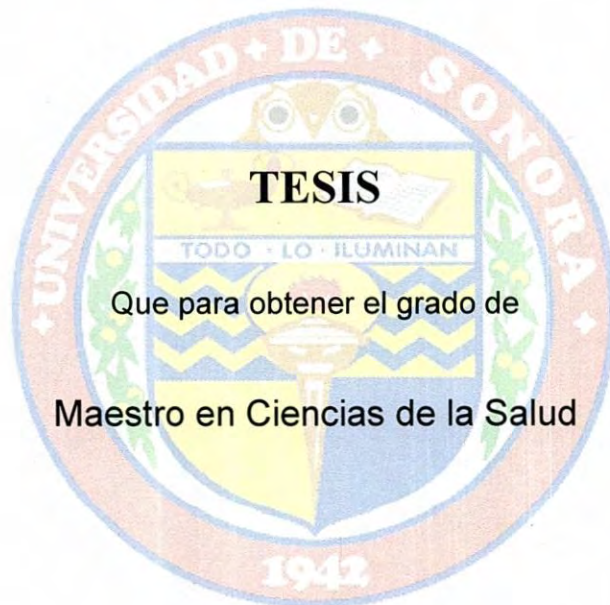


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Identificación de Compuestos con Actividad Antiproliferativa de
Argemone gracilentia



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Mario Alberto Leyva Peralta

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

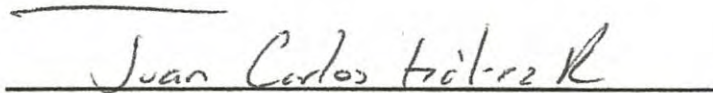


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena obtenidos de plantas de la etnofarmacopea sonorenses” (clave 83462).

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Mario Alberto Leyva Peralta**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



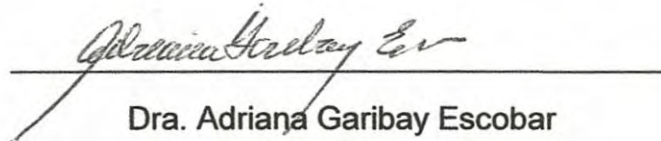
Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz

Director



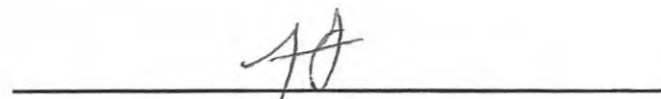
Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Secretario



Dra. Adriana Garibay Escobar

Vocal



Dr. Luis Fernando López Soto

Suplente

DEDICATORIAS

A mi madre y hermanos, por todo el cariño, apoyo incondicional y motivación que me han dado a lo largo de mi vida, ya que eso ha sido el motor que me impulsa a seguir adelante y alcanzar mis metas.

A mis sobrinas Myrsha, Alina y Kimberly, princesas hermosas ustedes son una gran alegría en mi vida.

A mis tíos y primos, por todo el apoyo y motivación que siempre me han brindado; muchas gracias por creer en mí .Dios los bendiga.

A mis abuelos, José y Nachita, gracias por todo el amor y cariño que nos brindaron en vida.

A mis grandes amigos y compañeros Fer , Lupita, Lydía, Lily y Sergio, muchas gracias por su amistad incondicional, por todos sus consejos y por apoyarme siempre en esta gran etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por adoptarme durante todos estos años, por brindarme todas las herramientas y conocimientos para mis estudios de posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico y hacer posible realizar la maestría.

Al Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz, mi director de tesis, le agradezco enormemente por todo su apoyo incondicional, paciencia, consejos, conocimientos, por permitirme ser parte de su equipo y brindarme su amistad. Gracias por tener fe en mí. Me siento muy contento y orgulloso de ser parte de esto.

A mi comité sinodal, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, Dra. Adriana Garibay Escobar y Dr. Luis Fernando López Soto, les agradezco por la disponibilidad, su paciencia, apoyo y por brindarme las herramientas necesarias y la correcta dirección para salir adelante.

Al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por su excelente labor como coordinador del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud. A la QB Denia Abril Montes por su gran trabajo como Asistente Administrativo del Posgrado en Ciencias de la Salud, por su apoyo, paciencia y su siempre disposición de ayudarnos.

A la Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, por brindarme un espacio para realizar una estancia en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Estoy muy agradecido por todos los conocimientos transmitidos y por el apoyo recibido en la parte química de este trabajo.

A las maestras Judith Valdez y Lucila Rascón, por su apoyo, por brindarme un espacio en el laboratorio y las herramientas necesarias para sacar adelante mi trabajo de tesis. Gracias por su amistad y siempre hacerme sentir bienvenido.

Agradezco enormemente a todos mis amigos y compañeros del laboratorio Dora, Lily, Sergio, Ana Laura, Heriberto, Wenceslao, Diego, Luisa, Efraín, Mariana, Jael, Paola, Samuel, Lucía, Lulú, Gloria, Alejandra, Ericka, Luis Fernando, muchas gracias por apoyo incondicional, cariño y amistad, por darme la oportunidad de conocerlos y permitirme ser parte de este gran grupo de personas. Les deseo lo mejor y Dios los bendiga.

Muchas gracias Milagros (Mily), por tu siempre disposición y apoyo para ayudarnos con los análisis de RMN en el Departamento de Polímeros. Te deseo lo mejor, Dios te bendiga.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xii
General	xii
Particulares	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Cáncer	3
Productos Naturales	5
Medicina Natural	6
Aspectos Generales del Metabolismo en Plantas	7
Metabolitos Secundarios	9
Terpenos	13
Compuestos Fenólicos	13
Glicósidos	14
Alcaloides	14
Medicina Tradicional Mexicana	16
Herbolaria Sonorense	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Material Vegetal	19
Obtención del Extracto	19
Obtención de las Fracciones	19
Extracción de Alcaloides	20
Método A	20
Método B	20

Actividad Antiproliferativa	20
Líneas Celulares	20
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa	21
Perfil Fitoquímico	22
Identificación de Flavonoides	22
Identificación de Saponinas	22
Identificación de Taninos	23
Identificación de Quinonas	23
Identificación de Cumarinas	24
Identificación de Alcaloides	24
Identificación de Emoides	25
Purificación Química	25
Cromatografía en Columna con Vacío	25
Cromatografía en Capa Fina (TLC)	26
Eliminación de Clorofilas	26
Identificación y Caracterización de Compuestos	26
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	26
Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas	27
Análisis Estadístico	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa	28
Perfil Fitoquímico	36
Extracción de Alcaloides	38
Actividad Antiproliferativa de las Subfracciones de la Cromatografía en Columna	44
Cromatografía en Columna de la Fracción Hexánica	44
Cromatografía en Columna de la Fracción Acetato de Etilo	46
Caracterización de los Compuestos con Actividad Antiproliferativa Presentes en <i>Argemone gracilentia</i>	51

CONCLUSIONES	72
Recomendaciones	73
BIBLIOGRAFIA	74
ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Actividades biológicas reportadas para los distintos grupos de metabolitos secundarios	12
II	Actividad antiproliferativa (IC_{50}) del extracto metanólico y fracciones de <i>Argemone gracilentia</i>	29
III	Perfil fitoquímico del extracto metanólico de <i>Argemone gracilentia</i>	37
IV	Actividad antiproliferativa de las muestras obtenidas en la extracción de alcaloides: M2 y M15	41
V	Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas de <i>Argemone gracilentia</i>	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías de síntesis de los principales metabolitos secundarios	8
2	Ejemplos de los principales grupos de metabolitos secundarios	11
3	Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena M12.C3F6, cambios morfológicos	30
4	Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena RAW 264.7, cambios morfológicos	32
5	Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena HeLa., cambios morfológicos	33
6	Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena L-929., cambios morfológicos	34
7	Método A de extracción de alcaloides	39
8	Método B de extracción de alcaloides	42
9	Purificación de la muestra FAg-7	45
10	Actividad antiproliferativa de las subfracciones cromatográficas de la fracción hexánica de <i>Argemone gracilenta</i> sobre la línea celular M12.C3F6	47
11	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 de la muestra FAg-7A	52
12	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 de la muestra FAg-7A	53
13	Espectro de HSQC en CDCl_3 de la muestra FAg-7A	55
14	Espectro de RMN de ^1H de berberina	57

15	Estructuras 2D de los alcaloides A) berberina, B) sanguinarina y C) argemonina	60
16	Vías que conducen a la muerte celular	62
17	Actividad antiproliferativa del alcaloide argemonina (FAg-7A)	63
18	Agrupamiento de las muestras de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Argemone gracilenta</i> basándose en la monitorización por TLC	65
19	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de la muestra FAg-1 de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Argemone gracilenta</i>	67
20	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de la muestra FAg-4A de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Argemone gracilenta</i>	68
21	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de la muestra FAg-5B de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de <i>Argemone gracilenta</i>	69
22	Actividad antiproliferativa las fracciones de ácidos grasos	71

OBJETIVOS

General

Identificar los compuestos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone gracilenta* sobre las líneas celulares M12.C3F6, RAW 264.7, HeLa y L-929.

Particulares

- Determinar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y fracciones de *Argemone gracilenta* sobre las líneas celulares M12.C3F6, RAW 264.7, HeLa y L-929.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de las subfracciones obtenidas de la fracción más activa del extracto metanólico de *Argemone gracilenta*.
- Analizar la composición química de las fracciones obtenidas por cromatografía por medio de GC-MS, espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

RESUMEN

El cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, causando la muerte de millones de personas y se estima que esta cifra irá en aumento. Los tratamientos que se han desarrollado para el cáncer no han tenido el resultado esperado y existe el interés por encontrar compuestos principalmente derivados de plantas, con una elevada especificidad sobre células cancerosas. Dentro de la etnofarmacopea sonoreense, se encuentran especies del género *Argemone*, en las cuales se ha demostrado que contienen compuestos con actividad antiproliferativa. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de la especie vegetal *Argemone gracilentia*, siendo la fracción acetato de etilo, derivada del extracto metanólico, la de mayor actividad. De la fracción acetato de etilo se obtuvieron cinco subfracciones con actividad antiproliferativa frente a las diferentes líneas celulares: FAg-1, FAg-4A, FAg-5B, FAg-7A y FAg-7B. La subfracción FAg-7A fue identificada como el alcaloide argemonina y presentó la mayor actividad antiproliferativa con valores de IC_{50} sobre la línea celular M12.C3F6 de $2.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$, en RAW 264.7 de $2.5 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$, en HeLa de $12.1 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$, y en la línea celular normal L-929 una IC_{50} mayor de $100 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados representan los primeros estudios de actividad antiproliferativa del alcaloide argemonina. La subfracción FAg-7B, fue identificada como el alcaloide berberina. Las subfracciones FAg-4A y FAg-5B, también presentaron actividad sobre las diferentes líneas celulares y están compuestas por una serie de ácidos grasos. Este estudio representa uno de los primeros resultados de actividad antiproliferativa de la planta *A. gracilentia*, catalogándola como una especie prometedora para la obtención de compuestos con potencial actividad contra el cáncer.

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades considerada como un problema de salud pública y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial ha sido el cáncer. Esta enfermedad ha causado la muerte de millones de personas en el mundo y se estima que el número de defunciones irá en aumento proyectándose 13.1 millones de nuevos casos para el 2030. Durante el periodo de 2004-2010, en datos mostrados por la Secretaría de Salud de nuestro país, el cáncer ocupó la tercera causa de muerte, encontrándose el estado de Sonora entre los diez primeros estados con mayor mortalidad por cáncer (INEGI, 2012).

Se han desarrollado muchos tratamientos contra esta enfermedad, todos con el potencial para combatir la proliferación de las células cancerosas; siendo la cirugía, la radioterapia y quimioterapia los más utilizados. Sin embargo, muchos de estos tratamientos contra el cáncer no han tenido el efecto esperado en la clínica, presentando efectos secundarios en las personas que son sometidos a éstos. Es por estas razones que es muy importante encontrar compuestos terapéuticos con una elevada especificidad contra células cancerosas y que presenten menos (o ningún) efectos secundarios de los que presentan los medicamentos actuales (Schaefer y col., 2010).

Uno de los medios o prácticas que han sido tomados en cuenta para este fin, es el uso de la medicina natural, principalmente la medicina a base de hierbas. La práctica de la medicina natural es muy antigua, es un conocimiento que ha ido pasando de generación en generación, y es uno de los principales recursos que nuestros antepasados utilizaban para curar cualquier padecimiento (Rodríguez y col., 2002). Actualmente, los estudios han demostrado que compuestos denominados metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales tienen propiedades biológicas muy variadas, tales

como: antiinflamatoria, antimicrobiana, antimicótica, anticancerígena, antioxidante, entre otras.

México es considerado como un gran proveedor de estos recursos naturales, siendo catalogado Sonora como un gran reservorio de plantas medicinales (Johson y col., 1996). Dentro del gran ecosistema sonoreño, podemos encontrar especies de plantas del género *Argemone*. *Argemone mexicana*, *ochroleuca* y *pleiacantha* poseen propiedades medicinales (antibióticos, antiinflamatorios y antitumorales) y de este género se han identificado y caracterizado compuestos de tipo alcaloide como los responsables de estas actividades biológicas (Becerra, 2011; Carrasco, 2012). Por lo anterior, en este trabajo se aborda el estudio de la especie vegetal *Argemone gracilentia*, una planta que crece en el estado de Sonora y que ha sido poco estudiada, como una alternativa medicinal contra el cáncer.

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer constituye un grupo de enfermedades que han afectado a los seres humanos desde tiempos ancestrales. Existen registros de cáncer en los huesos en momias egipcias del año 1600 a.C.; incluso, se tiene registro del tratamiento paliativo que se proporcionaba y de la falta de cura ante la enfermedad (Lugones y col., 2009).

Las causas de mortalidad en el mundo varían de acuerdo con las diferentes circunstancias de cada nación, no obstante, el cáncer es actualmente una de las más importantes. La OMS estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante el 2008 fue por cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. A nivel mundial se estima, que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año y que el número de casos nuevos de cáncer aumentará a 13.1 millones para el 2030 (INEGI, 2012).

En América Latina, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante el periodo 2007-2009 la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de alguna neoplasia maligna fue de 110.47 muertes por cada 100 mil habitantes. Las tasas más altas se ubicaron en Uruguay (168.4), Cuba (143.3) y Perú (136.6); en contraste, México presentó la tasa más baja (75.4) (INEGI, 2012).

Según la Secretaría de Salud, en el periodo del 2004-2010 el cáncer representó la tercera causa de muerte a nivel nacional, ocupando el estado de Sonora el décimo lugar en mortalidad por esta enfermedad. En Sonora, el cáncer representó durante este periodo la principal causa de muerte (SINAIS, 2012).

En esta enfermedad se produce un crecimiento anormal y desordenado de las células. La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide en más células a mayor velocidad que el resto de los tejidos a los que pertenece, sin cumplir las funciones para las que ha sido creada. Existen muchas formas en la que se presenta la enfermedad, una característica muy común en todas las formas de cáncer es una falla en los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (Quezada, 2007). Se proponen seis alteraciones de las células que marcan su potencial canceroso, que son: 1) señales de crecimiento muy activas; 2) evaden la apoptosis; 3) pérdida de la capacidad de respuesta a las señales de anti-crecimiento; 4) liberan sustancias al medio promoviendo la vascularización de tejidos; 5) invasión de tejidos y órganos y 6) crecimiento replicativo ilimitado (Douglas y col., 2000).

Este crecimiento anormal de las células puede llegar a formar masas de tejidos llamadas tumores. Existen tumores benignos y malignos. Los tumores malignos se conocen por su capacidad de invadir y destruir tejidos y órganos tanto circundantes como los que están lejos del tumor original. La muerte se produce cuando la propagación del cáncer daña los tejidos y los órganos vitales como el hígado, los pulmones o el cerebro, entre otros, de tal manera que estos órganos dejan de funcionar progresivamente (Camargo y col., 2004).

En general, el cáncer no se origina por una sola causa sino que operan múltiples factores; por eso se dice que el cáncer es una enfermedad multifactorial. De manera amplia, las causas del cáncer se clasifican en dos categorías: internas o externas. Las causas internas se conocen como una predisposición genética, es decir, que en ciertas familias se hereda un gen anormal que hace que sus miembros presenten una alta posibilidad de desarrollar cáncer. En la actualidad se sabe que la mayoría de los cánceres son ocasionados por causas externas, es decir, por exposiciones a sustancias

químicas o agentes físicos o biológicos que afectan los genes de las células, transformándolas en cancerosas (Schaefer y col., 2010).

El desarrollo de tratamientos para el cáncer ha sido espectacular. Se han preparado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas. Sin embargo, muchos de estos medicamentos no tienen el efecto esperado en la clínica debido a la complejidad de la enfermedad. El principio de acción de la mayoría de estos tratamientos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con la célula sana, por lo que los compuestos utilizados también ocasionan la muerte de las células no cancerosas (Schaefer y col., 2010). Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente en la cirugía, la radiación y la quimioterapia.

La quimioterapia es uno de los tratamientos más utilizados y ampliamente estudiados en terapias contra el cáncer. Sin embargo, una de las preocupaciones principales de este tratamiento con respecto a su eficiencia y seguridad, es la manifestación de toxicidad y efectos secundarios graves. Por otra parte, la multirresistencia hacia los medicamentos contra el cáncer es un desafío aún mayor. Así, los diferentes tipos de cáncer han ido desarrollando resistencias contra los fármacos utilizados para combatir esta enfermedad (Umthong y col., 2011).

Productos Naturales

Cuando se habla de productos naturales normalmente se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtienen de plantas, generalmente de aquellos que tienen un uso medicinal o nutricional. Particularmente, se les llama productos naturales a los metabolitos secundarios obtenidos de organismos vivos tales como bacterias, algas, hongos, animales y vegetales. La sabiduría popular conoce, de manera empírica, las cualidades curativas de muchas plantas de su medio y, a través del tiempo, ha estimulado a la ciencia para

descubrir los principios activos de especies naturales lo que ha propiciado la elaboración de medicamentos (Pérez, 2006).

Es muy larga la lista de compuestos químicos vegetales auxiliares para diversos problemas de salud pública. Como ejemplo se tiene a la quinina que salvó cientos de miles de vidas en la primera mitad del siglo pasado y que ahora, se sintetiza, manteniendo libre de malaria a muchas zonas tropicales (Achan y col., 2011). Otro ejemplo es el taxol, alcaloide extraído de una especie de *Taxus* del noroeste de Estados Unidos que ha sido exitosamente utilizado en el tratamiento de fases avanzadas del cáncer ovárico (Pérez, 2006).

Medicina Natural

La medicina natural surgió desde tiempos inmemorables y se ha ido transmitiendo a través de varias generaciones hasta la actualidad. Para algunos, la medicina natural y tradicional está constituida por un conjunto de prácticas y medicamentos, susceptibles de explicación o no, utilizados para prevenir, diagnosticar y eliminar los desequilibrios físicos, mentales o sociales que se basan principalmente en la experiencia y la observación práctica transmitida de generación en generación, oralmente o por escrito (Rodríguez y col., 2002). Desde la antigüedad hasta los tiempos modernos, las plantas han sido utilizadas como agentes medicinales. Durante miles de años, los seres humanos han utilizado sustancias naturales, especialmente plantas para aliviar el dolor, curar heridas y mantener la salud (Zong-Fang y col., 2009).

La herbolaria hace referencia tanto al conocimiento como al uso terapéutico de plantas cuyos componentes activos son utilizados en el tratamiento de enfermedades, así como de la dosis que debe emplearse. Así mismo, se refiere al estudio científico de plantas reconocidas en la medicina tradicional (Killiam, 2006). La farmacognosia se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como sus derivados que

podieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial. No sólo se enfoca al estudio de sustancias con efectos terapéuticos, sino también de moléculas que sirvan como modelo estructural para la síntesis de nuevos compuestos más potentes (Cortez y col., 2004). La OMS acordó promocionar la medicina natural y establecer pautas para la identificación de medicamentos herbarios que sean inocuos y eficaces (Killiam, 2006).

El consumo mundial de productos naturales, incluidos las plantas medicinales, se ha convertido en una parte primordial en la salud, especialmente en los países en desarrollo. Muchas investigaciones farmacognósicas y farmacológicas se llevan a cabo para identificar nuevos fármacos o para encontrar bases estructurales para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas como el cáncer y enfermedades infecciosas. En los países desarrollados un gran segmento de la población todavía confía en la medicina popular para tratar enfermedades graves, incluidas el cáncer (Raniza y col., 2009).

El estudio de la diversidad biológica de plantas y sus usos tradicionales como medicina, puede conducirse a comprender como actúan y confirmar el uso de estos recursos naturales para el desarrollo futuro de medicamentos en base a la fitoterapia. Debido a que las plantas medicinales continúan siendo utilizadas en tratamientos para diversas enfermedades y padecimientos, es importante documentar sus usos y llevar a cabo estudios confirmatorios farmacológicos correspondientes a la actividad biológica que tienen, para de esta manera, fundamentar su eficacia y seguridad (Andrade-Cetto, 2008).

Aspectos Generales del Metabolismo en Plantas

Todas las células vegetales llevan a cabo procesos metabólicos comunes esenciales para la vida de la planta. Estos procesos constituyen el metabolismo primario. Además del metabolismo primario, se desarrollan rutas que convergen en la formación de compuestos denominados metabolitos secundarios (Fig. 1).

