque).

## Ensayo de citotoxicidad celular

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos se sembró 1 ml (que contienen  $1 \times 10^6$  células) de la suspensión celular en una placa de 24 pocillos. Después de la adhesión sobre la parte inferior del pocillo, las células se incubaron en medio RPMI 1640 completo. Se utilizaron varias concentraciones de los extractos y medicamentos como controles positivos (20, 100, y 1.000 mg/ml cada uno) a 6, 12, 24, 36, 48, 60, y 72 horas de incubación (5% de  $\text{CO}_2$ ). La cantidad de células vivas y células muertas se determinó con la técnica de azul tripán usando 20 ml de suspensión celular. Por último se calculó el porcentaje de células muertas contra los recuentos de células totales.

## Resultados

Para examinar el efecto de *A. cherimola* en la viabilidad celular, las líneas celulares de cáncer humano RKO y A549 y células mononucleares de sangre periférica, se incubaron en presencia o ausencia de extractos de hojas de *A. cherimola* bajo condiciones neutras o ácidas del medio de cultivo. Como control positivo se utilizaron Fluorouracilo y Cisplatino.

### 1. Citotoxicidad del extracto de hoja de *A. cherimola* en células RKO (cáncer de colon humano)

#### 1-1. Efectos de los extractos etanólicos

Al incubar las células RKO con el extracto etanólico de hoja de *A. cherimola* bajo condiciones de pH neutro del medio de cultivo (pH 7.2), se encontraron de 2 a 4.5 veces más de células muertas después de las incubaciones de 48, 60 y 72 horas en comparación con las del control negativo (sin extracto o Fluorouracilo). La citotoxicidad de este extracto fue comparable con el control positivo (Fluorouracilo)(Figs. 1a-A, 1a-B y 1a-C). Además, el extracto etanólico mostró una actividad citotóxica superior a la mostrada por el control positivo cuando el cultivo se lleva a cabo a 60 y 72 horas (Figs. 1a-B y 1a-C). Cuando se cultivaron las células de RKO bajo condiciones ácidas durante 48 horas o más, se encontraron dos veces más células RKO muertas en comparación con el control negativo (Figs. 1b-A y 1b-B). Esta citotoxicidad fue más fuerte

que el de control positivo a una concentración del extracto de 1000 mg/ml (Fig. 1b-C).

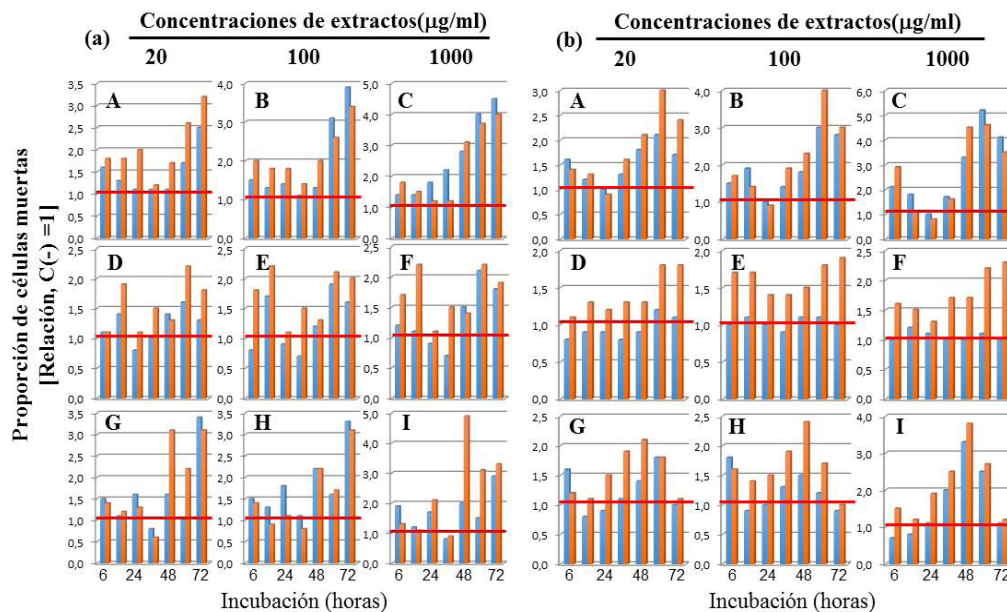
### 1-2. Efectos de lo extractos clorofórmicos

Para los extractos clorofórmicos se observó una fuerte citotoxicidad cuando se realiza el cultivo durante un largo período (72 horas), incluso a dosis bajas (20 y 100 µg/ml). La proporción de células RKO muertas fue tres veces superior bajo condiciones de pH neutro (Figs. 1a-G y 1a-H). Por otra parte, la proporción de células muertas fue tres veces superior después de la incubación de 48 horas, incluso bajo condiciones de pH ácido cuando se añade alta dosis de los extractos (1000 µg/ml) (Fig. 1b-I).