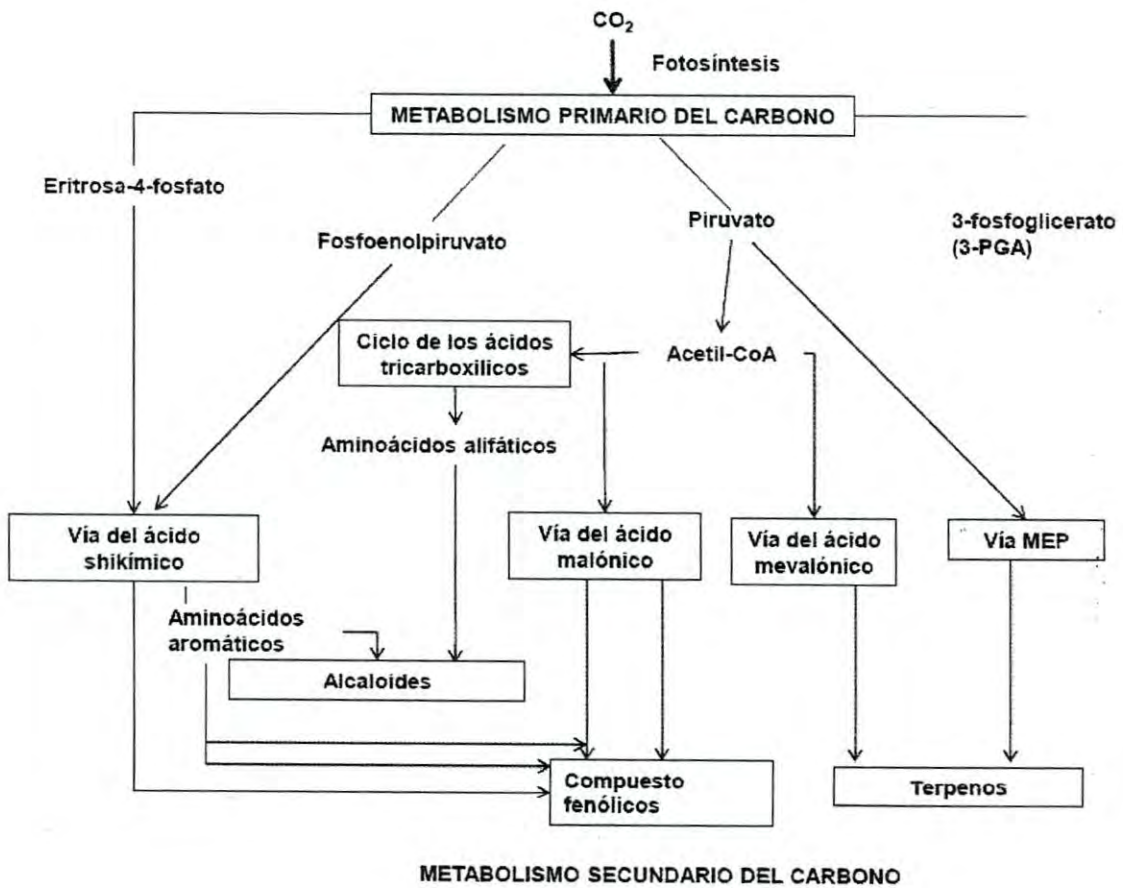


Figura 1. Vías de síntesis de los principales metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados (alcaloides) (García, 2004).

Se le denominan metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos que cumplen funciones no esenciales en ellas, la mayoría de estos no intervienen en el metabolismo primario, pero les confiere claras ventajas selectivas interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y el medio ambiente. Muchos de estos metabolitos pueden ser secretados dentro de las células, en vacuolas, o excretados extracelularmente como resinas o material de la pared celular (Valares, 2011).

Las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y déficit de agua, puede restringir el crecimiento de la planta y reducir la velocidad fotosintética. En tales condiciones, carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensa basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario. La confirmación de este balance en carbono/nutrientes ha sido encontrada en especies que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de nutrientes o de agua, en las que se produce un aumento en la concentración de taninos condensados, lignina, fenoles y/o glicósidos de fenoles (Bryant y col., 1995).

Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas pertenecientes a un grupo muy diverso de productos naturales sintetizados por plantas, bacterias, hongos, algas y animales. Las plantas tienen rutas metabólicas que les permite sintetizar una serie de metabolitos secundarios, a menudo en respuesta a un estímulo ambiental específico, tales como un daño inducido por un herbívoro, por infecciones o por privación de nutrientes (Dickschat, 2011). Estos compuestos son sintetizados a partir de metabolitos primarios tales como carbohidratos, lípidos y aminoácidos. La producción de éstos a menudo es baja (menos del 1% de peso seco) y depende en gran medida del estado fisiológico y desarrollo de la planta (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011).

Estos compuestos no tienen un papel directo en las necesidades metabólicas primarias (por ejemplo, fotosíntesis), sino que le proporcionan a la planta la capacidad de sobrevivir y superar los factores locales permitiéndoles interactuar con el medio ambiente para la adaptación y su defensa. Le ayudan a las plantas a defenderse contra microorganismos tales como bacterias, hongos y virus, contra herbívoros, así como también a adaptarse a los cambios climáticos específicos para cada región (Agustini-Costa y col., 2012). Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Compuestos como los pigmentos proporcionan color a las flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo insectos polinizadores. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a las plantas sabor amargo, haciéndolas indigestas o venenosas (Ávalos y Pérez, 2009).

Una simple clasificación de los metabolitos secundarios incluyen los principales grupos (Fig. 2): terpenos (tales como glucósidos cardiotónicos, carotenoides, compuestos volátiles y esteroides), compuestos fenólicos (tales como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides y taninos) y compuestos que contienen nitrógeno (tales como alcaloides y glucosinolatos) (Agustini-Costa y col., 2012).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan del metabolismo primario del carbono. La mayoría de estos metabolitos tienen un importante y significativo valor medicinal, estos compuestos han demostrado tener propiedades benéficas contra una gran variedad de padecimientos humanos, y dentro de las funciones que presentan los metabolitos secundarios están propiedades antioxidantes y como agentes antiproliferativos (Tabla I) (Kennedy y Wightman, 2011).

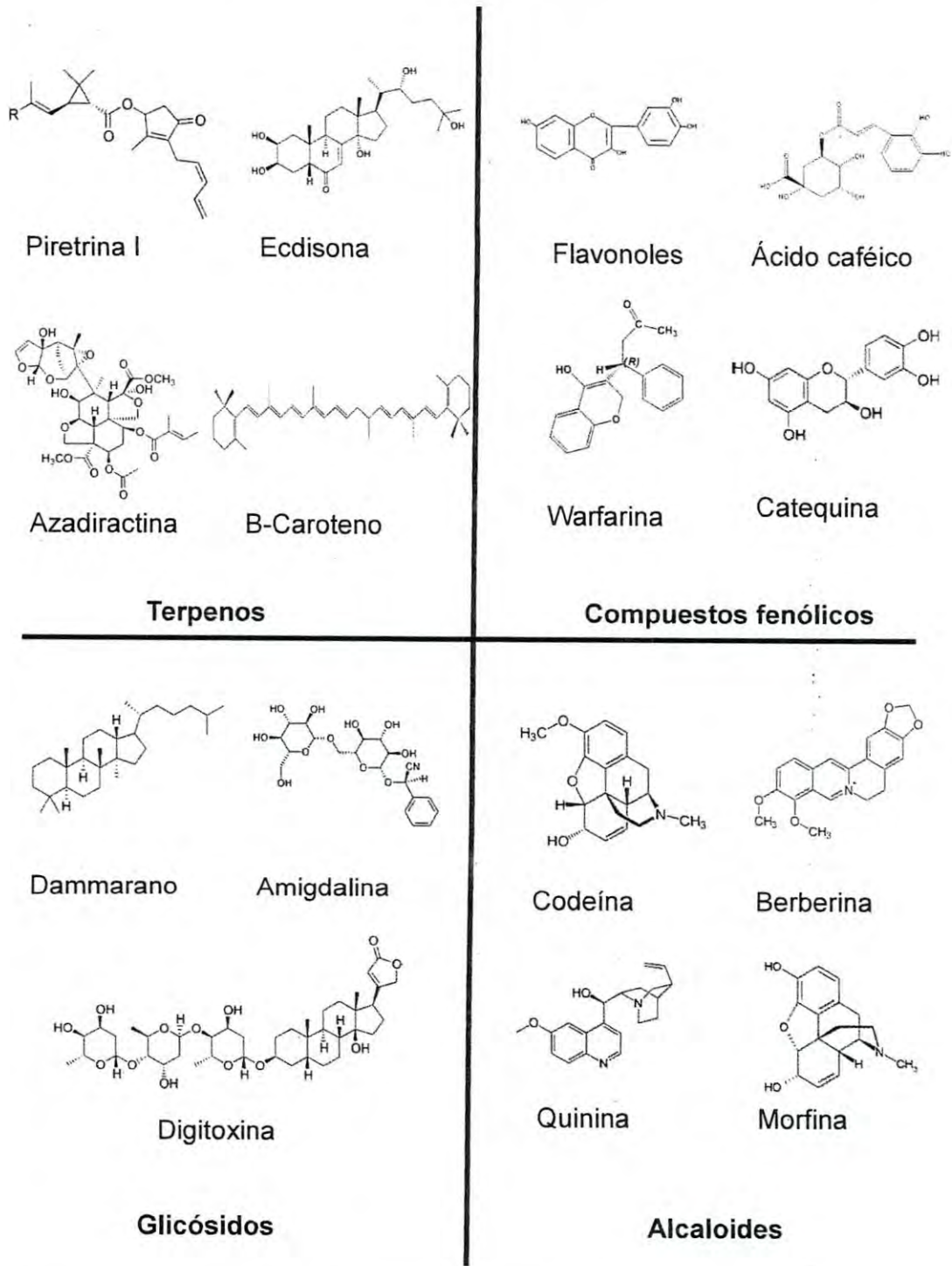


Figura 2. Ejemplos de los principales grupos de metabolitos secundarios (Croteau y col., 2000).

Tabla I. Actividades biológicas reportadas para los distintos grupos de metabolitos secundarios.

Tipo de compuestos	Actividad biológica	Referencia
Terpenos	Antiinflamatoria	Akihisa y col., 2010
	Anticancerígena	Cichewiz y col., 2004
	Antibacteriana	Potacka, 2003
	Antimalarial	
	Antiviral	
	Antifúngica	
	Antioxidante	
	Antifúngica	
	Antimicrobial	
	Anticancerígena	
Compuestos fenólicos	Enfermedades coronarias	Manosroi y col., 2010
		Pavlovic y col., 2012
		Rauha, 2001
		Walter y col., 2011
Glicósidos	Diabetes	
	Antioxidante	Nocito y col., 2002
	Antiparasitaria	Devus y col., 2009
	Antimicrobiana	Martinez. 2001
	Antiinflamatoria	Wahid y col., 2011
	Anticancerígena	
	Anticancerígena	
	Antibacterial	
	Antifúngica	
	Antiparasitaria	
Alcaloides		Nagappan y col., 2011
		Kucukboyanc y col., 2010
		Kouznetsov y col., 2004

Terpenos

Los terpenos o terpenoides son la familia más grande y diversa de productos naturales. Todos se sintetizan a través de la condensación de unidades de isopreno (C₅), y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno: los monoterpenos (10 C) incorporan 2 unidades de isopreno; sesquiterpenos (15 C) incorporan 3 unidades, diterpenos (20 C) comprenden 4 unidades; los triterpenos incorporan 6 unidades y tetraterpenos 8 unidades de isopreno. Como un grupo amplio, los terpenos exhiben una gama de funciones entre ellas funciones ecológicas, que incluyen propiedades antimicrobianas y una serie de propiedades que atraen simbiosis a los efectos de polinización, dispersión de semillas, y las funciones de protección secundarios (Crozier y col., 2006).

La ruta biosintética de estos compuestos da lugar a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los compuestos de este tipo se encuentran las hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofila y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración), derivados de esteroides (glicósidos cardiotónicos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y sabor característicos de las plantas (Ávalos y Pérez, 2009).

Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, con más de 10000 compuestos identificados. Estructuralmente, comparten por lo menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos (-OH) unidos. En la gama de compuestos fenólicos se encuentran compuestos simples de bajo peso molecular como los fenilpropanoides, cumarina y los derivados del ácido benzoico; compuestos de estructura compleja como flavonoides, estilbenos y taninos. De éstos, los flavonoides representan el grupo más grande y diverso dentro de los compuestos fenólicos, abarcando más de 9000 compuestos

caracterizados en plantas (Adel-Lateif y col., 2012). Los flavonoides se dividen en chalconas, flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas y antocianinas (Crozier y col., 2006). Tienen un papel muy importante en el sistema de defensa de la plantas contra las plagas y enfermedades, incluyendo nemátodos y parásitos (Wuyts y col., 2006).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Croteau y col., 2000). La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos en plantas (Croteau y col., 2000).

Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa en otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos y Pérez, 2009).

Alcaloides

Los alcaloides son un grupo estructuralmente diverso de más de 12000 compuestos encontrados en más del 20% de las especies de plantas (Agustini-Costa y col., 2012). Estos compuestos contienen uno o más átomos de nitrógeno heterocíclico, derivados de pocos aminoácidos comunes, en particular ácido aspártico, lisina, tirosina y triptófano (Mazid y col., 2011). Aunque no existe una única clasificación, los alcaloides se distinguen sobre la base de su similitud estructural o un precursor común, por ejemplo bencilisoquinolina,

tripano, pirrolizidina o alcaloides de purina. En general, estos compuestos llegan a ser tóxicos en alguna medida y parecen, en primer lugar, contribuir en la defensa contra infecciones por microorganismos y ataques de herbívoros (Kennedy y Wightman, 2011).

Los alcaloides se asocian con una amplia gama de actividades farmacológicas. Algunos tienen actividades antibióticas y otros interfieren con patrones de comportamiento, como los antidepresivos y alucinógenos. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen valores terapéuticos como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Agustini-Costa y col., 2012).

A nivel celular, el mecanismo de acción de los alcaloides en los animales es bastante variable. Algunos interfieren con los componentes del sistema nervioso, especialmente transmisores químicos, afectando la membrana, la síntesis de proteínas y actividades de diversas enzimas. La diversidad estructural y variedad en la actividad biológica, hacen de los alcaloides, como también de los antibióticos, los grupos más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico (Ávalos y Pérez., 2009).

Estos compuestos han sido aislados principalmente de plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de fanerógamas, en menor proporción en criptógramas del tipo licopodios, microorganismos y animales, peces y sapos. Su actividad biológica a nivel sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas (Mazid y col., 2011)

Medicina Tradicional Mexicana

Las sociedades prehispánicas desarrollaron una tecnología capaz de lograr la supervivencia y el crecimiento de la población; el aprovechamiento de los recursos naturales, vegetales, animales y minerales (Rojas, 2009).

La medicina tradicional mexicana se define como la medicina que tiene raíz en la que practicaron los *mexicas*, una de las siete tribus nahuatlacas que poblaron la región mesoamericana, también abarca la medicina tradicional que subsiste hoy en México, un conocimiento que ha ido trascendiendo a través del tiempo y que también abarca la cultura del resto del continente americano (Rojas, 2009).

La medicina tradicional a base de plantas es una práctica recurrente principalmente entre los pueblos indígenas, que tiene sus raíces en profundos conocimientos sobre la salud y la enfermedad que han acumulado a través de la historia, fundamentados en una interpretación del mundo, de la salud y enfermedad de origen prehispánico, que ha incorporado elementos provenientes de otras medicinas, como la antigua medicina española, la medicina africana y en menor medida por la interacción con la medicina occidental (Rojas, 2009) .

El uso de plantas bajo la forma de extractos o infusiones son extensamente empleados para tratar una amplia gama de padecimientos; infecciones gastrointestinales, respiratorias, urinarias y de la piel (Navarro y col., 1996). Actualmente, los estudios científicos han demostrado otras propiedades biológicas en un gran número de plantas medicinales, tales como antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, entre otras, y más recientemente anticancerígena.

Según la OMS, alrededor del 90 % de la población mexicana hace uso de las plantas medicinales para curar algún padecimiento (Muñetón, 2009). Se dice que en México existen 4500 plantas medicinales registradas, de las cuales sólo

el 5% se ha estudiado y caracterizado su principio activo (Schaefer y col., 2010). En México, los conocimientos sobre la herbolaria se han transmitido en la población de generación en generación.

Herbolaria Sonorense

En el estado de Sonora se encuentra una gran variedad de especies de plantas, muchas de las cuales son utilizadas popularmente como remedio para una gran cantidad de padecimientos. Pocos de estos usos populares han sido validados científicamente, en este sentido es necesario investigar y descubrir las especies que cuentan con una actividad biológica. En Sonora muchas de estas plantas crecen en estado silvestre, lo que hace, que el estado sea un gran reservorio de plantas medicinales.

En Sonora, el conocimiento y el uso de las plantas medicinales se han mantenido y la comunidad sonorense usa en gran medida las diferentes especies de plantas medicinales para mantener la salud. Entre los grupos indígenas que podemos encontrar en Sonora están los Yaquis, Mayos, Pimas, Guajiros, Pápagos y Seris (López, 1988). El número de especies y plantas que se están utilizando por los diferentes grupos étnicos y la población sonorense es muy grande e incluyen algunas plantas que no existieron en el nuevo mundo antes de la conquista (Johnson y col., 1996).

Dentro de la herbolaria sonorense se han encontrado algunas especies de plantas con propiedades anticancerígenas, entre las que podemos destacar algunas especies del género *Argemone* (López, 1988). Dentro de este género se encuentran *A. mexicana*, *A. ochroleuca*, *A. pleiacantha*, *A. subfusiformi*; las cuales en estudios previos se han encontrado una gran gama de propiedades medicinales, entre las que destacan propiedades antibióticas, anti-inflamatorias y antitumorales (Indranil, 2006). Dentro de este género se ha reportado que contienen compuestos de tipo alcaloide de isoquinolona incluyendo

sanguinarina (Devi, 2002) un compuesto al cual se le atribuye un fuerte efecto sobre el proceso de inducción de apoptosis (Park y col., 2010). En estudios realizados al género *Argemone*, principalmente en *A. ochroleuca* (Becerra, 2011) y *A. pleiacantha* (Carrasco, 2012), se ha encontrado que poseen propiedades antiproliferativas. La especie *Argemone pleiacantha* mostró muy buena actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena M12.C3F6, siendo las fracciones, hexánica y acetato de etilo, las que presentaron mayor actividad (Leyva, 2010). Estudios fitoquímicos realizados por Yuh-Chewen y col., 2003, sobre la especie *Argemone mexicana*, encontraron 15 compuestos de tipo alcaloide que presentaron citotoxicidad sobre las líneas celulares cancerígenas, específicamente de carcinoma nasofaríngeo y células de cáncer gástrico de humano.

Estudios biodirigidos en *Argemone ochroleuca* han demostrado que en esta especie se encuentran compuestos derivados de la queleritrina (Carrasco, 2010) y de la berberina (Becerra, 2011), alcaloides que le confieren la actividad antiproliferativa sobre varias líneas celulares cancerosas.

Arnold Brossi (1986) indicó que la especie *Argemone gracilenta*, que podemos encontrar en Sonora, contiene una serie de alcaloides con posible efecto terapéutico, similar a las especies de *Argemone* anteriormente mencionadas. Por lo anterior, es de gran interés realizar un estudio sobre esta especie presente en la región sonorensis, para determinar si posee propiedades similares a las otras especies del género *Argemone*, estudiadas en el grupo de trabajo, y que permitan el desarrollo de nuevas alternativas para la lucha contra el cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La planta *Argemone gracilenta* se recolectó en el municipio de Guaymas Sonora, coordenadas 28°05'57'' latitud norte y 111° 03'23'' longitud oeste, altura 150 metros, en mayo de 2011. La muestra recolectada fue llevada al herbario de la Universidad de Sonora donde fue identificada (No. Catalogo: 08274) por el Ing. José Jesús Sánchez Escalante, taxónomo de la Universidad de Sonora.

Obtención del Extracto

La planta se secó a temperatura ambiente y se homogeneizó en un molino tipo Wiley con una malla de 2-3 mm. La planta homogeneizada se colocó en un recipiente de vidrio y se le adicionó metanol en relación 1:10 (p:v), el cual se mantuvo por un periodo de diez días con agitación periódica. Posteriormente, se filtró con papel filtro Whatman No. 4. El extracto metanólico se concentró hasta sequedad en un rotavapor a presión reducida y temperatura constante de 40°C (Leyva, 2010).

Obtención de las Fracciones

A partir del extracto metanólico, se obtuvieron fracciones con otros disolventes tales como hexano, acetato de etilo y etanol. Se realizaron tres lavados con 400 mL de cada uno de los solventes, con agitación constante por al menos 12 horas. El volumen de solvente obtenido (1200 mL) fue evaporado en un rotavapor para su concentración a una temperatura de 40°C. Después de este procedimiento se obtuvieron cuatro fracciones: hexánica, acetato de etilo, etánolica y residual. Se incluyó el extracto metanólico para los ensayos posteriores (Leyva, 2010).

Extracción de Alcaloides

Método A

Se disolvió parte del extracto metanólico en una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 5% para posteriormente pasarlo a un embudo de separación. Se lavó la muestra tres veces con hexano para eliminar las ceras y compuestos lipídicos. Posteriormente, se alcalinizó la muestra con hidróxido de amonio (NH_4OH) y se realizaron lavados con cloroformo (CHCl_3), separando la muestra disuelta en dos fases: orgánica y acuosa. Cada fase separada se concentró en rotavapor a presión reducida y 40°C de temperatura (Pereira y col., 2007).

Método B

Una parte del extracto metanólico se disolvió en una solución de metanol:agua (1:5, v/v) y se pasó a un embudo de separación. Después se realizaron tres lavados consecutivos con cloroformo (CHCl_3). Durante los lavados, la solución se separó en dos fases: orgánica y acuosa. Cada fase separada, se concentró en rotavapor a presión reducida y 40°C de temperatura (Yuh-Chwen y col., 2003).

Actividad Antiproliferativa

Líneas Celulares

Se emplearon las líneas celulares M12.C3F6 (linfoma de células B murino) y RAW 264.7 (macrófagos de murino transformados por el virus de la leucemia de Abelson) las cuales fueron donadas por el Dr. Emil R. Unanue (Departamento de Patología e Inmunología, Universidad Washington, St. Louis MO, USA); HeLa (cáncer cervicouterino) y la línea celular normal L-929 (tejido conectivo) fueron adquiridas de ATCC (American Type Collection, Rockville, MD, USA).

Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5% con suero fetal bovino a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

Para la evaluación de la actividad antiproliferativa de *Argemone gracilenta*, se realizaron ensayos de proliferación celular, partiendo de cultivos en fase de crecimiento logarítmico, de la cual se obtuvo una suspensión celular con una concentración de 200,000 células/mL. Ésta fue distribuida en una placa de 96 pozos de fondo plano. A las 24 horas se les adicionó las fracciones de *Argemone gracilenta* a evaluar, utilizando concentraciones de 25 a 200 µg/mL para el extracto metanólico y sus fracciones, y concentraciones de 25 a 6.25 µg/mL para las subfracciones cromatográficas y las muestras obtenidas en la extracción de alcaloides. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y con sus respectivos controles.

Para medir la viabilidad celular, se utilizó el método de sales de tetrazolio (MTT). Este método se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas (reductasas), presentes en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración amarilla [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio], para reducirlo a cristales de formazán de color azul-púrpura. Dichos cristales son impermeables a la membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas. Los cristales de formazán resultantes se solubilizaron con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se leyó a 570 y 655 nm en un lector de ELISA (Velázquez y col., 2007). Se utilizaron los valores de absorbancia obtenidas en en ensayo de MTT para calcular el porcentaje de viabilidad celular.

Perfil Fitoquímico

Para realizar el perfil fitoquímico (Anexo 1) del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*, se utilizaron una serie de reacciones propuestas en el manual de productos naturales de Valencia del Toro y Garín del 2010. Este perfil fitoquímico indica la presencia de manera cualitativa de ciertos metabolitos secundarios como flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, alcaloides, cumarinas y emoides.

Identificación de Flavonoides

Para la identificación de flavonoides se disolvieron aproximadamente 0.5 g del extracto metanólico en 2 mL de etanol absoluto y se dividió en tres tubos. En el primer tubo se realizó la reacción de Shinoda, agregando al tubo 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado; una coloración roja es indicativo de la presencia de auronas o chalconas. En el caso de haber cambio, se coloca dentro del tubo un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja a roja, es indicativo de la presencia de flavonas; si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas. En el tubo 2, se realizó una reacción con solución de hidróxido de sodio al 10%, agregándole tres gotas de esta solución y si se forma una coloración amarilla a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas, de café a naranja de flavonoles, púrpura a rojizo de chalconas y azul de antocianinas. El tubo tres se utilizó como control negativo.

Identificación de Saponinas

La identificación de saponinas se realizó con el reactivo de Rosenthaler (Anexo 2). En un vidrio de reloj, se colocó una porción de extracto concentrado (aproximadamente 0.5 g) y se le adicionaron dos gotas del reactivo de Rosenthaler estratificado con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Después de 5 minutos, si se forma una coloración violeta, se considera positivo para saponinas.

Identificación de Taninos

Para la identificación de taninos, se tomó aproximadamente un gramo del extracto y se disolvió en 2 mL de agua destilada con 3 gotas de cloruro de sodio al 2%. Se calentó a ebullición durante un minuto, se dejó enfriar y se filtró. El filtrado se dividió en cuatro tubos. En el primero, se realizó la reacción de gelatina (Anexo 2), en la cual se agregaron 2 gotas de este reactivo, la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos. En el tubo número 2 se realizó la reacción de cloruro férrico, añadiendo al tubo una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloración azul a negro indica la presencia de derivados de ácido gálico y coloraciones verdes de derivados de catecol. Al tercer tubo, se agregó una gota de ferricianuro de potasio al 1% (Anexo 2), la formación de coloración azul, indica la presencia de compuestos fenólicos. El cuarto tubo se utilizó como control negativo.

Identificación de Quinonas

En la identificación de quinonas, se realizaron 3 reacciones principales. Primeramente se tomaron 2 g del extracto y se dividieron en 4 tubos. En el primer tubo se realizó una reacción adicionando una gota de hidróxido de amonio concentrado, considerándose positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los primeros dos minutos. En el segundo tubo, se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado, la formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas. En el tercer tubo se realizó la reacción de Borntraeger, diluyéndose el extracto con 3 mL de agua destilada, después se filtró la solución y al líquido filtrado se le añadieron 3 mL de cloroformo. La fase acuosa se

eliminó y, a la fracción clorofórmica se le adicionaron 2 mL de hidróxido de potasio al 5%. Un color rojo indica la presencia de benzoquinonas. Si es amarillo verdoso se le adiciona una gota de peróxido de hidrógeno al 6%; si la coloración cambia a rojo se considera positivo para derivados de antronas. El cuarto tubo se disolvió en agua destilada y fue considerado como control negativo.

Identificación de Cumarinas

Para la identificación de cumarinas se disolvieron 0.5 g del extracto en 1 mL de agua destilada hirviendo. Se aplicó con un capilar, 2 gotas separadas en papel filtro, a una de las manchas se le aplicó una gota de hidróxido de potasio 0.5 M. Se observó en una lámpara de luz UV a una longitud de 366 nm y la presencia de fluorescencia se considera positivo para este tipo de compuestos.

Identificación de Alcaloides

Para la identificación de alcaloides se realizaron dos reacciones para este tipo de compuestos. Primeramente se tomó una porción del extracto (aproximadamente un gramo) y se disolvió en 10 mL de una solución de ácido clorhídrico al 10% y se calentó a ebullición durante cinco minutos; se dejó enfriar y se filtró. Posteriormente, el filtrado se dividió en 3 tubos. En el primer tubo se realizó la reacción de Wagner (Anexo 2), agregando 2 gotas del reactivo del mismo nombre, considerándose positivo por la formación de precipitado color marrón. En el segundo tubo se realizó la reacción con el reactivo de Mayer (Anexo 2), agregando 2 gotas de dicho reactivo; se considera positiva la formación de un precipitado blanco. El tercer tubo se consideró como control negativo.

Identificación de Emoides

En la identificación de compuestos emoides se tomaron 0.5 g del extracto y se dividieron en dos tubos. En el primer tubo, el extracto se disolvió en 1 mL de hidróxido de amonio al 25%, si se observa una coloración rojiza, se considera positiva para este tipo de compuestos. El segundo tubo se consideró como control negativo, disolviéndose el extracto en agua destilada únicamente.

Purificación Química

Cromatografía en Columna con Vacío

El fraccionamiento se realizó por medio de una columna cromatográfica de vidrio (4.5 x 70 cm) utilizando como fase estacionaria 20 g de sílica gel 60 de 200-400 mesh, empacando la columna con una fase móvil inicial de hexano al 100%. Se disolvieron 4 g de la muestra en hexano y fue cargada a la columna. Como fase móvil se utilizaron diferentes solventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, metanol y agua) en distintas proporciones, iniciando con hexano (100 %) aumentando la polaridad gradualmente primero con acetato de etilo hasta llegar a la fase móvil metanol:agua, 80:20 (Fernandez, 2005).

De la fracción acetato de etilo, se sometieron 2 g de la muestra a columna cromatográfica, con 60 g de sílica gel. La muestra se disolvió en acetato de etilo y fue eluida en la columna utilizando como fase móvil diferentes proporciones de solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol), iniciando con la fase móvil diclorometano:hexano, 20:80, aumentando la polaridad gradualmente primero con diclorometano hasta llegar a la fase metanol (100 %) (Fernandez, 2005). A la columna se le aplicó vacío (25 bar, aproximadamente) con una bomba marca Marathon Electronic, para una rápida elusión de la muestra (Clark y col., 1978). Posteriormente, cada elusión fue monitorizada a

través de cromatografía en capa fina (TLC), y aquellas que presentaron un patrón similar en el desplazamiento de las bandas fueron agrupadas. Una vez agrupadas las eluciones, éstas se concentraron en un rotavapor a presión reducida y 40°C de temperatura.

Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La monitorización de las muestras se realizó a través de cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios de aluminio con una capa 0.20 mm de grosor de sílica gel 60 con un indicador fluorescente UV 254. La fase móvil varió utilizando solventes de distintas polaridades: hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, metanol. Las proporciones utilizadas fueron: hexano:acetato de etilo, 80:20, hexano:acetona, 90:10, 80:20 y 85:15, diclorometano:metanol 95:05, 90:10, 80:20 y 85:15.

Eliminación de Clorofilas

Un gramo de la muestra se disolvió en 100 mL de hexano y se le agregaron aproximadamente 500 mg de carbón activado. Una vez incorporado correctamente el carbón activado, se procedió a filtrar la muestra. El líquido filtrado se concentró en rotavapor a presión reducida y 40°C. La eliminación de clorofilas se monitorizó por TLC (Coronado, 2012).

Identificación y Caracterización de Compuestos

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de las muestras por RMN de protón (^1H) y carbono (^{13}C), y su bidimensional HSQC (correlación heteronuclear de coherencia cuántica simple), se realizaron en un equipo Varian Unity a 200 y 400 MHz de frecuencia (Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).

Algunos análisis de RMN (^1H y ^{13}C) se realizaron en un equipo Bruker Avance, a una frecuencia de 400 MHz (Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora). En los estudios de RMN se utilizaron cloroformo (CDCl_3) y metanol (CD_3OD) deuterados. Todos los desplazamientos químicos tuvieron como referencia tetrametilsilano (TMS).

Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS)

La identificación de las muestras de ácidos grasos, se hizo a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) usando un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 acoplado a un detector de masas (Agilent serie 5973N). Para cada subfracción de ácidos grasos, se prepararon 5 mg en 1 mL de disolvente respectivo (metanol o diclorometano). De esta solución se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases con técnica de ionización por impacto electrónico a 70 eV (Electrovoltios). Se usó una columna Agilent Technologies HP 5MS (25m X 0.2 mm x 0.33 μM). El gas acarreador fue helio a 1 mL/min flujo constante, con un programa de temperatura de 45 °C por un minuto con un incremento de 10 °C hasta 250 °C, manteniéndose así durante 20 minutos. Se trabajó modo Split 5:1 y con una línea de transferencia de masas a 280°C (Velocidad 37 cm/seg). El análisis de masas de cada una de las muestras fueron comparadas con el patrón de fragmentación de la biblioteca NIS versión 17.9 (2001), programa instalado en el sistema de cómputo del cromatógrafo.

Análisis Estadístico

Los datos de cada ensayo de actividad antiproliferativa fueron plasmados en gráficas de concentración/viabilidad celular utilizando el programa GRAPH PAD PRISM 3. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico de varianza (ANOVA) haciendo comparación de medias a través de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), por medio de la herramienta de análisis estadístico IBM® SPSS® Stastics 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

La evaluación de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y fracciones de *Argemone gracilenta*, se realizó empleando el método colorimétrico de sales de tetrazolio (MTT), utilizando diversas líneas celulares cancerosas y una línea celular normal como control. En este trabajo, se tomó en cuenta los criterios mostrados en el estudio realizado por Ríos y colaboradores (2008), donde proponen los rangos considerados para determinar el grado de actividad antiproliferativa del extracto y fracciones de plantas: <10 µg/mL se considera muy activo; >10 y < 50 µg/mL, se considera activo; >50 y < 100 µg/mL es considerado medianamente activo; y > 100 µg/mL no activo.

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiproliferativa sobre las diferentes líneas celulares, mostrando los valores de IC₅₀ para el extracto metanólico y sus fracciones. Las evaluaciones realizadas sobre la línea celular M12.C3F6, mostraron una mayor susceptibilidad a las fracciones hexánica y etanólica mostrando los valores de IC₅₀ menores (20.40 y 21.08 µg/mL, respectivamente), sin diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

En cuanto a las observaciones realizadas usando el microscopio invertido, 48 horas después de haber agregado el estímulo, se apreciaron algunos cambios morfológicos (Fig. 3). Se observó una gran cantidad de detrito celular, células vesiculadas, células con el núcleo condensado, característico de muerte por apoptosis, así como también células no adheridas.

Tabla II. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) del extracto metanólico y fracciones de *Argemone gracilentia*

Extracto/Fracción	Líneas celulares			
	M12.C3F6	RAW 264.7	HeLa	L-929
Metanólica	46.20 ± 8.41 ^a	64.45 ± 8.97 ^a	78.87 ± 8.52 ^b	160.60 ± 2.15 ^b
Hexánica	20.40 ± 2.30 ^c	36.06 ± 6.55 ^d	70.62 ± 5.80 ^c	131.30 ± 3.39 ^c
Acetato de etilo	32.60 ± 1.10 ^b	41.27 ± 4.27 ^c	126.28 ± 5.73 ^a	180.61 ± 4.37 ^a
Etanólica	21.08 ± 0.84 ^c	55.18 ± 8.80 ^b	> 200 [*]	> 200 [*]
Residual	40.60 ± 10.08 ^a	64.65 ± 5.36 ^a	> 200 [*]	> 200 [*]

Los valores de IC₅₀ del extracto metanólico y sus fracciones (µg/mL) representan el promedio, de por lo menos, tres experimentos independientes ± la desviación estándar. La diferencia estadística está representada por cada línea celular entre las fracciones probadas, datos con la misma letra no presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05). Asterisco (*), concentración máxima probada a la cual no se alcanzaron los valores de IC₅₀.

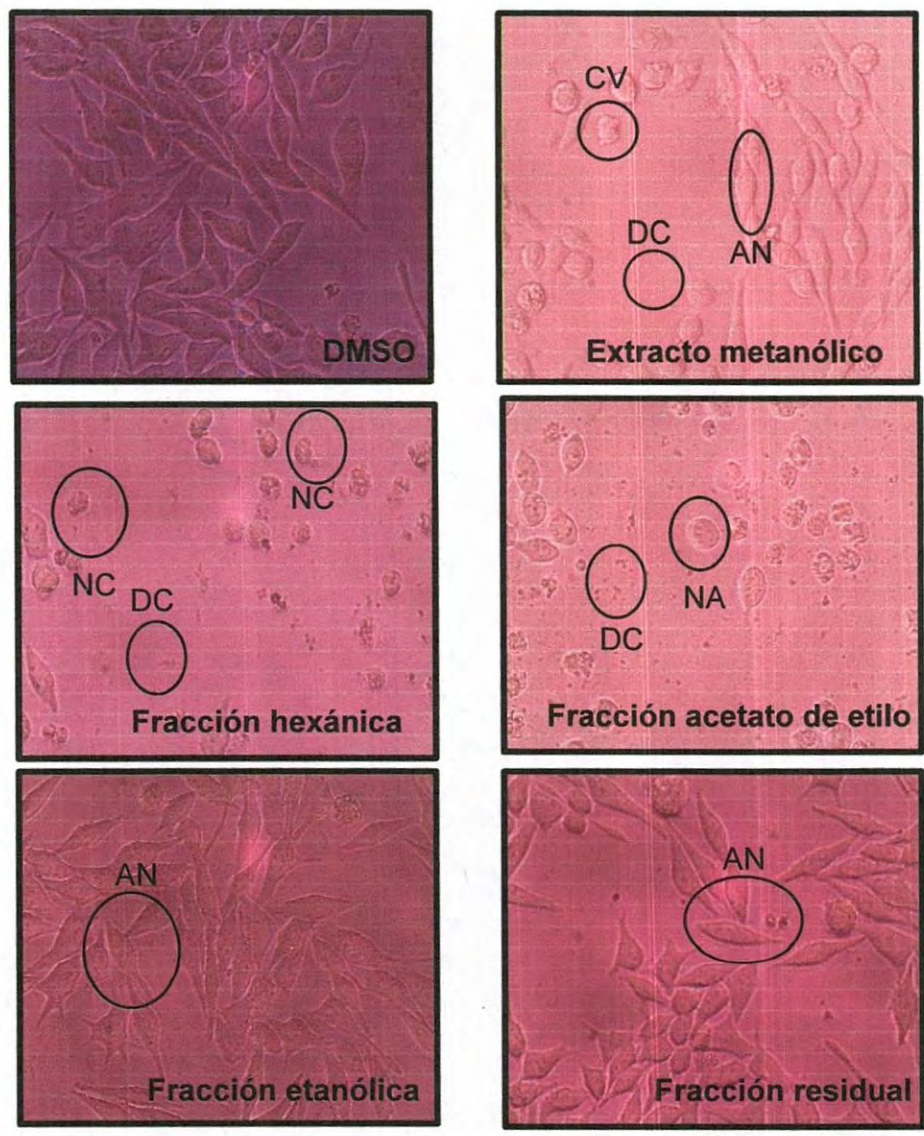


Figura 3. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena M12.C3F6, cambios morfológicos. Observación a las 48 horas, en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos característicos: Células vesiculadas (CV); Detrito celular (DC); Aparentemente normales (AN); No adheridas (NA); Núcleo condensado (NC).

Los resultados de las evaluaciones realizadas sobre la línea celular RAW 264.7 (Tabla II), muestra que esta línea celular fue más susceptible a la fracción hexánica ($IC_{50}= 36.05 \mu\text{g/mL}$), la cual mostró un valor de IC_{50} menor con respecto a las demás fracciones, siguiendo la fracción acetato de etilo ($IC_{50}= 41.27 \mu\text{g/mL}$), considerándose fracción activa. El extracto metanólico y las demás fracciones presentaron menos efecto sobre esta línea celular, mostrando valores de IC_{50} por arriba de los $50 \mu\text{g/mL}$.

Los cambios morfológicos observados en esta línea celular (Fig. 4), fueron similares a los observados en las células M12.C3F6; una gran cantidad de detrito celular y células vesiculadas, así como una disminución en la proliferación celular. También se pudo apreciar que las fracciones etanólica y residual no presentaron actividad significativa sobre RAW 264.7 y se observó una gran cantidad de células aparentemente normales.

Una de las líneas celulares menos susceptibles fue HeLa (Tabla II), sin embargo, podemos rescatar que una de las fracciones que presentó mayor actividad sobre esta línea celular fue la fracción hexánica ($IC_{50}=70.62 \mu\text{g/mL}$), con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las demás fracciones. El extracto metanólico y las demás fracciones mostraron valores de IC_{50} mayores de $75 \mu\text{g/mL}$, siendo su efecto antiproliferativo no relevante sobre esta línea celular. Los cambios morfológicos observados en HeLa por efecto de las fracciones fueron similares a los mostrados en las demás líneas celulares cancerígenas (Fig. 5). El efecto antiproliferativo del extracto metanólico y sus fracciones sobre la línea celular normal L-929 no fue considerable (Tabla II), ya que sus valores de IC_{50} permanecieron por arriba de los $100 \mu\text{g/mL}$, considerándose como no activas según los criterios de Ríos y colaboradores. Observándose una viabilidad celular por arriba del 90% (Fig. 6) (células aparentemente normales), con un efecto mínimo en la célula a las más altas concentraciones probadas.

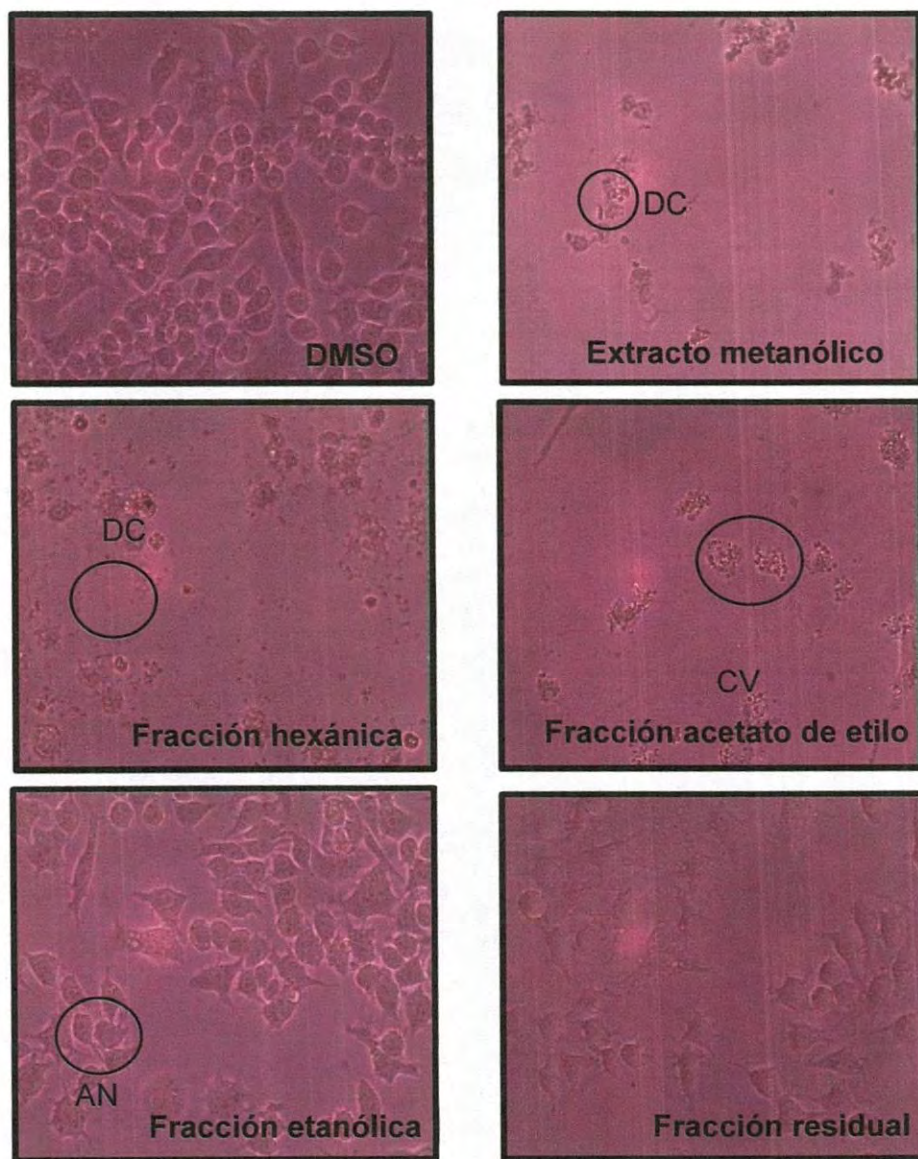


Figura 4. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena RAW 264.7, cambios morfológicos. Observación a las 48 horas, en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos característicos. Células vesiculadas (CV); Detrito celular (DC); Aparentemente normales (AN); No adheridas (NA); Núcleo condensado (NC).

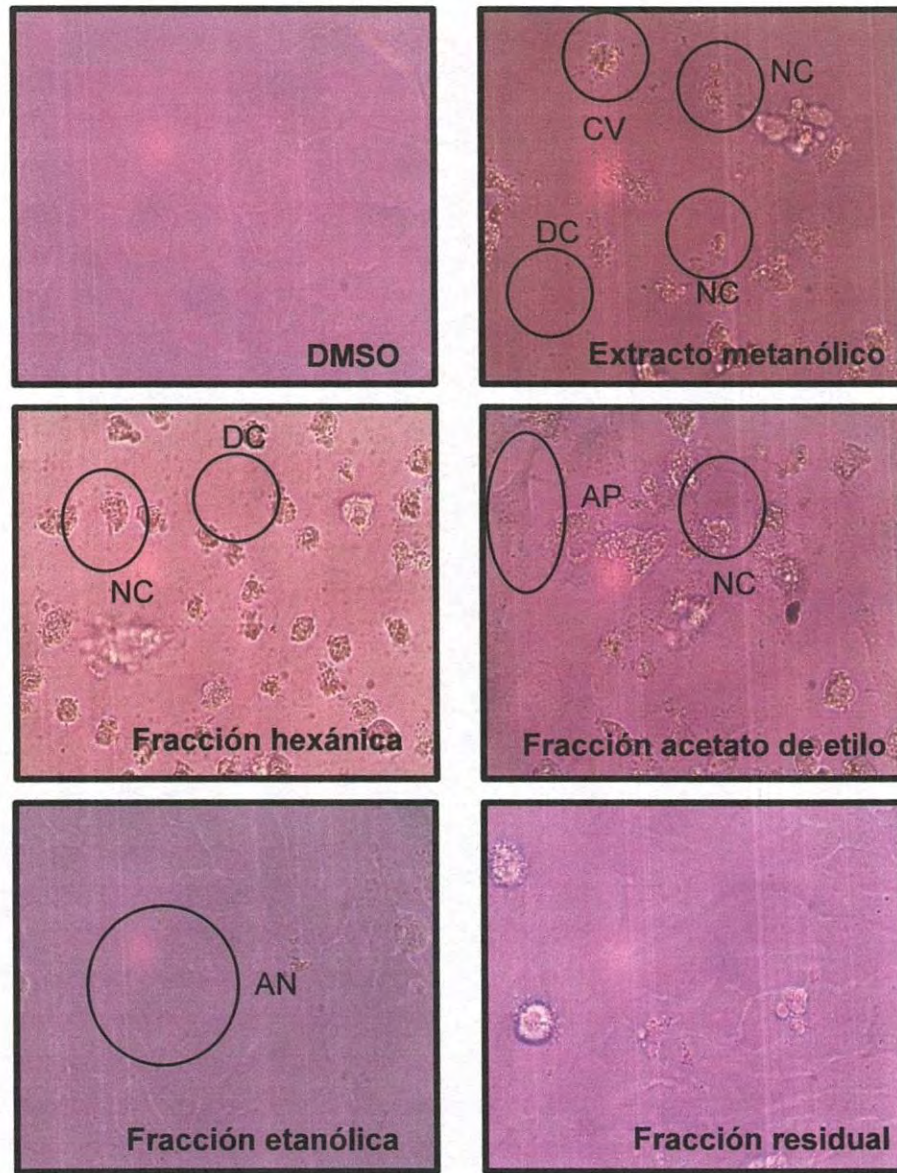


Figura 5. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena HeLa, cambios morfológicos Observación a las 48 horas, en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos característicos. Células vesiculadas (CV); Detrito celular (DC); Aparentemente normales (AN); No adheridas (NA); Núcleo condensado (NC).