### 1-3. Efectos de los extractos acuosos

La citotoxicidad de los extractos acuosos fue débil y la proporción de células muertas fue de dos o menos bajo condiciones de pH neutro y ácido. Aunque fluorouracilo mostró una

Figura 1.



proporción de células muertas cercana a dos bajo condiciones de pH ácido, la proporción de células muertas obtenidas por los extractos acuosos fue aproximadamente uno (Figs. 1a- y 1b-D, 1a- y 1b-E, 1a- y 1b-F).

**Figura 1. Efectos del tratamiento con extractos de *A. cherimola* en la viabilidad de células RKO en condiciones de pH neutro (a) y pH ácido (b).**

Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas del extracto etanólico (A, B, y C), extracto acuoso (D, E, y F) y extracto de clorofórmico (G, H y I) durante 6, 24, 48 y 72 horas. Se utilizó Fluorouracilo como control positivo. Los datos fueron

expresados en porcentaje de células muertas con los extractos o Fluorouracilo contra el número de células muertas del control negativo (C-) [sin extractos o Fluorouracilo]. Los valores son la media de tres experimentos independientes.

## 2. Citotoxicidad del extracto de hoja de *A. cherimola* en células A549 (adenocarcinoma alveolar humana)

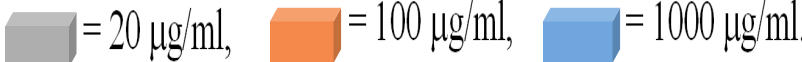
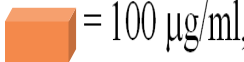

La citotoxicidad de los extractos también se evaluó con una línea celular de cáncer A549, utilizando Cisplatino como control positivo. Los resultados fueron sustancialmente los mismos que los presentados por las células RKO, es decir, los extractos de disolventes orgánicos (etanólicos y clorofórmicos) mostraron casi la misma citotoxicidad que presentó el control positivo (Cisplatino). Sin embargo, los extractos acuosos no mostraron la actividad citotóxica alguna (datos no mostrados).

## 3. Citotoxicidad del extracto de hojas de *A. cherimola* en células mononucleares de sangre periférica.

La figura 2 muestra que los extractos etanólico, acuoso y clorofórmico de *A. cherimola* a concentraciones de 20 y 100 mg/ml no tuvieron efectos significativos en la muerte celular total en comparación con el control negativo (sin extracto). Sin embargo, a una concentración de 1000 mg/ml, el porcentaje de muerte celular total fue significativamente alto y las relaciones fueron tres veces superiores en los extractos etanólicos y más de cuatro veces superiores en los extractos clorofórmicos cuando se incubó durante 48 horas (Fig. 2-B y 2-E). Los extractos acuosos mostraron una citotoxicidad extremadamente débil contra las células mononucleares normales (Figs. 2-C y 2-D).

### Figura 2. Efectos del tratamiento con extractos de *A. cherimola* en la viabilidad de células mononucleares humanas normales.

Las células se expusieron a varias concentraciones de extractos: etanólicos (A y B), acuosos (C y D) y clorofórmicos (E y F) durante 6, 24, 48 y 72 horas de incubación. Los datos se expresan en porcentaje de células muertas con los extractos contra el número de células muertas en el control negativo (C-) [sin extractos]. Los valores son la media de tres experimentos independientes.

 = 20 µg/ml,  = 100 µg/ml,  = 1000 µg/ml.



## Discusión

El presente estudio se realizó para evaluar la citotoxicidad de los extractos etanólico, acuoso y clorofórmico de *A. cherimola* contra líneas celulares de cáncer humano y células mononucleares humanas normales. La citotoxicidad se investigó contando las células viables y muertas utilizando la técnica azul de tripán, como se muestra en la sección de materiales y métodos después de la incubación de las células con los extractos en diversos períodos. Los resultados mostraron que los extractos orgánicos (etanólicos y clorofórmicos) presentaron una fuerte actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerosas, tales como células RKO y células A549 en todas las dosis de los extractos (20, 100 y 1000 mg/ml), siendo sus efectos comparables a los controles positivos (Fluorouracilo o Cisplatino). Por otro lado, la citotoxicidad de los extractos orgánicos para células mononucleares normales fue más bien débil y se observó únicamente cuando se utilizó una alta dosis (1000 mg/ml) de los extractos. A pesar de que el extracto acuoso también fue capaz de inducir muerte en líneas celulares cancerosas y en células mononucleares normales, su citotoxicidad fue muy débil.