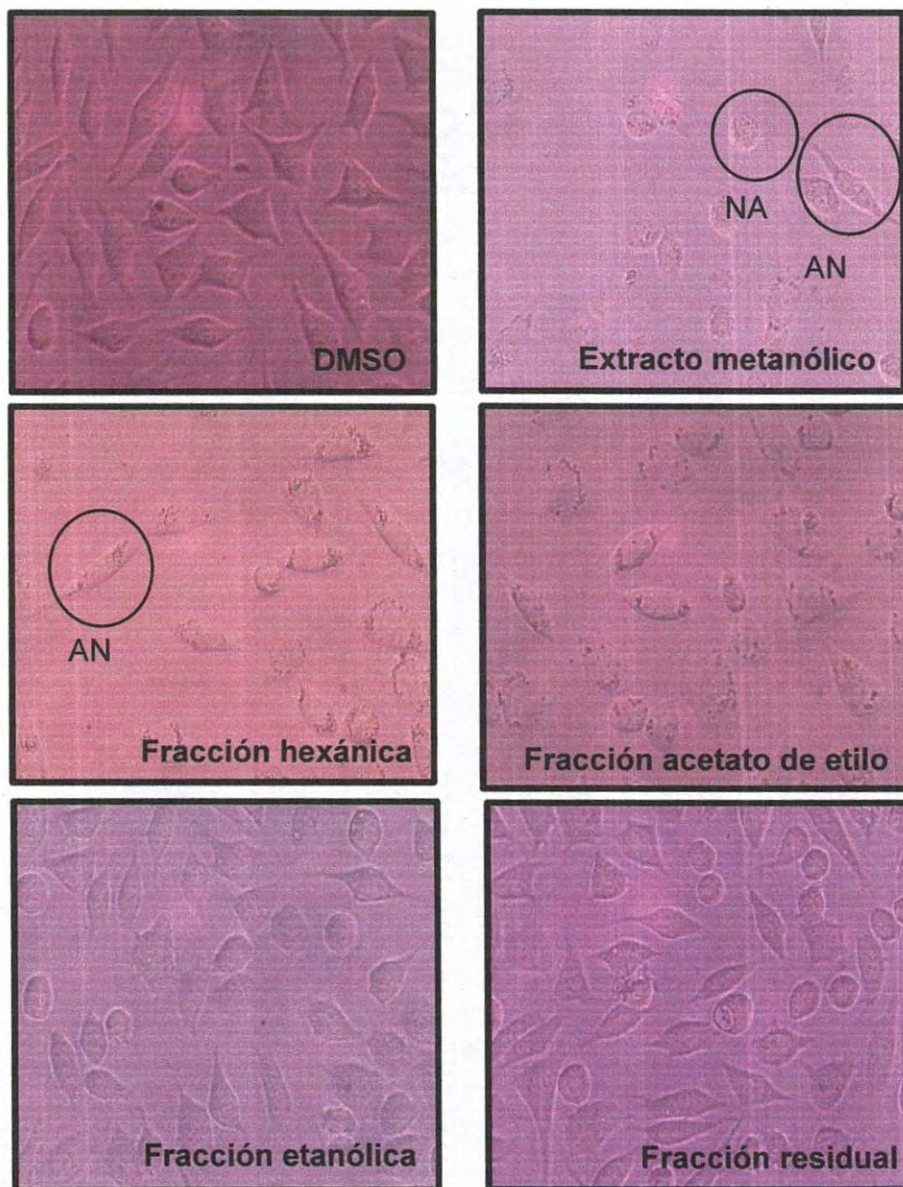


Figura 6. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular normal L-929. Observación a las 48 horas, en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos. Células vesiculadas (CV); Detrito celular (DC); Apparentemente normales (AN); No adheridas (NA); Núcleo condensado (NC).

Varios estudios realizados con plantas del género *Argemone*, han demostrado actividad sobre diferentes líneas celulares cancerosas. Gali y colaboradores (2011) realizaron un estudio de actividad antiproliferativa del extracto metanólico de hojas provenientes de *Argemone mexicana*, sobre dos líneas celulares cancerígenas humanas, HeLa (cáncer cervicouterino) y MCF-7 (cáncer de mama) donde obtuvieron valores de IC_{50} entre 1.35 g/mL a 1.2 g/mL. Comparándose con el estudio realizado con *Argemone gracilenta*, ésta última demostró presentar mayor actividad de inhibición celular en la línea celular HeLa.

Estudios realizados en la Universidad de Sonora, han demostrado que especies del género *Argemone* encontradas en el estado de Sonora presentan actividad antiproliferativa sobre diversas líneas celulares cancerosas. Becerra en el 2011, encontró que el extracto metanólico y la fracción etanólica de *A. ochroleuca*, tienen actividad antiproliferativa sobre las diferentes líneas celulares probadas. La fracción etanólica presentó mayor actividad, con valores de IC_{50} de: 24.2 $\mu\text{g/mL}$ (M12.C3F6) 27.4 $\mu\text{g/mL}$ (RAW 264.7) y 99 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa). En la línea celular normal L-929 no presentó actividad, con una 169.6 $\mu\text{g/mL}$.

Un estudio realizado por Carrasco en el 2012, demostró la actividad antiproliferativa de extractos y fracciones de *Argemone pleiacantha* sobre diferentes líneas celulares cancerosas M12.C3F6, RAW 264.7, HeLa, A-549 y LS-180. Las fracciones hexánica y etanólica presentaron una IC_{50} de 3.2 y 5.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sobre la línea celular M12.C3F6. Sobre la línea RAW, HeLa y LS-180, la fracción hexánica presentó una IC_{50} de 1.7, 4.3 y 35.7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Mientras que la fracción etanólica sólo presentó actividad en RAW ($IC_{50} = 28.3 \mu\text{g/mL}$). Ambas fracciones, mostraron baja actividad en la línea celular normal (L-929) ($IC_{50} = 90.5$ e $IC_{50} = >200 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Estos estudios demuestran que las especies de *Argemone* encontradas en la región de Sonora, *Argemone pleiacantha*, *ochroleuca* y *gracilenta*, poseen

compuestos de similar naturaleza con actividad antiproliferativa. Compuestos no polares en las fracciones hexánica (*A. pleiakantha* y *A. gracilenta*), y compuestos polares o medianamente polares en las fracciones etanólica y acetato de etilo (*A. ochroleuca*, *A. pleiakantha* y *A. gracilenta*). Según los resultados obtenidos en los diferentes estudios, *Argemone pleiakantha* es la especie que mostró mayor actividad antiproliferativa sobre las diferentes líneas celulares evaluadas, ya que los valores de IC_{50} de la fracción hexánica de dicha planta son los más bajos de las tres especies de *Argemone*, mostrando valores entre 1.7 y 35.7 $\mu\text{g/mL}$.

Perfil Fitoquímico

Los resultados obtenidos a través de las diferentes reacciones, mostraron de una manera cualitativa la presencia de ciertos tipos de metabolitos secundarios presentes en *Argemone gracilenta*. En la tabla III se muestran las diferentes reacciones que se usaron para identificar algún grupo de metabolito en particular.

Los resultados se basaron en los criterios tomados para cada reacción (formación de precipitado, cambio de color, etc) con respecto a un control negativo como se sugiere en el estudio realizado por Aiyegoro y Okoh en el 2010: +++ = cantidad apreciable (positivo en 5 minutos); ++ = cantidad moderada (positivo después de los 5 minutos, pero hasta 10 minutos); + = trazas (positivo después de los 10 minutos, pero hasta 15 min); - = completamente ausente. Los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Argemone gracilenta* son de tipo: saponina (+), alcaloide (+++) y emoide (++) . De acuerdo a la literatura, los primeros dos grupos de compuestos son de gran importancia debido a sus múltiples actividades biológicas y propiedades terapéuticas demostradas.

Tabla III. Perfil fitoquímico del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

Constituyente	Prueba	Inferencia
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-
	Reacción de hidróxido de sodio al 10%	-
Saponinas	Reacción de Rosenthaler	+
Alcaloides	Reacción de Mayer	+++
	Reacción de Wagner	+++
Taninos	Reacción con gelatina	-
	Reacción con cloruro férrico	-
	Reacción con ferricianuro de potasio al 10%	-
Quinonas	Reacción con hidróxido de amonio	-
	Reacción con ácido sulfúrico	-
	Reacción de Borntrager	-
Cumarinas	Reacción con hidróxido de potasio 0.5 M	-
Emoides	Reacción con hidróxido de amonio al 25%	++
Agliconas flavonoides	Reacción con ácido clorhídrico y magnesio	-

+++ = cantidad apreciable (positivo en 5 minutos); ++ = cantidad moderada (positivo después de los 5 minutos. Pero hasta 10 minutos); + = trazas (positivo después de los 10 minutos. Pero hasta 15 min); - = completamente ausente. (Aiyegoro y Okoh, 2010).

Extracción de Alcaloides

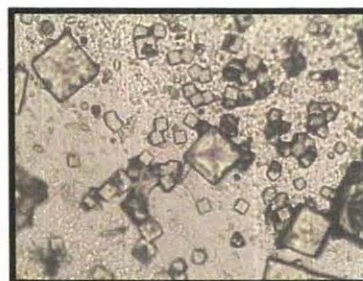
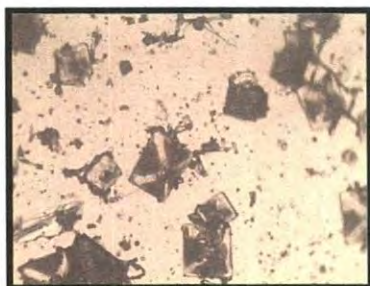
Con base en la información mostrada en la bibliografía sobre los metabolitos secundarios que, generalmente, confieren las actividades biológicas a las especies del género *Argemone* y de acuerdo al perfil fitoquímico realizado, se llevó a cabo una serie de metodologías para la extracción directa de alcaloides. De varias metodologías, sólo dos: método A (Pereira y col., 2007) y método B (Yuh-Chwen y col., 2003), fueron las que dieron mejores resultados, destacando que en algunos casos su actividad antiproliferativa fue mayor que la actividad mostrada por el extracto metanólico y sus fracciones, presentando porcentajes de inhibición del crecimiento celular considerablemente altos a concentraciones bajas.

Usando el método A, se obtuvieron dos muestras principales, una de la fase orgánica y otra de la fase acuosa. Al realizarles el perfil fitoquímico la fase acuosa dio positivo para la presencia de alcaloides (Reacción de Mayer y Wagner) y la fase orgánica presentó una reacción negativa. De la muestra positiva para alcaloides, se obtuvieron cristales (Fig. 7A).

Posteriormente, se realizó la validación de la actividad antiproliferativa frente a la línea celular M12.C3F6 a diferentes concentraciones, demostrando que la muestra de la fase orgánica presentó mayor actividad que la fase acuosa. Mostrando una IC_{50} de 48.32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la fase acuosa (conteniendo los alcaloides) no presentó actividad considerable sobre esta línea celular. La fase orgánica (activa) se nombró "M1".

La muestra "M1" se trató con carbón activado para eliminar las clorofilas y la muestra libre de clorofilas se le llamó "M2". En la muestra "M2", se llevó a cabo una monitorización por cromatografía en capa fina (TLC), fase móvil metanol:agua (8:2), y se observó que las muestras "M1" y "M2" compartían una banda azul brillante y que las clorofilas habían sido eliminadas, ya que la banda roja característica de las mismas ya no aparecía en el TLC. Se realizó la

A)



B)

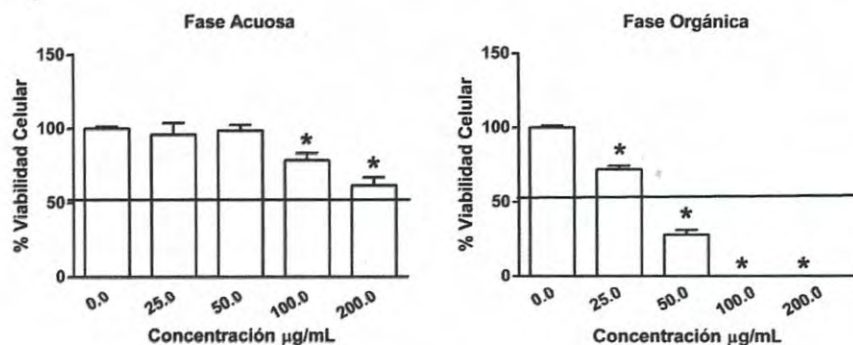


Figura 7. Método A de extracción de alcaloides: A) formación de cristales al concentrar la fase acuosa; observación en microscopio invertido (40X). B) Actividad antiproliferativa de la fase orgánica y acuosa obtenida del método de extracción de alcaloides del extracto metanólico de *Argemone gracilentia* sobre la línea celular M12.C3F6 (48 horas). Las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco (*).

evaluación de la actividad antiproliferativa de ambas muestras ("M1" y "M2"). En la figura 7B se puede observar que la actividad frente a la línea celular M12.C3F6 se mantuvo, y por consiguiente, se eligió la muestra "M2" para las siguientes evaluaciones por tener un grado mayor de pureza.

La tabla IV resume las evaluaciones de la actividad antiproliferativa de la muestra "M2" sobre la diferentes líneas celulares, destacando que la línea celular más susceptible a esta muestra fue RAW 264.7, mostrando un valor de IC_{50} de 20.16 $\mu\text{g/mL}$. Se aprecia también, que la línea celular HeLa fue la menos susceptible con una IC_{50} de 51.55 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, comparándola con la IC_{50} mostrada en la línea celular normal, L-929, mayor de 100 $\mu\text{g/mL}$, la convierte en una muestra candidato para seguir evaluando, ya que el efecto sobre las células normales no es considerable.

Usando el método B, se obtuvieron tres muestras a partir del extracto metanólico de *Argemone gracilenta*: M13, M14 y M15. A estas muestras, se les realizó las reacciones específicas para la determinación de alcaloides, observando reacción positiva para las muestras "M13" y "M15". Posteriormente, se llevó a cabo la validación de la actividad antiproliferativa (Fig. 8) sobre la línea celular M12.C3F6, obteniendo como resultado la muestra "M15" como la más activa, presentando una inhibición de la proliferación celular por arriba del 90% a 50 $\mu\text{g/mL}$. La muestra "M15" no se sometió a eliminación de clorofilas, ya que la monitorización con TLC no indicó la presencia de las mismas (banda roja).

Tabla IV. Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de las muestra obtenidas en la extracción de alcaloides: M2 y M15.

Fracción	Líneas celulares		
	M12.C3F6	RAW 264.7	HeLa
M2	41.47 ± 1.59	20.16 ± 1.29	51.55 ± 3.79
M15	9.32 ± 2.64	16.85 ± 0.90	32.3 ± 7.19
			L-929
			> 100
			46.99 ± 1.78

Los valores de IC_{50} de las muestra "M2" y "M15" ($\mu\text{g/mL}$) representan el promedio, de por lo menos, tres experimentos independientes \pm la desviación estándar.

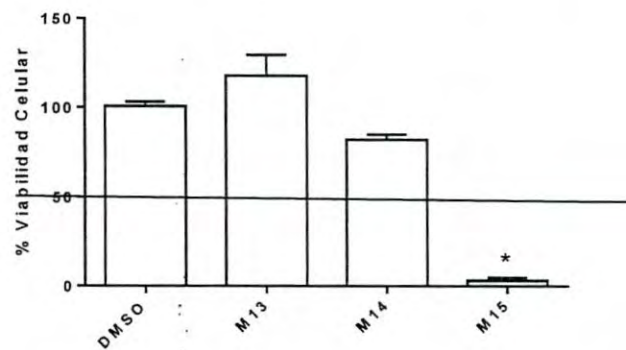


Figura 8. Método B de extracción de alcaloides: Actividad antiproliferativa de las muestras M13, M14 y M15 sobre la línea celular M12.C3F6 (48 horas). Las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco (*).

La tabla IV concentra los resultados de la evaluación de actividad antiproliferativa de la muestra "M15" sobre las diferentes líneas celulares, mostrando mayor actividad sobre la línea celular M12.C3F6 (IC_{50} = 9.32 μ g/mL) y menor sobre HeLa (IC_{50} = 32.3 μ g/mL). Al igual que la muestra "M2", el efecto sobre la línea celular L-929 fue menor (IC_{50} = 46.99 μ g/mL) con respecto a las demás líneas celulares, presentándose diferencia estadísticamente significativa entre las línea celular normal L-929 y las líneas celulares cancerígenas.

Al-Hayyan en 2006 aisló varios alcaloides de *Argemone ochroleuca* que fueron identificados primeramente en placas de TLC por dar positivo al reactivo de Dragendorf y por mostrar una banda fluorescente naranja, amarilla o azul (dependiendo del alcaloide) al observarla en lámpara de UV. Una vez determinado que la muestra "M15" contenía alcaloides, se decidió monitorizar ésta, buscando una banda de color amarillo fluorescente a una longitud de onda de 365 nm en lámpara de UV y un factor de retención (Rf) de 0.80, en una fase móvil de CH_2Cl_2 :MeOH (80:20), característica mostrada por la banda amarilla del "alcaloide" de la muestra activa "M15" en el análisis por TLC.

El seguimiento se realizó en la fracción acetato de etilo, la cual mostró actividad antiproliferativa considerable en las diferentes líneas celulares cancerosas probadas. Al encontrar esta banda en la fracción acetato de etilo, fue separada por cromatografía en columna, obteniéndose 24 subfracciones (Anexo 3), de las cuales la subfracción 23 (SFCAE-23) representaba la banda deseada, ya que presentó alta actividad sobre las diferentes líneas celulares cancerosas. Una vez obtenida, se juntaron las muestras "M15" y la SFCAE-23, para obtener mayor cantidad de muestra, la cual se sometió a cromatografía en columna para separar y purificar la banda de interés.

De esta cromatografía, se obtuvieron 7 subfracciones (Anexo 5), donde la subfracción 5, representó la banda ya purificada (se le asignó la clave FAg-7). Una vez evaporado el solvente de la subfracción 5, se agregaron 10 mL de

diclorometano, logrando obtener dos fases de la muestra, una disuelta y un precipitado (Fig. 9). Ésta se filtró y se separó en un vial (A), el precipitado se disolvió en metanol y se separó en otro vial (B). Una vez separadas estas dos fases, se monitorizaron por TLC, observándose bandas característica de fluorescencia amarilla en lámpara de UV para compuestos de tipo alcaloide, pero diferentes Rf en CH₂Cl₂:MeOH (80:20): de A de 0.80 y de B de 0.73. Ambas muestras fueron analizadas por RMN ¹H y ¹³C.

Actividad Antiproliferativa de las Subfracciones de la Cromatografía en Columna

Cromatografía en Columna de la Fracción Hexánica

Después de haber realizado las evaluaciones de actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone gracilentia* y sus fracciones, la fracción hexánica y acetato de etilo se sometieron a fraccionamiento a través de cromatografía en columna.

De la cromatografía en columna de la fracción hexánica se obtuvieron 554 elusiones (Anexo 3) (subfracciones cromatográficas), las cuales fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina (TLC), y aquellas que presentaron un patrón de bandas similar fueron agrupadas, obteniéndose 17 subfracciones (SFCH). Una vez realizado esto, se evaluó su actividad antiproliferativa frente a la línea celular M12.C3F6 a diferentes concentraciones, desde 50 hasta 6.25 µg/mL

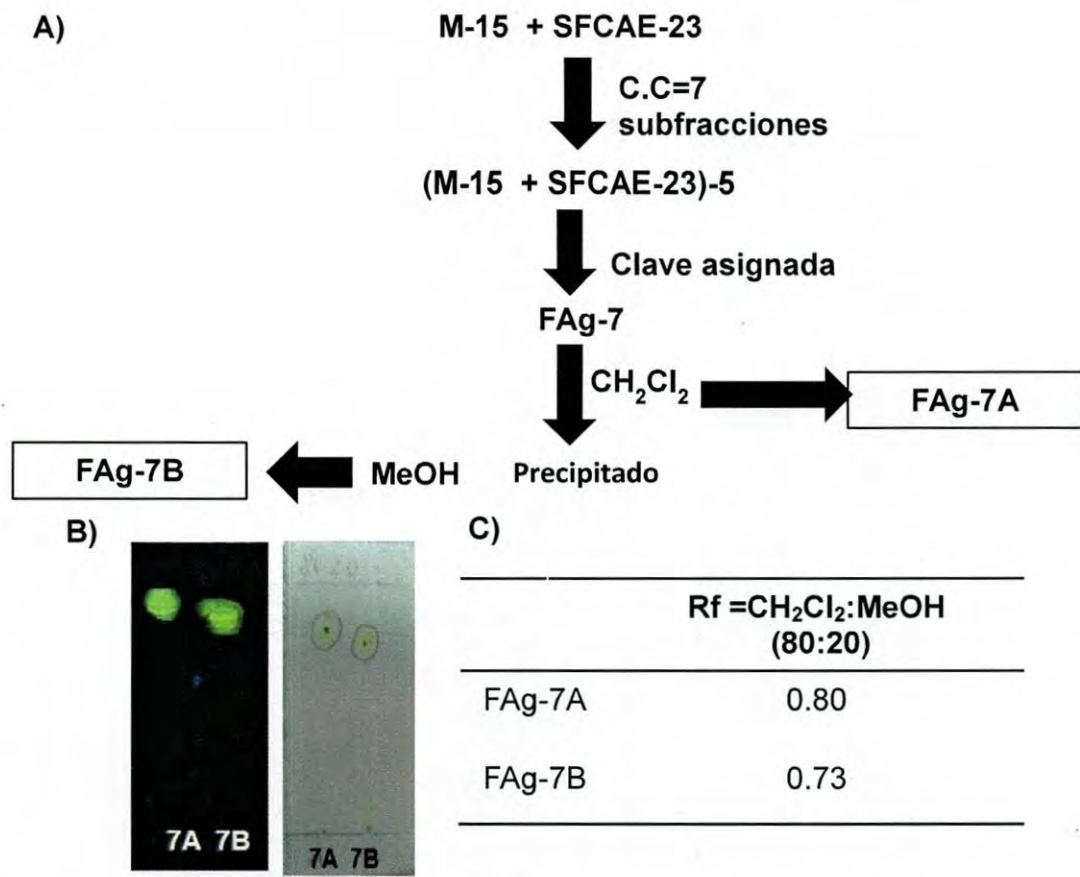


Figura 9. Purificación de la muestra FAg-7: A) Diagrama de purificación de la muestra FAg-7, donde se muestra la obtención de FAg-7A y FAg-7B, derivadas de ésta; B) Monitoreo por TLC de las muestras FAg-7A y FAg-7B utilizando la fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (80:20): imagen vista a una longitud de onda de 365 nm en lámpara de UV (izquierda), revelado con sulfato cérico (derecha); C) En esta tabla se muestran los valores del factor de retención (Rf) para las muestras FAg-7A y FAg-7B mostrados en el TLC 7B utilizando la fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (80:20).

En la figura 10, se muestran los resultados de la actividad antiproliferativa de las subfracciones cromatográficas de la fracción hexánica, en las cuales se puede observar que a la concentración de 50 µg/mL, sólo las subfracciones de la 6 a la 13 presentaron una inhibición superior al 60%. De éstas, las subfracciones 11 y 12 produjeron un porcentaje de inhibición del crecimiento celular del 82 y 77% respectivamente, a la concentración más baja probada (12.5 µg/mL).

Cromatografía en Columna de la Fracción Acetato de Etilo

Una vez monitorizada la muestra "M15" (alcaloides) en la fracción acetato de etilo, se decidió someter a fraccionamiento por cromatografía en columna (Anexo 4), obteniendo 38 elusiones. Las elusiones fueron monitorizadas por TLC, y aquellas que mostraron un patrón de bandas similares fueron agrupadas, obteniéndose 25 subfracciones (SFCAE). De las 25 subfracciones, se realizó una segunda monitorización por TLC, agrupándose nuevamente en 8 fracciones con clave FAg-(1-8).

De las subfracciones obtenidas de la cromatografía de la fracción acetato de etilo de *Argemone gracilenta*, se evaluó la actividad antiproliferativa de 4 de ellas: FAg-1(SFCAE-1), FAg-4A(SFCAE-9 a la SFCAE-15), FAg-5B(SFCAE-16 a la SFCAE-18) y FAg-7A(SFCAE-24); los resultados (IC_{50}) de la evaluación de la actividad se resumen en la tabla V, sobre cada una de las líneas celulares utilizadas. La subfracción FAg-1, no presentó actividad, ya que su IC_{50} se encuentra por arriba de los 100 µg/mL en todas las líneas celulares.

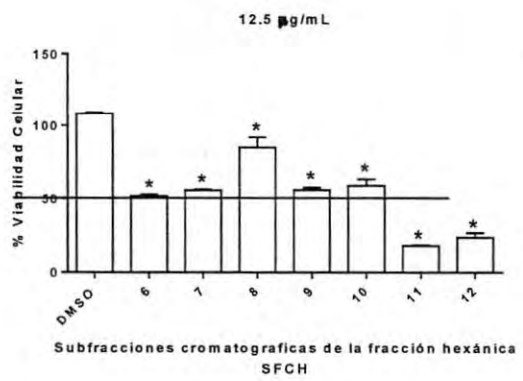
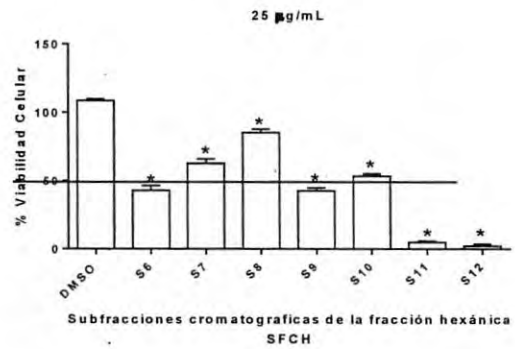
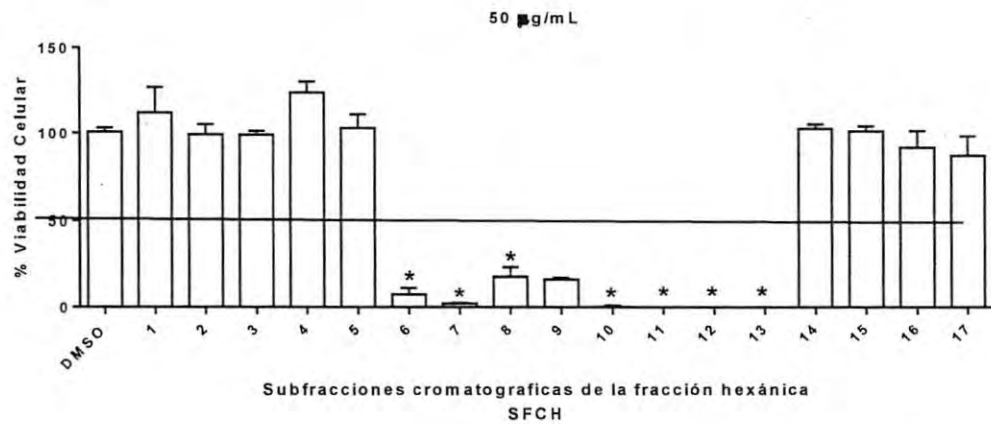


Figura 10. Actividad antiproliferativa de las subfracciones cromatograficas de la fracción hexánica de *Argemone gracilentia* sobre la línea celular M12.C3F6 (48 horas); concentraciones utilizadas de 50, 25 y 12.5 µg/mL. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control (DMSO) se marcan con asterisco

Tabla V. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) de las fracciones cromatográficas de la fracción acetato de etilo de *Argemone gracilentia*.

Fracción	Líneas celulares			
	M12.C3F6	RAW 264.7	HeLa	L-929
FAg-1	> 200*	> 200 *	> 100 *	> 200 *
FAg-4A	16.81 ± 4.0 ^b	34.1 ± 5.8 ^a	91.8 ± 7.6 ^a	151.7 ± 1.5 ^a
FAg-5B	24.9 ± 2.2 ^a	35.4 ± 10.14 ^a	67.61 ± 5.6 ^b	85.1 ± 2.3 ^b
FAg-7A	2.8 ± 0.3 ^c	2.5 ± 0.5 ^b	12.1 ± 1.7 ^c	> 100 *

Los valores de IC₅₀ de cada una de las fracciones (µg/mL) representan el promedio de, por lo menos, tres experimentos independientes ± la desviación estándar. La diferencia estadística está representada por cada línea celular entre las fracciones probadas, datos con la misma letra no presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05). * Concentración máxima probada a la cual no se alcanzaron los valores de IC₅₀.

La subfracción FAg-4A, presentó una mayor actividad sobre la línea celular M12.C3F6 ($IC_{50} = 16.81 \pm 4.0 \mu\text{g/mL}$), en RAW 264.7 fue activa con una IC_{50} de $34.1 \pm 5.8 \mu\text{g/mL}$ y mostró una mediana actividad sobre la línea celular HeLa con un valor de IC_{50} de $91.8 \pm 7.6 \mu\text{g/mL}$. Esta misma subfracción, no mostró actividad sobre la línea celular normal L-929, ya que su IC_{50} está por arriba de los $100 \mu\text{g/mL}$. El comportamiento de la subfracción FAg-5B en la evaluación de la actividad antiproliferativa fue muy similar a la mostrada por la subfracción FAg-4A, principalmente en las líneas celulares M12.C3F6 y RAW 264.7, con valores de IC_{50} de 24.9 ± 2.2 y $35.4 \pm 10.14 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sin embargo, en HeLa, la subfracción FAg-5B mostró mayor actividad con una IC_{50} de $67.61 \pm 5.6 \mu\text{g/mL}$. Su actividad sobre la línea celular normal L-929 fue medianamente activa, mostrando una IC_{50} de $85.1 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$.

La subfracción FAg-7A fue la que presentó mayor actividad sobre las diferentes líneas celulares utilizadas, resumiéndose los resultados en la tabla V con valores de IC_{50} . Como se observa en esta tabla y basándonos en los criterios presentados por Ríos y colaboradores (2008), la subfracción FAg-7A resultó ser muy activa sobre las líneas celulares M12.C3F6 y RAW 264.7 con valores de IC_{50} de 2.8 ± 0.3 y $2.5 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. De las líneas celulares cancerosas, HeLa resultó ser la menos susceptible a esta fracción. Sin embargo, siguiendo los criterios mencionados anteriormente, puede decirse que la subfracción FAg-7A resulta ser activa frente a esta línea celular, mostrando un valor de IC_{50} de $12.1 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$. En cambio, la actividad mostrada sobre la línea celular normal, L-929, no es considerable, ya que el valor de IC_{50} resultante en la actividad antiproliferativa está por arriba de los $100 \mu\text{g/mL}$.

En el estudio presentado por Becerra en el 2011, se evaluaron tres distintas drogas referenciadas (doxorrubicina, 5-fluoracil y colchicina) con alta actividad de inhibición en el crecimiento de células cancerosas, sobre las líneas celulares evaluadas en este estudio con *Argemone gracilentia*. En la tabla mostrada en el

anexo 9, se resumen las evaluaciones de la actividad de las tres diferentes drogas, donde se observa que doxorubicina presentó una mayor actividad sobre las diferentes líneas celulares mostrando una IC_{50} en M12.C3F6 de $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, en RAW 264.7 de $2.85 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$, HeLa de $2.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$, y en la línea celular normal L-929 no presentó actividad ya que su IC_{50} está por arriba de los $200 \mu\text{g/mL}$. El compuesto 5-fluoracil en las líneas celulares M12.C3F6 y RAW 264.7 tuvo un comportamiento muy parecido a doxorubicina, teniendo valores de IC_{50} de 1.9 ± 0.6 y $2.5 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En HeLa tuvo una IC_{50} de $12.1 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$, sin embargo la actividad en L-929 fue muy baja, ya que alcanzó una IC_{50} mayor de $100 \mu\text{g/mL}$. Colchicina presentó una menor actividad sobre las diferentes líneas celulares. Sin embargo, en la línea celular RAW 264.7 tuvo una actividad similar a las dos drogas anteriormente mencionadas, con una IC_{50} de $2.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$; en M12.C3F6 la IC_{50} fue mayor a $39.94 \mu\text{g/mL}$, en HeLa tuvo un valor de $79.5 \pm 11.5 \mu\text{g/mL}$ y en la línea celular normal L-929 no presentó actividad obteniéndose una IC_{50} mayor de $100 \mu\text{g/mL}$. De las subfracciones cromatográficas obtenidas de la fracción acetato de etilo de *Argemone gracilenta*, la subfracción FAg-7A presentó mayor actividad sobre las diferentes líneas celulares cancerosas evaluadas y muy baja actividad de inhibición del crecimiento de la línea celular normal L-929, utilizada como control. Comparando nuestros resultados, de la fracción FAg-7A, con los mostrados por Becerra (2011) de la evaluación con las drogas ya mencionadas, es posible precisar que la subfracción FAg-7A tiene un comportamiento similar en la inhibición del crecimiento celular en las líneas celulares M12.C3F6 y RAW 264.7, a la actividad mostrada por la droga 5-fluoracil. Este comportamiento observado nos indica que la subfracción FAg-7A podría tener un mayor efecto antiproliferativo sobre células cancerosas derivadas de células sanguíneas.

Caracterización de los Compuestos con Actividad Antiproliferativa Presentes en *Argemone gracilenta*

De las fracciones activas de *Argemone gracilenta*, se lograron aislar dos fracciones, FAg-7A y FAg-7B, a partir de las muestras "M15" y SFCAE-23 de la fracción de acetato de etilo. La muestra "M15", dio positiva las reacciones de Mayer y Wagner, indicando la presencia de compuestos de tipo alcaloide y ésta se corroboró con un análisis de RMN de ^1H y ^{13}C (Anexos 9 y 10). Las muestras FAg-7A y FAg-7B, se trataron como muestras diferentes, basándose en el patrón de bandas mostrado en TLC y el cálculo del factor de retención (Rf), obteniéndose valores de 0.80 y 0.73, respectivamente.

Las propiedades físicas que caracterizan a la muestra FAg-7A, son la formación de pequeños cristales amarillos (apariencia de polvo), solubles en diclorometano (CH_2Cl_2) y un color amarillo al ser observado con una lámpara de UV. En el espectro de RMN de ^1H (Fig. 11) se observan señales a campo alto, que corresponden a grupos alifáticos y señales a campo bajo, asociadas a protones de anillos aromáticos (entre 6 y 7.5 ppm). Analizando las señales en el área de aromáticos, pueden distinguirse dos señales sencillas en 6.31 y 6.47 ppm, indicando que la mayoría de los carbonos del (o los) anillo(s) aromático(s) están sustituidos. A campo alto del espectro de hidrógeno, se observan 2 señales sencillas con desplazamiento químico de 3.58 y 3.66 ppm, respectivamente, que representan señales características de los grupos metoxilos ($\text{O}-\text{CH}_3$) y una señal simple en 2.45 ppm, típica de un metilo unido a nitrógeno ($\text{N}-\text{CH}_3$). En el espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 12), se observan señales que apoyan lo determinado en RMN de hidrógeno. En este espectro se tienen señales características en el área de aromáticos, entre 100 y 150 ppm, que indican la presencia de dos anillos. Las señales a 55.8 y 55.6 ppm, se asignan a los grupos metoxilos ($\text{O}-\text{CH}_3$) y la señal en 39.7 ppm representa al metilo unido a nitrógeno ($\text{N}-\text{CH}_3$).

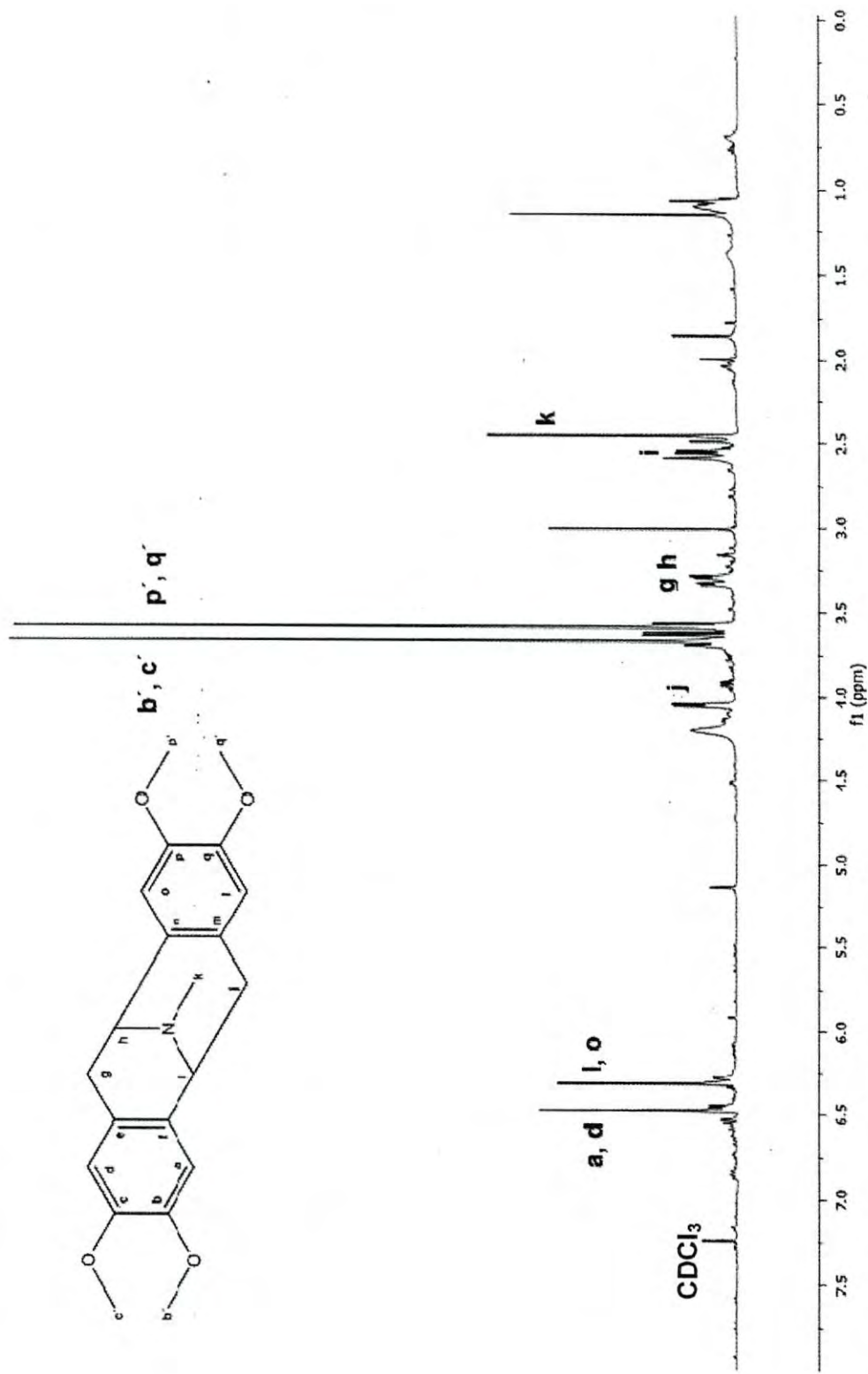


Figura 11. Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 de la muestra FAg-7A aislada de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

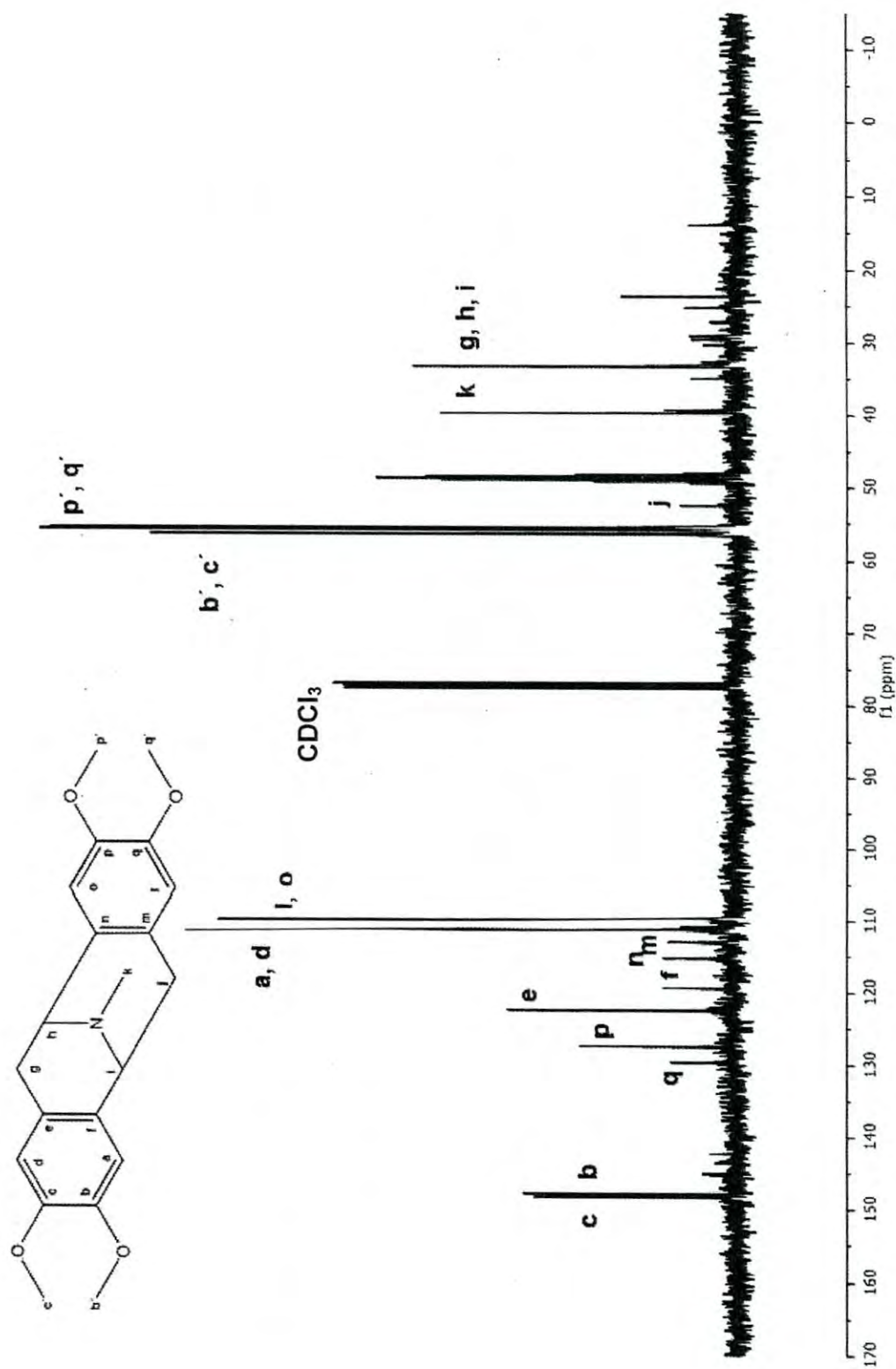


Figura 12. Espectro de ^{13}C en CDCl_3 de la muestra FAg-7A aislada de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

El análisis de RMN bidimensional HSQC hace una correlación entre los espectros de ^1H y ^{13}C , permitiendo determinar que hidrógeno está unido a determinado carbono. En el espectro de HSQC (Fig. 13) se pudo corroborar que las señales doble de dobles (dd) en 3.28 y 3.33 ppm, corresponden a un CH_2 y CH consecutivos, la señal doble (d) en 2.52 y la señal doble (d) en 4.04 representan otros grupos CH_2 aislados en la molécula. Comparando los resultados obtenidos con los reportados por Youte y colaboradores en el 2004, el compuesto presente en la muestra Fag-7A, es el alcaloide argemonina.

Argemonina es un alcaloide natural del grupo isoquinolina, que ha sido aislado de plantas y semillas de varias especies, incluyendo algunas del género *Argemone* como *A. gracilenta*, *A. platyceras*, *A. sanguinea*, entre otras. También se ha encontrado en las especies de *Berberis buxifolia*, *Thalictrum revolutum* y *T. strictum*. De los usos más conocidos de argemonina, es su empleo para combatir plagas en cultivos, en combinación con berberina y ricina, la razón por la cual se le atribuye propiedades antibacterianas, fungicidas e insecticidas (Fernández, y col., 2005). Los estudios sobre argemonina son escasos y sus actividades biológicas aún no han sido determinadas.