En la zona tropical y subtropical, existe una variedad de plantas medicinales que han sido utilizadas para la prevención o el tratamiento de ciertas enfermedades o promoción de la salud (Falé, Ferreira et al. 2013, Krifa, Skandrani et al. 2014, Höllerhage, Rösler et al. 2015, He, Bai et al. 2016, Novío, Cartea et al. 2016, Stanisavljevi, Ili et al. 2016). La familia Annonaceae es una de estas plantas medicinales y se utiliza para controlar la diabetes y sus complicaciones (Florence, Benoit et al. 2014). *A. cherimola* Mill., pertenece a la familia Annonaceae, y contiene muchos compuestos como epicatequina, que corresponde a los flavonoides y una gran cantidad de carotenoides como la luteína (Albuquerque, Santos et al. 2016, Santos, Vilela et al. 2016). Otra planta de calabaza amarga (*Momordica charantica*) tiene una larga historia en la medicina tradicional y se utiliza para la terapia pre-clínica contra el cáncer, debido a que contiene flavonoides, taninos y triterpenos (Ma, Krynitsky et al. 2012, Raina, Kumar et al. 2016, Yadav, Yadav et al. 2016). Los fitoquímicos como los flavonoides, terpenoides, alcaloides, etc., con estructuras anfífilas o hidrófobas que se presume interactúan con las membranas biológicas dando como resultado la modificación de la fluidez de la membrana y la permeabilidad consistentes con sus efectos farmacológicos (Tsuchiya 2015). Stanisavljevi et al. (Stanisavljevi, Ili et al. 2016) han revelado que la intensidad de la actividad citotóxica de los extractos del guisante (*Pisum sativum* L.) se correlaciona con el contenido de epigallocatequina y luteolina que corresponden a los flavonoides. Como se mencionó anteriormente, la familia de las Annonaceae contiene una gran cantidad de flavonoides, por lo tanto, éstos podrían haber contribuido en la citotoxicidad

de los extractos orgánicos de *A. cherimola* al ser cultivados con las líneas celulares de cáncer humano RKO y A549. Además, el tumor sólido y su microambiente poseen un pH ácido debido al aumento del metabolismo fermentativo y a la mala perfusión, lo que favorece el crecimiento invasivo local y la metástasis (Estrella, Chen et al. 2013). Por lo tanto, el hecho de que los extractos de *A. cherimola* posean un efecto citotóxico sobre las células cancerosas, incluso bajo condiciones ácidas, sugiere la posibilidad de que existan sustancias activas contra el cáncer sólido en los extractos de dicha planta.

Sin embargo, existe la posibilidad de que dicha planta también posea compuestos que pudieran resultar adversos para la salud. Höllerhage et al analizaron el efecto de los extractos de las especies Annonaceae (*A. muricata* L., *A. squamosa* L., *A. mucosa* JACQ y *A. squamosa x cherimola* Mabb.) in vitro sobre células neuronales (línea celular de neuronas mesencefálicas humanas). En sus experimentos, los extractos con acetato de etilo caliente mostraron una fuerte disminución de la viabilidad celular y fuertes efectos neurotóxicos. A partir de estos resultados, se demostró que las especies Annonaceae también pueden tener algunos componentes peligrosos para la salud en términos de neurotoxicidad (Höllerhage, Rösler et al. 2015). Por lo tanto, sería necesario identificar y eliminar estos componentes dañinos de *A. cherimola*. También se examinaron los efectos de los extractos de *Amaranthus hybridus* en el sistema inmune y se observó que éstos estimularon la expresión del mRNA de Interferón gamma pero mostraron poco efecto en contra de la producción de anticuerpos (los autores, datos no publicados). Por lo tanto, sería muy importante estudiar los efectos de los extractos de *A. cherimola* sobre la inmunidad celular y humoral.

## Conclusiones

Se confirmó que los extractos orgánicos de *A. cherimola* contienen compuestos que provocan citotoxicidad. Estos componentes han ejercido un fuerte efecto citotóxico contra las células cancerosas, pero mostraron poco efecto en las células normales. Por lo tanto, se estima que estos flavonoides están presentes en extractos orgánicos para producir citotoxicidad sobre células cancerígenas en humanos. Los extractos orgánicos de *A. cherimola* mostraron citotoxicidad incluso en condiciones ácidas, lo cual sugiere que estos extractos orgánicos probablemente sean eficaces contra células de cáncer que están creciendo en un medio ácido.

## Referencias bibliográficas

- Adarsh Verma, M., et al. (2011). "ANTIDENATURATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ANNONA CHERIMOLA IN-VITRO." *Int. J. Pharma and Bio Sciences* 2(2): 1-6.