Dentro de los diferentes tipos de alcaloides que se han aislados de fuentes naturales, pertenecientes al grupo isoquinilínico, se encuentran sanguinarina y queleritrina, los cuales también se han aislado de especies pertenecientes al género *Argemone*, principalmente *A. mexicana*, *A. ochroleuca* y *A. pleiacantha*. Se ha demostrado que sanguinarina y queleritrina poseen un gran espectro de actividades biológicas como antimicrobiana, antifúngico, antiinflamatorio y actualmente los resultados han demostrado presentar alta actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares cancerosas de humano entre ellas HeLa (células de cáncer cervicouterino), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y A-549 (adenocarcinoma de pulmón) (Debiton y col., 2003; Slaninová y col., 2007)

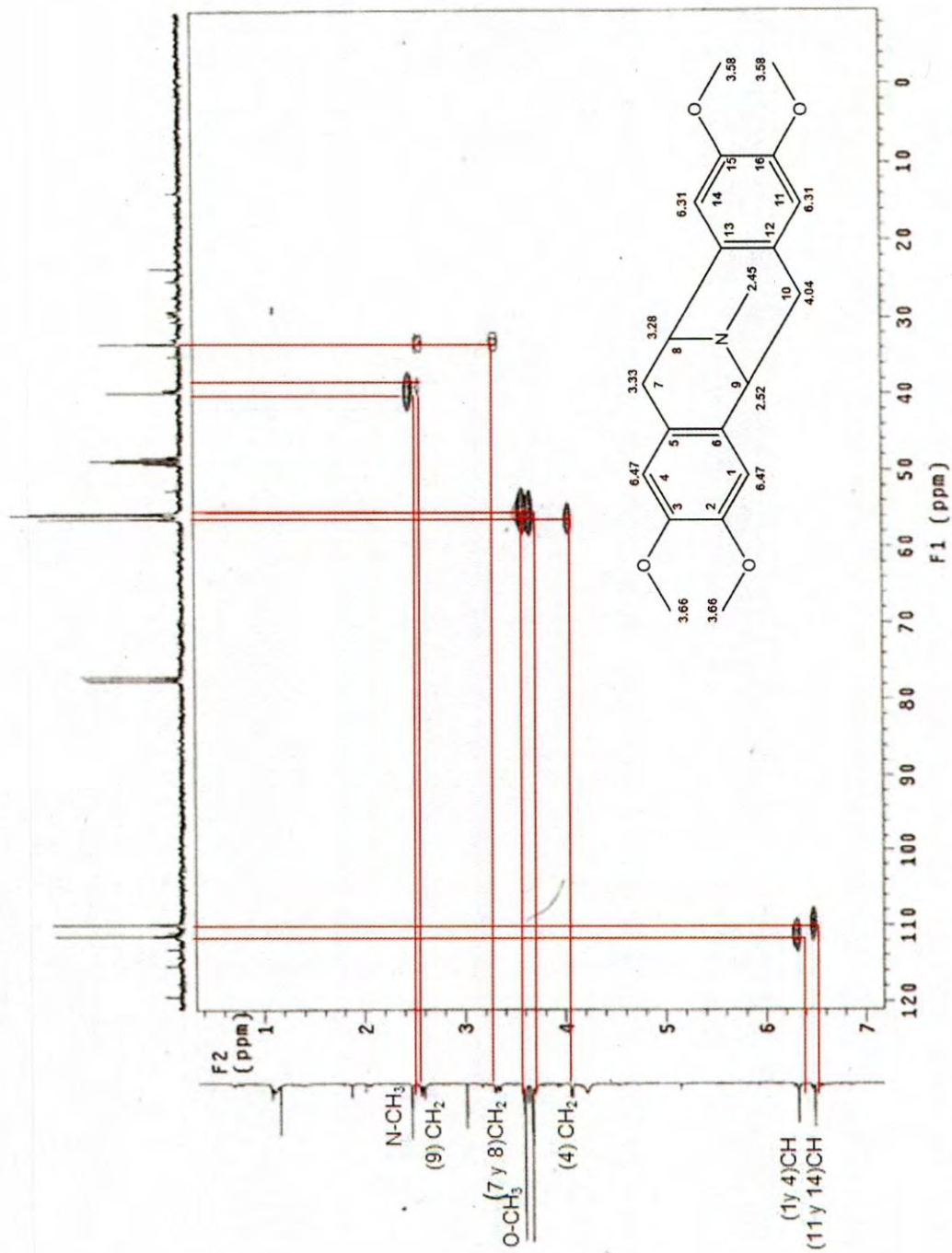


Figura 13. Espectro de HSQC en CDCl_3 de la muestra FAG-7A aislada de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

Por otro lado, la muestra FAg-7B también forma cristales amarillos solubles en metanol, y al igual que la muestra FAg-7A (argemonina), se aprecia bajo la lámpara de UV como una banda de color amarillo, pero con un factor de retención (Rf) diferente. El espectro de RMN de ^1H (Fig. 14), muestra señales en campo bajo, en la región de los anillos aromáticos (6 y 8 ppm). Entre esas regiones se presentan señales sencillas y dobles, representativas de los anillos aromáticos de ciertos alcaloides, la señal desplazada a 6.13 ppm, corresponde al protón del anillo heterocíclico tipo metilendioxi ($\text{O-CH}_2\text{-O}$) (Becerra, 2011). Las señales entre 4 y 4.5 ppm, corresponden a los protones unidos a oxígeno (O-CH_3), los grupos conocidos como metoxilos. Los desplazamientos químicos y forma de las señales mostradas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para la muestra FAg-7B, coinciden con los reportados para el alcaloide berberina, previamente identificado por nuestro grupo en *A. ochroleuca*. (Becerra, 2011) y en un estudio realizado por Al-Hayyan en 2006, sobre la misma especie.

Berberina es un alcaloide que posee un gran rango de actividades biológicas como antiinflamatoria, antibacteriana, antidiabética, sedante, vasodilatador, hepatoprotector y efecto neuroprotector (Lu y col., 2012). Además, berberina inhibe la transcriptasa reversa del VIH-1 (Al-Hayyan, 2006). Algunos estudios han demostrado que berberina presenta potencial anticancerígeno, interfiriendo con los múltiples aspectos de tumorigénesis y progresión del tumor, ambos en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Lu y col., 2012).

Reportes recientes han demostrado que berberina induce arresto del ciclo celular en las fases G1 o G2/M y apoptosis. También induce estrés en el retículo endoplasmático y autofagia en células de cáncer. Sin embargo, comparado con las drogas anticancerígenas prescritas clínicamente, el potencial citotóxico es más bajo, con IC_{50} generalmente de 10 μM a 100 μM dependiendo del tipo de célula y duración del tratamiento *in vitro* (Sun y col., 2009). La actividad anticancerígena de berberina principalmente se debe a la inhibición de invasión del tumor y metástasis.

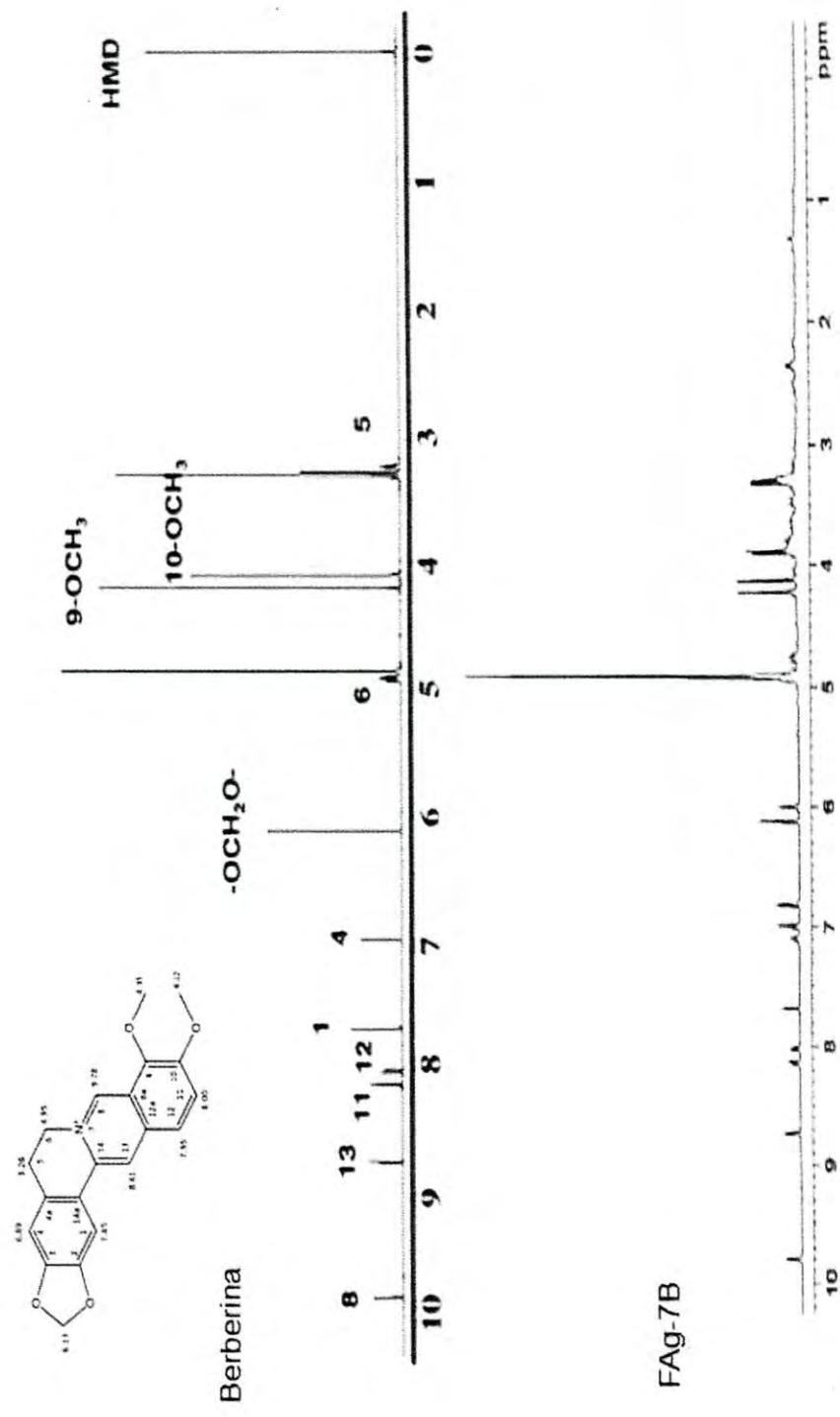


Figura 14. A) Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ de la muestra FAG-7B aislada de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*. B) Espectro de RMN ¹H de berberina en CDCl₃, (Becerra, 2011).

Con base en los diferentes estudios realizados sobre el alcaloide berberina, se ha logrado dar un avance en el entendimiento del mecanismo de acción de este compuesto sobre las diferentes líneas celulares cancerosas. Berberina interacciona con el ADN o ARN y es identificada como un inhibidor de varias enzimas, como N-acetiltransferasa (NAT), ciclooxigenasa-2(COX-2) y telomerasa (Sun y col., 2009). Otros mecanismos de berberina están relacionados con el arresto del ciclo celular y apoptosis, incluyendo la regulación de proteínas de la familia CDK y regulación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (como Bax, Bcl-2 y Bcl-xL) y caspasas (Eom y col., 2010; Mantena y col., 2006).

En células MCF-7 de cáncer de mama, berberina induce apoptosis a través de la vía mitocondrial mediante el aumento de la proteína Bcl-2 y activación de caspasas (Patil y col., 2010). Además de la alteración apoptótica inducida por berberina, hallazgos recientes con células de cáncer hepático (HepG2 y MHCC97-L) se ha observado que berberina también induce la muerte celular por autofagia (Wang y col., 2010). Además, berberina también modifica el marcador de autofagia LC3, en células de cáncer de pulmón A-549, lo que indica que la muerte por autofagia puede desempeñar un papel crucial en la muerte celular inducida por berberina (Peng y col., 2008).

Berberina inhibe la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) e induce la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de cáncer. Lo interesante es que estos efectos son específicos para células de cáncer. El efecto de berberina sobre la invasión, migración, metástasis y angiogénesis están mediadas por la inhibición de la kinasa de adhesión focal (FAK), NF- κ B, metaloproteinasa-2 (MMP-2) y metaloproteinasa-9 (MMP-9), reducción de la expresión de COX-2, prostanglandina E y receptor de prostanglandina E, la desregularización del factor inducible por hipoxia -1 (HIF-1) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y mediadores pro-inflamatorios (Hu y col, 2009; Hamsa y Kuttan, 2012).

Dentro de los diferentes alcaloides aislados del género *Argemone*, el alcaloide sanguinarina ha sido otro de los compuestos mayoritariamente aislados en este género, así como sus estudios son muy amplios. Los diferentes estudios que se han realizado sobre sanguinarina han demostrado que este compuesto presenta múltiples actividades biológicas, la mayoría de éstas similares a las presentadas por el alcaloide berberina.

Sanguinarina es un alcaloide benzofenantridina, posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiagregantes y antiinflamatorias y se utiliza para el control de la esquistosomiasis. Estudios *in vitro* indican que este alcaloide presenta efectos anticancerígenos en concentraciones de menos de 10 μM en la mayoría de los casos (Ahsan y col., 2007). Dentro de los mecanismos de acción de este alcaloide, se ha observado que induce la detención del ciclo celular en diferentes fases y apoptosis en una variedad de células cancerosas (Lu y col., 2012).

Estructuralmente berberina y sanguinarina son muy similares (Fig. 15A y 15B, respectivamente), son moléculas planas bidimensionalmente, no presentando impedimento estérico para actuar con los diferentes componentes biológicos en la célula. Es probable que por su similitud química ambos presenten similares actividades biológicas y mecanismos de acción en las diferentes líneas celulares cancerosas en las que se han estudiado. Haciendo una comparación con argemonina (Fig. 15C), se puede ver que ambos alcaloides mencionados anteriormente son diferentes estructuralmente. Argemonina presenta en su molécula un pequeño “doblez” (formando un ángulo) en la región del grupo N-metilo (N-CH_3), dándole un poco de impedimento estérico para interactuar con componentes celulares como por ejemplo el ADN, con respecto a las estructuras de berberina y sanguinarina. Además de las diferencias de los componentes estructurales evidentes entre las moléculas, que le puede proporcionar a argemonina un mecanismo de acción posiblemente diferente.

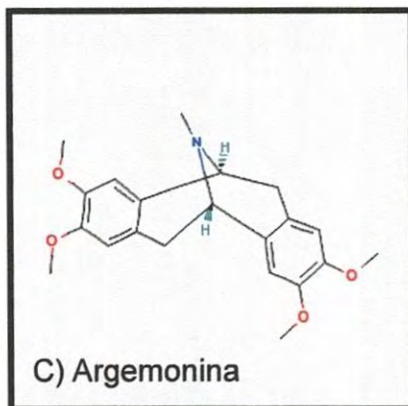
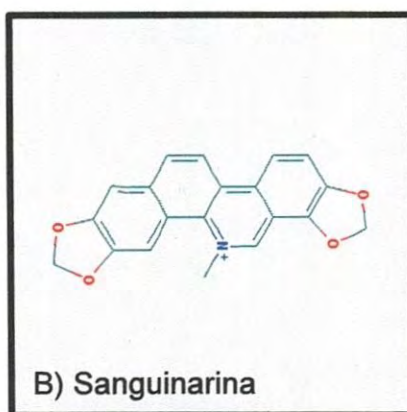
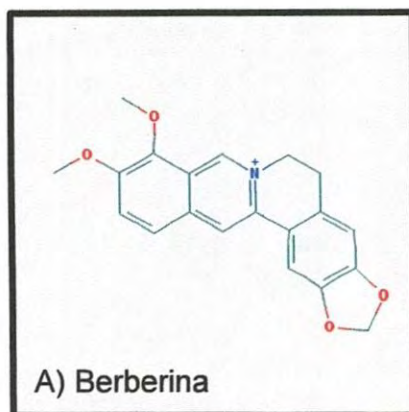


Figura 15. Estructuras 2D de los alcaloides A) berberina, B) sanguinarina y C) argemonina. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Como se mencionó anteriormente, los estudios sobre argemonina son escasos, sin embargo con los resultados obtenidos en este estudio, mediante la observación de los cambios morfológicos en las diferentes líneas celulares expuestas a este compuesto, podemos determinar de manera preliminar un posible mecanismo de acción. Fink y Cookson en el 2005, propusieron un diagrama (Fig. 16) donde muestran las diferentes vías de muerte celular y características de cada una de estas presentes en células eucariotas: apoptosis, autofagia, oncosis, piroptosis. Basándonos en esto y vinculándolo con lo observado en los ensayos de actividad antiproliferativa del compuesto argemonina, se puede proponer el mecanismo de muerte celular de las diferentes líneas celulares expuestas a este compuesto.

En los ensayos de actividad antiproliferativa con el compuesto argemonina, se pudo observar que el comportamiento de este compuesto en las diferentes líneas celulares fue distinto. En la figura 17, se muestran los cambios característicos en las líneas celulares M12.C3F6 (Fig. 17A) y HeLa (Fig. 17B). Basándonos en los criterios mostrados por Fink y Cookson en el 2005, podemos observar en la línea celular M12.C3F6, la formación de vesículas dentro de la célula, no observándose los organelos celulares intactos. Con base en esta observación, se puede decir que esas vesículas pudieran corresponder a vesículas autofágicas, indicando que el mecanismo de muerte celular en la línea celular M12.C3F6 provocado por la exposición del compuesto argemonina es por autofagia.

En la línea celular HeLa se observa que el mecanismo de muerte celular es diferente al de la línea celular M12.C3F6. Las características observadas en la figura 17B son similares a la vía de muerte celular por apoptosis, según lo mostrado por Fink y Cookson. Se observan células con núcleo y citoplasma condensado, así como cuerpos apoptóticos.

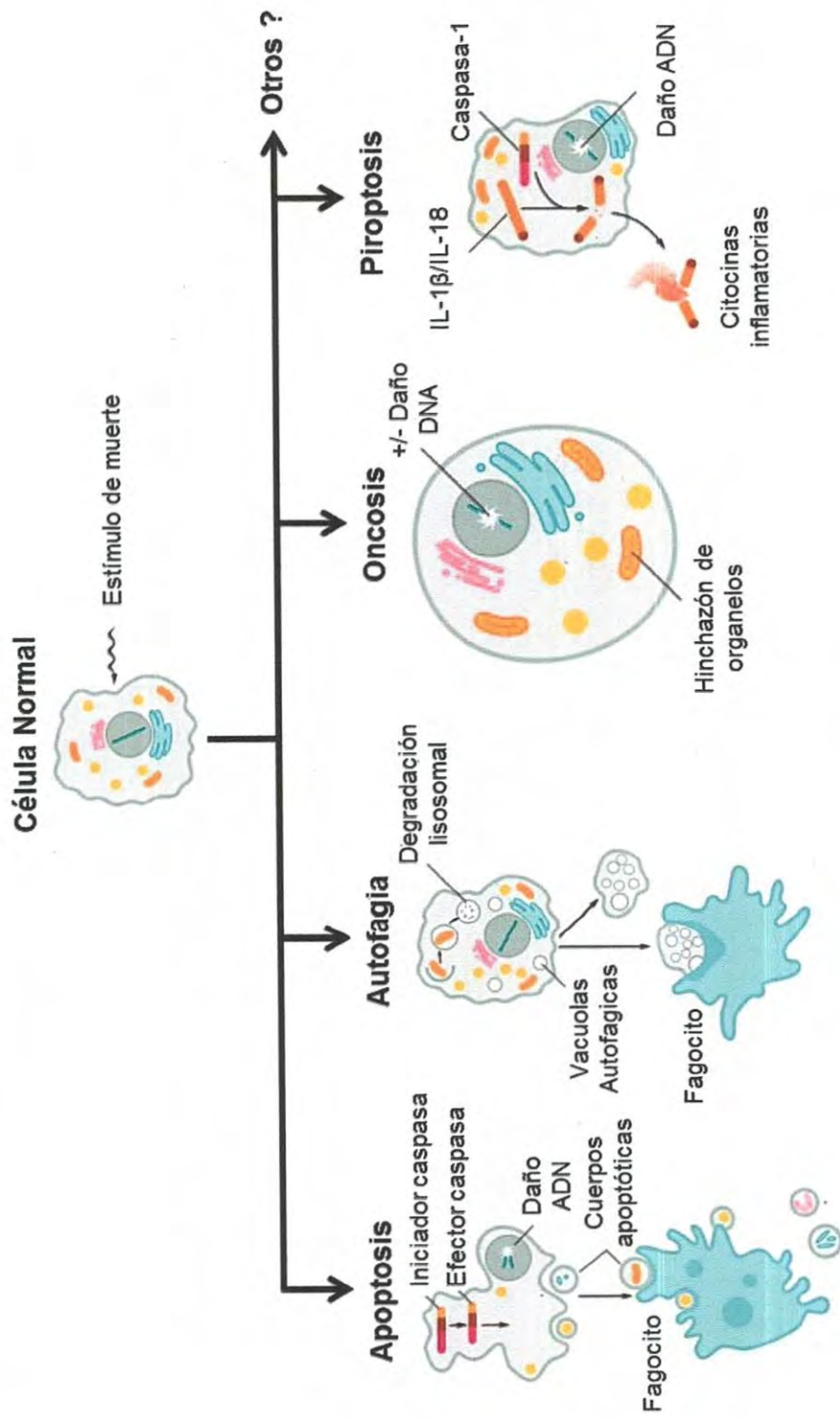
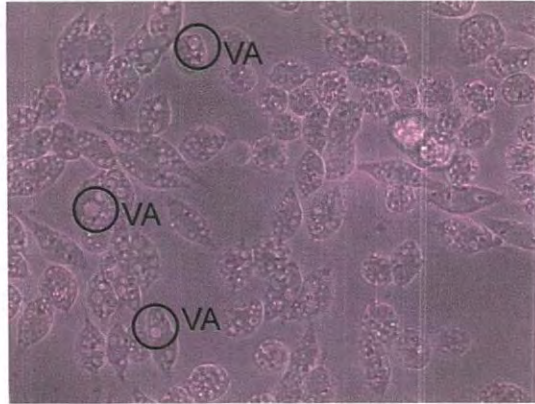


Figura 16. Vías que conducen a la muerte celular. Características y cambios morfológicos presentes en cada vía de muerte celular: apoptosis, autofagia, oncosis y piroptosis (Fink y Cookson, 2005).

A)



B)

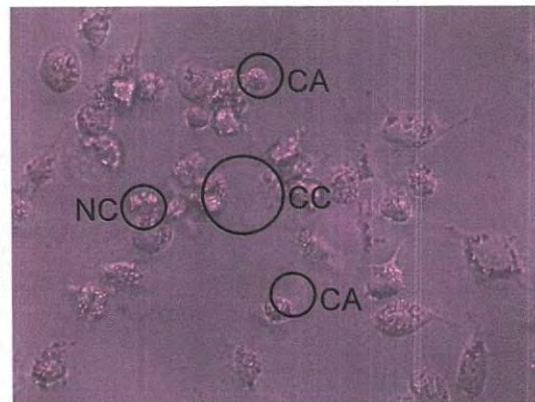


Figura 17. Actividad antiproliferativa del alcaloide argemonina (FAG-7A). A) Línea celular M12.C3F6 a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción. B) Línea celular HeLa a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción. Observación a las 48 horas en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos: núcleo condensado (NC), cuerpos apoptóticas (CA), vacuolas autofágicas (VA), citoplasma condensado (CC).

Por otro lado, las subfracciones obtenidas de la cromatografía de la fracción acetato de etilo, se monitorizaron nuevamente a través de TLC, lográndose reunir 7 fracciones (FAg-1 a la FAg-5B) (Fig. 18). De un análisis parcial por medio de RMN de ^1H de las muestras, se obtuvieron espectros que mostraban todas las señales a campo alto, entre 0 ppm y 6 ppm, que indican compuestos sencillos, constituidos por cadenas alifáticas. Haciendo una comparación con el espectro resultante de la muestra "M2", se observa que las señales presentadas en los espectros de RMN (anexos 7 y 8) de las muestras obtenidas de la fracción acetato de etilo, corresponden para compuestos de tipo ácido graso. Haciendo el análisis de los espectros de RMN de ^1H , se observan señales características entre cada uno de ellos, desplazadas entre 0 y 2.5 ppm, las cuales representan grupos estructurales sencillos de $-\text{CH}_3$ y CH_2- , entre 5 y 5.5 ppm, se observan señales características de un doble enlace ($\text{CH}=\text{CH}$), componente estructural de algunos ácidos grasos

Después de este análisis, se determinó que las muestras, presentaban señales de compuestos ácidos grasos y que se tenía una mezcla de varios de ellos. Por esta razón, se decidió analizar cada una de las muestras por GC-MS, y tratar de identificar los compuestos presentes en cada una.

El análisis por GC-MS, corroboró que en cada una de las muestras había presente una mezcla de ácidos grasos. Este análisis se hizo con la comparación del patrón de fragmentación de la muestra con el patrón de fragmentación propuesto por el programa NIS versión 17.9 (2001), biblioteca de una serie de compuestos en el sistema computacional conectado al GC-MS, los compuestos asignados presentes en cada muestra correspondieron a aquellos con un patrón de fragmentación con similitud superior al 80% comparado con el propuesto por el programa NIS.

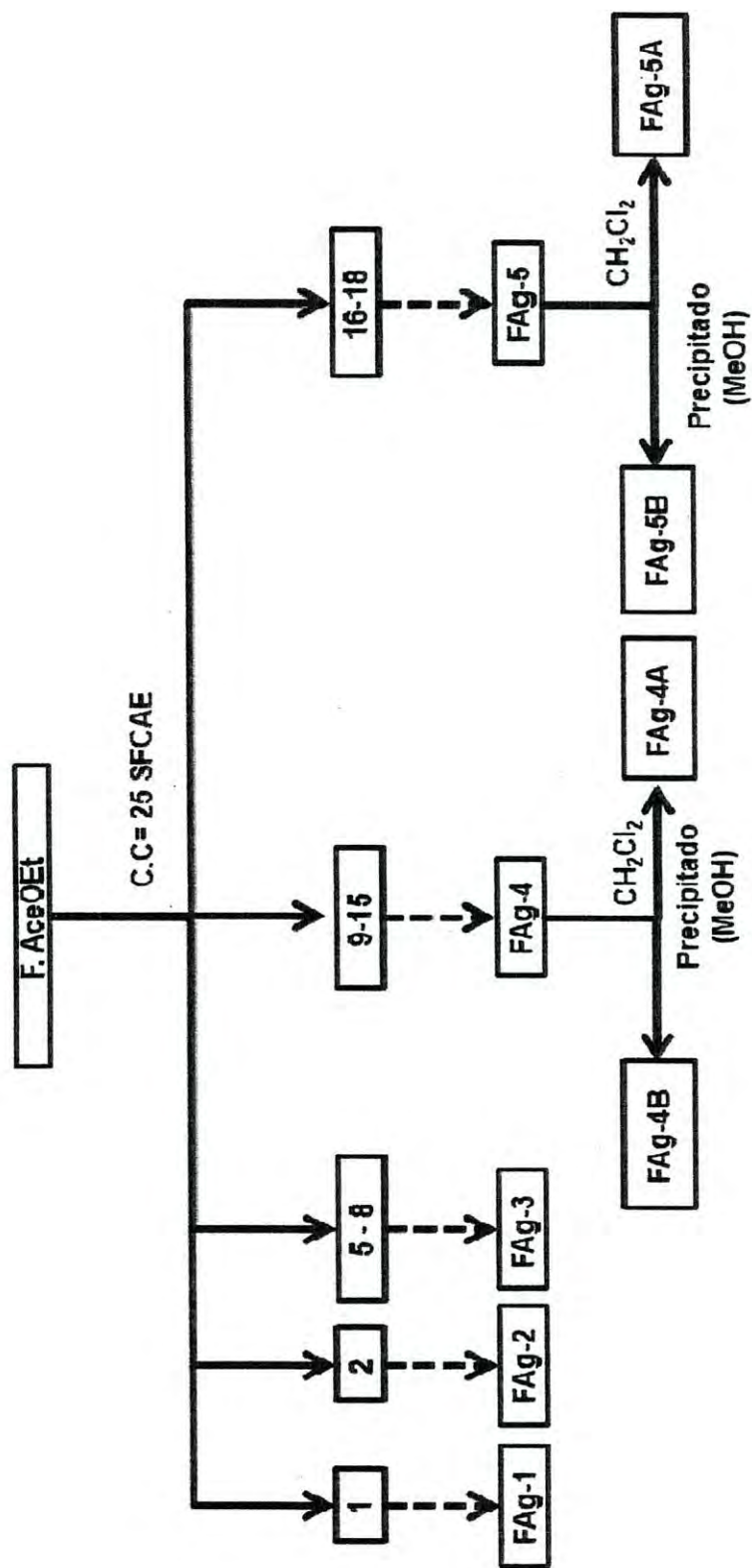


Figura 18. Agrupamiento de las muestras de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*, basándose en la monitorización por TLC.

Las muestras analizadas por GC-MS, FAg-1(Fig. 19), FAg-4A (Fig. 20) y FAg-5B (Fig. 21), fueron elegidas para la etapa de evaluación biológica, basándose en el patrón de señales mostrado en el cromatograma de GC-MS, siendo éstas las muestras que presentaron menos cantidad de compuestos en la mezcla. Los ácidos grasos esterificados más predominantes en estas muestras fueron: 1) el éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico (Anexo 12); 2) éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (Anexo13); 3) éster etílico del ácido linoleico (Anexo 14); 4) éster metílico del ácido hexadecanoico (Anexo 15); 5) éster etílico del ácido hexadecanoico (Anexo 14); 6) éster metílico del ácido7-octadecenoico (Anexo 16); 7) ácido 9,12 octadecadenoico (Anexo 17) y 8) ácido hexadecanoico (Anexo 18).

Los estudios epidemiológicos atribuyen un papel protector a ácidos grasos obtenidos de fuentes animales y vegetales frente a determinados tipos de cáncer. (Carrillo y col., 2012). Entre los mecanismos de acción se encuentra la supresión de la expresión de HER2 (erbB-2), un oncogén bien conocido por su implicación en la etiología, progresión y metástasis de distintos tipos de cáncer. Induce también apoptosis en células tumorales describiéndose como mecanismos implicados en la producción intracelular de especies reactivas o la activación vía caspasa 3 (Carrillo y col., 2012). Girao y colaboradores (1986), realizaron un estudio evaluando la influencia de los ácidos grasos de 18 carbonos sobre el crecimiento de la línea celular SP210 (mieloma de ratón). En este estudio, observaron que el ácido saturado (C18:0, ácido esteárico) no mostró un efecto sobre la inhibición del crecimiento en esta línea celular, sin embargo, observó un efecto contrario en los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos. Los ácidos grasos *Cis*-C18:3 omega 6 y *Cis*-C18:3 omega 3 presentaron un efecto inhibitorio en la línea celular SP210 (IC₅₀ de 15 mg/mL.) Pero la actividad mejoró, cuando evaluaron los ácidos grasos *Cis*- y *Trans*-C18:2 mostrando una IC₅₀ de 35 µg/mL, para ambos; y los ácidos grasos *Cis*- y *Trans*-C18:1, con una IC₅₀ de 35 y 25 µg/mL, respectivamente.

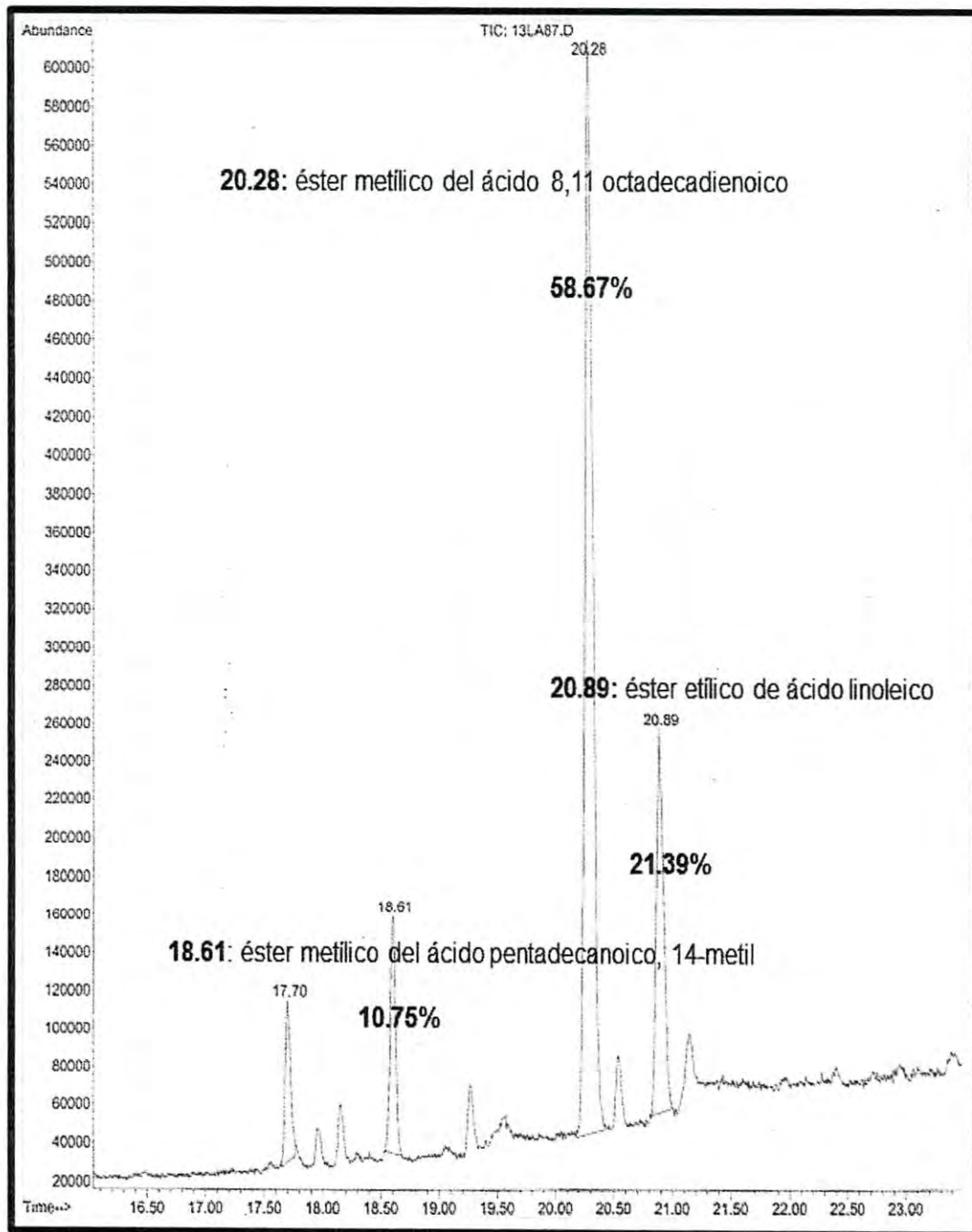


Figura 19. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (GC-MS) de la muestra FAg-1 de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilenta*.

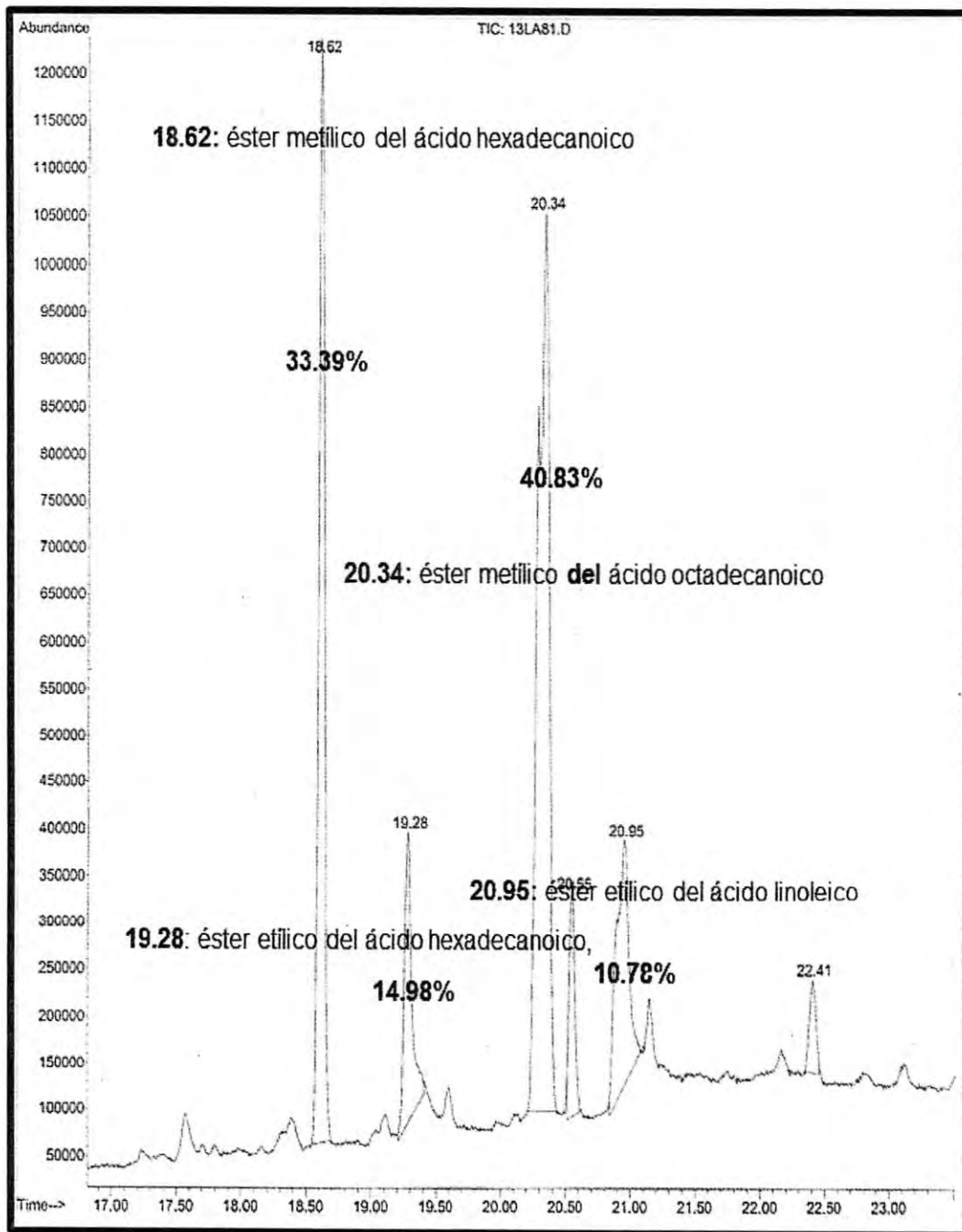


Figura 20. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (GC-MS) de la muestra FAG-4A de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

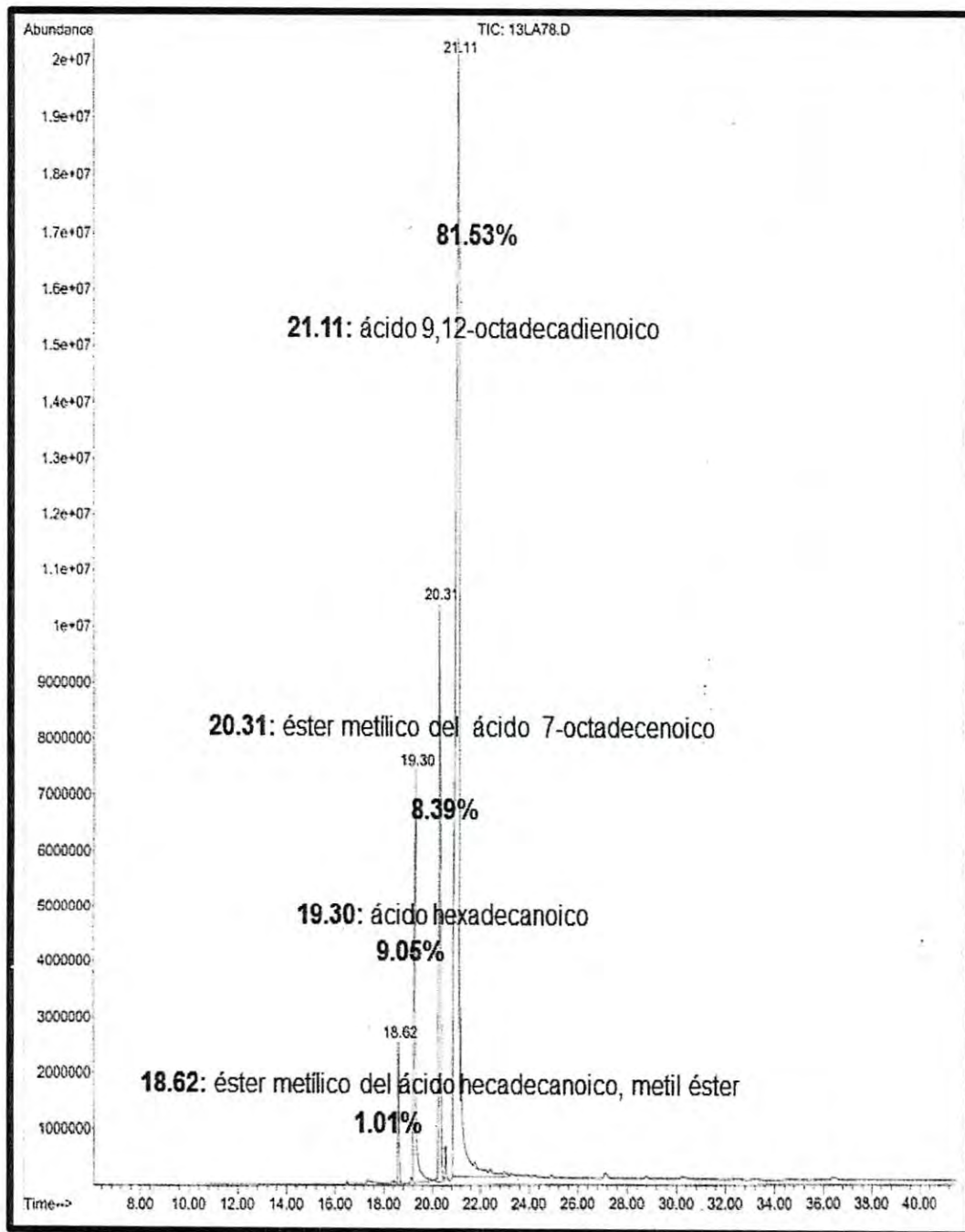


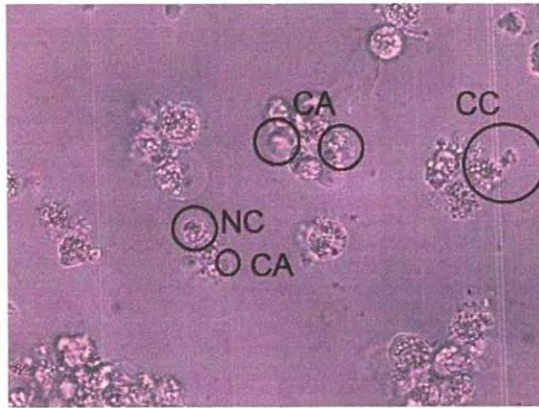
Figura 21. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (GC-MS) de la muestra FAg-5B de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilentia*.

Sin embargo, hay otros estudios que han demostrado el efecto estimulador del crecimiento de células cancerosas de algunos ácidos grasos. Hughes-Fulford y colaboradores (2001), realizaron estudios sobre el efecto de algunos ácidos grasos en el crecimiento de células de cáncer de próstata humano (PC-3), en donde se pudo observar, principalmente, que el ácido araquidónico (C-20:4) estimula el crecimiento de la línea celular PC-3, con un crecimiento del 122 % más. Pero también se demostró, que ácidos grasos como omega-3 y ácido eicosapentanoico presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células PC-3.

Como se observó en los ensayos de actividad antiproliferativa, las fracciones de ácidos grasos, FAg-4A y FAg-5B fueron las más activas en cada una de las líneas celulares. Vinculando los datos mostrados en la bibliografía y el diagrama propuesto por Fink y Cookson en el 2005, la vía de muerte celular provocada por estas fracciones es por apoptosis. En la figura 22 se pueden observar, para ambas fracciones, los cambios morfológicos presentados por la línea celular HeLa expuesta a estas fracciones fueron: núcleo y citoplasma condensado, y cuerpos apoptóticos.

Los estudios de actividades biológicas y la importancia de ácidos grasos extraídos de las especies del género *Argemone* son escasos. Es por eso, que los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiproliferativa de las fracciones de ácidos grasos, FAg-4A y FAg-5B, pueden ser el inicio para un estudio más amplio como potencial de inhibición de una amplia gama de células cancerosas humanas, así como también su importancia en la lucha contra el cáncer.