- Albuquerque, T. G., et al. (2016). "Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits." *Food Chem* **193**: 187-195.
- Chambers, C. S., et al. (2015). "'Non-Taxifolin' Derived Flavonolignans: Phytochemistry and Biology." *Curr Pharm Des* **21**(38): 5489-5500.
- De Marino, S., et al. (2014). "Antioxidant activity and chemical components as potential anticancer agents in the olive leaf (*Olea europaea* L. cv Leccino.) decoction." *Anticancer Agents Med Chem* **14**(10): 1376-1385.
- Deen, K. I., et al. (2016). "Colorectal cancer in the young, many questions, few answers." *World J Gastrointest Oncol* **8**(6): 481-488.
- Estrella, V., et al. (2013). "Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion." *Cancer Res* **73**(5): 1524-1535.
- Falé, P. L., et al. (2013). "Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves." *J Ethnopharmacol* **150**(2): 718-723.
- Farzaei, M. H., et al. (2016). "Phytochemicals as adjunctive with conventional anticancer therapies." *Curr Pharm Des* **22**(May 31): 1-18.
- Florence, N. T., et al. (2014). "Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats." *J Ethnopharmacol* **151**(2): 784-790.
- Ghasemzadeh, A., et al. (2015). "Phytochemical constituents and biological activities of different extracts of *Strobilanthes crispus* (L.) Bremek leaves grown in different locations of Malaysia." *BMC Complement Altern Med* **15**(1): 422.
- He, X., et al. (2016). "Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review." *J Ethnopharmacol* **187**: 160-182.
- Höllerhage, M., et al. (2015). "Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species." *Int J Toxicol* **34**(6): 543-550.
- Jia, L., et al. (2013). "A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF- signaling pathways." *BMC Complement Altern Med* **13**: 33.
- Kotecha, R., et al. (2016). "Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence." *Oncotarget* **May 24**(May 24): 1-14.
- Krifa, M., et al. (2014). "An aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall induces anti-tumor effects in melanoma-injected mice via modulation of the immune response." *Food Chem Toxicol* **69**: 76-85.
- Lin, J., et al. (2016). "Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Reverses Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice and Inhibits Acetylcholinesterase in Vitro." *Mar Drugs* **14**(4): 67-84.
- Ma, J., et al. (2012). "Quantitative determination of cucurbitane-type triterpenes and triterpene glycosides in dietary supplements containing bitter melon (*Momordica charantia*) by HPLC-MS/MS." *J AOAC Int* **95**(6): 1597-1608.
- Novío, S., et al. (2016). "Effects of Brassicaceae Isothiocyanates on Prostate Cancer." *Molecules* **21**(5): 626-654.
- Raina, K., et al. (2016). "Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy." *Semin Cancer Biol.*
- Ravi, H., et al. (2015). "Chitosan-glycolipid nanogels loaded with anti-obese marine carotenoid fucoxanthin: Acute and sub-acute toxicity evaluation in rodent model." *J Biomater Appl* **30**(4): 420-434.
- Santos, S. A., et al. (2016). "Profiling of lipophilic and phenolic phytochemicals of four cultivars from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.)." *Food Chem* **211**: 845-852.
- Shirzad, H., et al. (2011). "Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice." *J Med Food* **14**(9): 969-974.
- Siegel, R., et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.
- Song, M. y E. Giovannucci (2016). "Preventable Incidence and Mortality of Carcinoma Associated With

- Lifestyle Factors Among White Adults in the United States." *JAMA Oncol* **May 19**(May 19): E1-E8.
- Sparling, A. S., et al. (2016). "Is distance to chemotherapy an obstacle to adjuvant care among the N.C. Medicaid-enrolled colon cancer patients?" *J Gastrointest Oncol* **7**(3): 336-344.
- Stanisavljević, N. S., et al. (2016). "Identification of Phenolic Compounds from Seed Coats of Differently Colored European Varieties of Pea (*Pisum sativum* L.) and Characterization of Their Antioxidant and In Vitro Anticancer Activities." *Nutr Cancer*: 1-13.
- Tsuchiya, H. (2015). "Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants." *Molecules* **20**(10): 18923-18966.
- Verma, A. M., et al. (2011). "Pharmacological Screening of *Annona cherimola* for Antihyperlipidemic Potential." *J Basic Clin Pharm* **2**(2): 63-69.
- Viveros-Valdez, E., et al. (2015). "Biological activities of *Morus celtidifolia* leaf extracts." *Pak J Pharm Sci* **28**(4): 1177-1180.
- Xu, W., et al. (2012). "γ-Tocotrienol inhibits cell viability through suppression of β-catenin/Tcf signaling in human colon carcinoma HT-29 cells." *J Nutr Biochem* **23**(7): 800-807.
- Yadav, B. S., et al. (2016). "Antioxidant activity of various extracts of selected gourd vegetables." *J Food Sci Technol* **53**(4): 1823-1833.