A)



B)

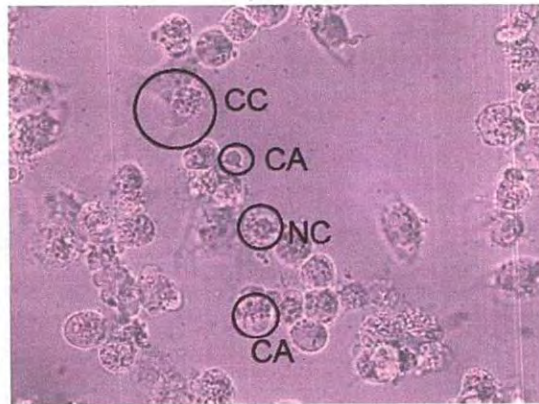


Figura 22. Actividad antiproliferativa de las fracciones de ácidos grasos: A) Línea celular HeLa a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción FAg-4A; B) Línea celular HeLa a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción FAg-5B. Observación a las 48 horas en microscopio invertido (40X). Cambios morfológicos: núcleo condensado (NC), cuerpos apoptóticos (CA), vacuolas autofágicas (VA), citoplasma condensado (CC).

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *Argemone gracilenta* y sus fracciones presentaron actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerosas, siendo la fracción de acetato de etilo la más activa. De manera importante este extracto y fracciones presentaron baja actividad antiproliferativa sobre la línea celular normal L-929.
- Se identificó a los alcaloides argemonina y berberina como parte de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Argemone gracilenta*. Argemonina mostró una actividad antiproliferativa muy alta, con valores de IC_{50} en las líneas celulares M12.C3F6 y RAW 264.7 de 2.8 ± 0.3 y 2.5 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$, en HeLa de 12.1 ± 1.7 $\mu\text{g/mL}$ y una IC_{50} mayor de 100 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular normal L-929.
- Se identificó una mezcla de: éster metílico del ácido octadecadienoico (40.85 %); éster metílico del ácido hexadecanoico (33.39 %); éster etílico del ácido hexadecanoico (14.98 %) y éster etílico del ácido linoleico (10.78 %). Mostrando una actividad antiproliferativa, con valores de IC_{50} en las líneas celulares M12.C3F6 de 16.81 ± 4.0 $\mu\text{g/mL}$, RAW 264.7 de 34.1 ± 5.8 $\mu\text{g/mL}$, en HeLa de 91.8 ± 7.6 $\mu\text{g/mL}$ y una IC_{50} mayor de 100 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular normal L-929.
- Se identificó una mezcla de los siguientes ácidos grasos: ácido 9,12-octadecadienoico (81.53 %); ácido hexadecanoico (9.05 %); éster metílico del ácido 7-octadecenoico (8.39 %); y éster metílico del ácido hexadecanoico (1.01 %). Mostrando una actividad antiproliferativa, con valores de IC_{50} en las líneas celulares M12.C3F6 de 24.9 ± 2.2 $\mu\text{g/mL}$, RAW 264.7 de 35.4 ± 10.1 $\mu\text{g/mL}$, en HeLa de 67.6 ± 56 $\mu\text{g/mL}$ y una IC_{50} de 85.1 ± 2.3 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular normal L-929.

- El mecanismo de muerte celular provocado por el alcaloide argemonina pudiera ser por apoptosis y autofagia, mientras que el provocado por las fracciones de ácidos grasos pudiera ser por apoptosis.
- Este estudio representa uno de los primeros resultados de actividad antiproliferativa de la especie vegetal *Argemone gracilentia*, catalogándola como productora de compuestos con actividad potencial contra el cáncer.

Recomendaciones

- Ampliar la gama de líneas celulares cancerosas de humano en la evaluación de la actividad antiproliferativa del alcaloide argemonina y de las fracciones compuestas por ácidos grasos.
- Utilizar una línea celular normal (sana) de humano como control.
- Determinar el mecanismo de acción (muerte celular) del alcaloide argemonina y de las fracciones compuestas por ácidos grasos, en células cancerosas.

BIBLIOGRAFÍA

- Achan, J. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, A. Tlbenderana, J. Baliraine, F. Rosemthal, P. D'Alessandro, U. 2011. Quinine, an old antimalarial drug in a modern word: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*. 10(144): 1-12.
- Adel-Lateif, K. Bogusz, D. Hoher, D. 2012. The role the flavonoids in the establishment of plants roots endosymbiosis with aubascular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant Signaling and Behavior*. 7(6): 636-641.
- Agustini-Costa, T. Vieira, R. Bizzo, H. Silveira, D. Gimenes, M. 2012. Chromatography and its applications. Ch. 8. Biochemistry, Genetic and Molecular Biology. Sasikumar Dhanaraso.
- Aiyegoro, O. Okoh, A. 2010. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10(21): 1-8.
- Andrade-Cetto, A. 2008. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal Ethnopharmacology*. 1-19
- Akihisa, T. Kojima, N. Kikuchi, T. Zasukawa, K. Tokuda, H. Masters, E. Monosroi, A. Monosroi, J. 2010. Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from Shea fat. *Journal of Oleo Science*. 59(6): 273-280.
- Avalos, A. Pérez, E. 2009. Metabolismos secundarios de plantas. Recursos Educativos (Biología), serie fisiología vegetal. 2(3): 119-145.
- Avile, D. 2009. Análisis de metabolitos secundarios de *Argemone mexicana*, *Bignonia unguis-catu*, *Diospyrus sinaloesnsis* y *Matenus pgyllanthoides*

con posible aplicación en farmacia y agricultura. Culiacán, Sinaloa. Tesis de licenciatura.

- Becerra, J. 2011. Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico de *Argemone ochroleuca*. Hermosillo, Sonora: Tesis de Maestría.
- Brossi, A. 1986. Alkaloids: chemistry and pharmacology. Academic Press. 29:35-38
- Bryant, J. Julkunen-Tiitto, R. 1995. Ontogenic development of chemical defense production. Journal of Chemical Ecology. 21: 883-896
- Camargo ,B. Wiesner, C. Diaz, C. Tovar, M. 2004. El cáncer: aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. 1:2-67.
- Carrasco, L. 2010. Aislamiento y caracterización parcial de los .compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de la fracción residual del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*. Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura.
- Carrasco, L. 2012. Identificación de los Compuestos Responsables de la Actividad Antiproliferativa de la Planta *Argemone pleiacantha*. Hermosillo, Sonora. Tesis de Maestría.
- Cichewicz, R. Kouzi, S. 2004. Chemistry, biological activity, ands chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and VIH infection Medicinal Research Reviews. 24(1): 90-114.
- Clark, W. Kahn, M. Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. Journal Organic Chemistry. 43(14): 1-3

- Coronado, E. 2012. Aislamiento y caracterización química de compuestos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37R del extracto diclorometánico de *Ambrosia confertiflora* y *Ambrosia ambrosoides*. Hermosillo, Sonora. Tesis de Maestría.
- Croteau, R. Kutchan, T. Lewis, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Ch. 24. 1250-1318
- Devi K. 2002. HPLC method for the determination of sanguinarine in *Argemone*-adulterate edible oils. *Journal of Planar Chromatography and Modern TLC.*, 15:223-225.
- Dickschat, J. 2011. Biosynthesis and function of secondary metabolites. *Beilstein Journal Organic Chemistry*. 7:1620-1621
- Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones generales 2004-2010. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>>
- Douglas, H. Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*.100:57-70
- Eom, K. Kim, H. So, S. Park, R. Kim, T. 2010. Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 3(10) 1644-1649.
- Fernández, J. 2005. Estudio químico biodirigido de la actividad antiasmática de *Argemone platyceras*. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Doctorado.
- Fink, S. Cookson, B. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 1907-1916.

- Gali, K. Ramakrishnan, G. Kothai, R., Jaykar, B. 2011. In-vitro anti-cancer activity of methanolic extract of leaves of *Argemone Mexicana* Linn. International Journal of PharmTech Research. 3(3): 1329-1333
- Giroa, L. Rock, A. Cantrill, R. Davidson, B. (1986) The effect of C18 fatty acids on cancer cells in culture. Anticancer Research. 6(2): 241-244.
- García, D. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes. 27: 1-12.
- Hamsa, T. Kuttan, G. 2012. Antiangiogenic activity of berberine is mediated through the downregulation of hypoxia-inducible factor-1, VEGF, and proinflammatory mediators. Drug and Chemical Toxicology. 35(1): 57-70.
- Ho, Y. Yang, J. Li, T. 2009. Berberine suppresses *in vitro* migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitors of FAK, IKK, NF-kB, u-PA and MMP-2 and -9. Cancer Letters 279(2):155-162.
- Huges-Fulford, M. Chen, Y. Tjandrawinata, R. 2001. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3. Carcinogenesis. 22(5): 701-707.
- Indranil B. 2006. Antibacterial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria. Memorias do Instituto. 101(6):645-648.
- INEGI. (2012). "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer". Recuperado el 04 de febrero de 2012, de Instituto Nacional De Estadística y Geografía (INEGI): <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2750&ep=27>.

- Johnson, G., Morenò, S., López, E. 1996. Compendio fitoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Killiam, G. 2006. Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Revista Electrónica de Divulgación de las Ciencias Farmacéuticas. 7:1-6.
- Kennedy, D. Wightman, E. 2011. Herbal extracts and phytochemicals plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. American Society for Nutrition. 2: 32-50.
- Kouznetsov, V. Vargas, L. Tibaduiza, B. Ochoa, C. Montero, D. Nogal, J. Fernández, C. Muelas, S. Gómez-Barrio, A. Bahsas, A. Amaro, L. 2004. 4-Aryl(benzyl)amino-4-heteroarylbut-1-enes as building blocks in heterocyclic synthesis. 4[1]. Synthesis of 4,6-dimethyl-5-nitro(amino)-2-pyridylquinolines and their antiparasitic activities. Archiv der Pharmazie. 337: 127-132
- Kucukbuyac, N. Adiguzel, N. Ozkan, S. Tosun, F. 2010. Alkaloid profiles and biological activities of different *Sophora jaubertill* extracts. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 7(1):1-8
- Leyva, P. 2010. Evaluación de la actividad antiproliferativa y actividad antioxidante de *Argemone pleiacantha*, Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura
- López-Escudillo, R. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Hermosillo, Sonora: Ed. Universidad de Sonora.
- López, E., Hinojosa, G. 1998. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.

- Lu, J. Bao, J. Chen, X. Huang, M. Wang, Y. 2012. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-12
- Manosvoi, A., Jantrawut, P., Tushihiro, A., Hiroyuki, A., Manusvoi, J. 2010. Biological activities of phenolic compounds isolated from galls of *Terminalia chebula Retz* (Combretaceae). Natural Products Research. 1915-1926
- Mantena, S. Sharman, D. Katiyar, S. 2006. Berberine, a natural product induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. Molecular Cancer Therapeutics. 5(2):296-308.
- Mazid, M. Khan, T. Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine. 3(2): 232-249.
- Mohammed, A. 2006. Study of the alkaloids of *Argemone ochroleuca* growing in Saudi Arabia. Arabia. King Saud University Tesis de Maestría.
- Muñetón, P. 2009. Plantas medicinales un complemento vital para la salud de los mexicanos. Revista Digital Universitaria. 10:1-14.
- Nagappan, T. Ramasamy, P. Abdul, M. Chandra, T. Vairappan, C. 2011. Biological Activity of carbazole alkaloids and essential oil of *Murraya kuenigii* against antibiotic resistant microbes and cancer cells lines. Molecules. 16(11): 9651-9664.
- Navarro, V., Villareal, M., Rojas, G. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for treatment of infectious diseases. Journal of Ethnopharmacology. 53:43-147.
- Nocito, F. Pirovano, L. Cocuca, M. Sacchi, G. 2002. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. Plant Physiology. 129:1872-1879.

- Park, H. Bergeron, E. Senta, H. Guillemette, K. 2010. Sanguinarine induce apoptosis of human osteosarcoma cells through the extrinsic and intrinsic pathways. *Revista de Bioquímica*. 399(3): 446-451.
- Patil, J. Kim, J. Jayaprakasha, G. 2010. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology*. 645:70-78.
- Patocka, J. 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine significance. *Journal of Applied Biomedicine*. 1: 7-12.
- Pavlovic, R., Mladenovic, B., Zdravkovic J., Zdravkovic M. 2010. Phenolic compounds and biological activity of *Capsicum annum* L. *African Journal of Biotechnology*. 11(45): 10446-10450.
- Peng, P. Kuo, W. Tseng, H. Cho, F. 2008. Synergistic tumor-killing effect of radiation and berberine combined treatment in lung cancer: the contribution of autophagic cell death. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 70:529-549.
- Pereira, C. Rosa, P. Meireles, A. 2007. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. *Technical and Economical Analysis*. 1-6.
- Pérez, I. 2006. Metabolitos secundarios aislados de las raíces y hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K. Pachuca de Soto, Hidalgo. Tesis de licenciatura.
- Quezada, M. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Publicación de la Universidad Autónoma Metropolitana*. 5-12.
- Ramakrishna, A. Aswathanarayana, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6(11):1720-1731

- Ramírez, C. 2008. Obtención y caracterización de compuestos bioactivos a partir del hongo microscópico *Idriellas sp.* Iztapalapa, D.F. Tesis de doctorado.
- Rauha J. 2001. The search for biological activity in finnish plant extracts containing phenolic compounds. Filandia. Tesis doctorado.
- Ríos, Y. Otero, A. Muñoz, D. Echeberry, M. Robledo, S. Yetes, M. 2008. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas. 37(2): 200-211.
- Rodríguez, C., Medina, G., Cabrera, D., Díaz, E. 2002. Medicina natural y tradicional: conocimientos y aplicaciones. Revista Cubana de Enfermería. 18(3):138-143.
- Rojas, M. 2009. Tratado de medicina tradicional mexicana. 3era edición. Editorial Tlahui. México. 1-22
- Schlaepfer, L. Mendoza, J. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 41:18-27
- Slaninová, I. Pencíková, K. Urbanová, J. Slanina, J. Táburská, E. 2013. Antitumor activities of sanguinarine and related alkaloids. Phytochemical reviews. 1-9
- Sun, Y. Xun, K. Wang, Y. Chen, X. 2009. A systematic review of the anticancer properties of berberine, an natural product from Chinese herbs. Anti-cancer Drugs. 20(9):757-769.
- Umthong, S. Phuwapraisirisan, P. Puntong, S. Chanchao, C. 2011. *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell. BMC Complementary and Alternative Medicine. 11(37): 1-8.

- Valares, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Badajoz. Universidad de Extremadura Tesis de doctorado.
- Valencia del Toro, G. Garín, M. 2010. Manual de prácticas de productos naturales. Primera Edición. México, D.F.
- Velázquez, C. Navarro, M. Angulo, A. Robles, R. Robles, Z. Lugo, A. Goycoolea, F. Velázquez, E., Astiazaran, H. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities on Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1747-1756.
- Wahid, U. Ahmed, E. Abdelkader, A. Aly, H. 2011. Biological activity of flavol glycosides from *Remux dentatus* plant, an *Egyptian xerophyte*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(17): 4239-4293.
- Walter, M. Marchesan, E. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54:371-377.
- Wang, N. Feng, Y. Zhu, M. Tsang, C. Man, K. Tong, Y. Tsao, S. 2010. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cell: the cellular mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*. 111:1426-1436
- Wuyts, N. De- Waele, D. Swennen, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata grandr naine*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 308-314
- Youte, J. Barbier, D. Gnecco, D. Marazano, C. 2004. An enantioselective access to 1-alkalyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. Application to a new synthesis of (-)-argemonine. *Journal of Organic Chemistry*. 69(8):2737-2740..
- Yuh-Chwen, C. Fang-Rong, C. Ashraf, T. Pei-Wen, H. Yang-Chang, W. 2003. Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from

Argemone Mexicana. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 23: 521-526

Zong-Fang, L. Zhi-Dong, W. Yuan-Yuan, J. Shu, Z. Chen, H. Jun, L. Xian-Ming, X. 2009. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with *Chrysanthemum indicum* extract. World Gastroenterology 15(36): 4538-45

ANEXO 1

Metodología para Realización del Perfil Fitoquímico

Flavonoides

Se disolvieron 0.5 mL del extracto en 2 mL de etanol absoluto y se dividió en tres tubos . El tercero será el testigo.

- 1) Reacción de Shidona. Se le adicionó 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado; una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. En caso de haber cambio, se coloca un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja a rojo, indica la presencia de flavonas; si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.
- 2) Reacción de hidróxido de sodio al 10%. Se adicionaron 3 gotas de hidróxido de sodio y si se forma una coloración de amarillo a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas; de café a naranja de flavonoles, púrpura a rojizo de chalconas y azul de antocianinas.

Saponinas

- 1) Reacción de Rosenthaler. A una porción del extracto concentrado, se le adicionaron dos gotas del reactivo Rosenthaler y estratificado con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Si se forma una coloración violeta, se considera positiva para las saponinas triterpenoides.

Taninos

A 1 mL del extracto se le adicionaron 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, calentar a ebullición por un minuto, enfriarlo y filtrarlo. Se dividió el filtrado en cuatro tubos de ensaye, el cuarto se utilizó como testigo (control negativo)

- 1) Reacción de gelatina. Se adicionó 2 gotas de reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica presencia de taninos.

- 2) Reacción de cloruro férrico. Se adicionó una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloraciones de azul a negro indica la presencia de derivados de ácido gálico y coloraciones verdes de derivados de catecol.
- 3) Al tercer tubo, se agregó una gota de ferricianuro de potasio al 1%. La formación de una coloración azul, indica la presencia de compuestos fenólicos.

Quinonas

Se colocaron 2 mL del extracto en una cápsula de porcelana y se concentra a sequedad, posteriormente en ello se divide el extracto en tres porciones.

- 1) Reacción de hidróxido de amonio. Se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.
- 2) Reacción con ácido sulfúrico. Se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción del extracto. La formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas.
- 3) Reacción de Borntrager. Se diluyó una porción del extracto con 3 mL de agua destilada, se filtró, al líquido filtrado se le añadieron 3 mL de cloroformo. Se le elimina la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionó 2 mL de hidróxido de potasio al 5%. Un color rojo indica la presencia de benzoquinonas; si es amarillo verdoso, se le adiciona 1 gota de peróxido de hidrógeno al 6%. Si la coloración cambia a roja, se considerará positiva para derivados de antronas.

Cumarinas

- 1) Reacción de hidróxido de potasio al 0.5 M. Evaporar 5 mL del extracto. Se disolvió el residuo en 1 mL de agua hirviendo. Se aplicó con microcapilar 2 manchas en papel filtro, aplicar en una de las dos manchas 1 gota de KOH 0.5 M. Observar fluorescencia a longitud de onda de 366 nm

Alcaloides

Se tomó una porción del extracto y se le adicionó entre 5 mL a 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, se calentó a ebullición por cinco minutos, se enfria y filtra. Posteriormente el filtrado se dividió en 2 tubos de ensaye.

- 1) Reacción de Wagner. Se agregaron 2 gotas del reactivo de Wagner. Se considera positivo la formación de un precipitado color marrón.
- 2) Reacción de Mayer. Se Agregaron 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer, se considera positivo la formación de precipitado blanco.

Emoides

- 1) Reacción con hidróxido de amonio al 25%. Se evaporaron 5 mL del extracto. Se disolvió el residuo en 1 mL de hidróxido de amonio al 25%. Se considerará positivo la formación de una coloración rojiza.

ANEXO 2

Reactivo de Rosenthaler: 0.5 g de vainillina a 50 mL de etanol absoluto

Reactivo de gelatina: 0.5 g de grenetina pura aforado a 50 mL de agua destilada.

Cloruro férrico al 1%: 0.5 g de cloruro férrico aforado a 50 mL de agua destilada.

Ferrocianuro de potasio al 1%: 0.5 g de ferrocianuro de potasio en 50 mL de agua destilada.

Hidróxido de potasio al 5%: 2.5 g de hidróxido de potasio a 50 mL de agua destilada.

Reactivo de Wagner: 1.27 g de yodo (sublimado) y 2 gotas de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada, aforar la solución en un matraz volumétrico de 100 mL.

Reactivo de Mayer: 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua destilada y 5 de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada. Mezclar las dos soluciones y aforar en un matraz de 100 mL. Antes de utilizar el reactivo, se debe acidular con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico concentrado.

ANEXO 3

Cromatografía en columna (silica gel 60 de 200-400 mesh) con vacío (cromatografía flash) de la fracción hexánica de *Argemone gracilentia*.

Sufracciones cromatograficas	Elusiones	Fase Móvil
SFCH1	1-2	Hexano 100%
SFCH2	3-4	Hex:Acet (9:1)
SFCH3	5-8	Hex:Acet (9:1)
SFCH4	9-15	Hex:Acet (9:1)
SFCH5	16-18	Hex:Acet (9:1)
SFCH6	19-45	Hex:Acet (9:1)
SFCH7	46-175	Hex:Acet (9:1)
SFCH8	176-250	Hex:Acet (8:2)
SFCH9	251-285	Hex:Acet (7:3)
SFCH10	286-322	Hex:Acet (7:3)
SFCH11	323-365	Hex:Acet (1:1)
SFCH12	366-402	Hex:Acet (1:1), Hex:Acet (4:8)
SFCH13	403-475	Hex:Acet (2:8), Hex:Acet (1:9), Acet
SFCH14	476-488	Acet:MeOH (9:1)
SFCH15	489-490	Acet:MeOH (9:1)
SFCH16	491-510	Acet:MeOH (7:3)
SFCH17	510-554	Acet:MeOH (6:4), MeOH, MeOH:H ₂ O (8:2)

Hexano (Hex); acetato de etilo (Acet); metanol (MeOH); agua (H₂O).

ANEXO 4

Cromatografía en columna (silica gel 60 de 200-400 mesh) de la fracción acetato de etilo del extracto metanólico de *Argemone gracilenta*

Sufracciones Cromatográficas	Elusiones	Fase Móvil
SFCAE1	1	CH ₂ Cl ₂ : Hex (2:8)
SFCAE2	2-3	CH ₂ Cl ₂ : Hex (1:1)
SFCAE3	4	CH ₂ Cl ₂ : Hex (1:1)
SFCAE4	5	CH ₂ Cl ₂ : Hex (6:4)
SFCAE5	6	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE6	7	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE7	8	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE8	9	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE9	10-12	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE10	13	CH ₂ Cl ₂ : Hex (8:2)
SFCAE11	14-15	CH ₂ Cl ₂ (100 %)
SFCAE12	16	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.8:0.2)
SFCAE13	17-18	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.8:0.2)
SFCAE14	19	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.8:0.2)
SFCAE15	20-22	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.8:0.2), (9.5:0.5)
SFCAE16	23	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.5:0.5)
SFCAE17	24-25	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.5:0.5)
SFCAE18	26	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.3:0.7)
SFCAE19	27	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9.3:0.7)
SFCAE20	28-29	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)
SFCAE21	30	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)
SFCAE22	31	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)
SFCAE23	32-35	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (8.5:1.5)
SFCAE24	36-38	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)
SFCAE25	39-40	MeOH (100 %)

CH₂Cl₂ : Diclorometano ; Hex: Hexano; MeOH: Metanol

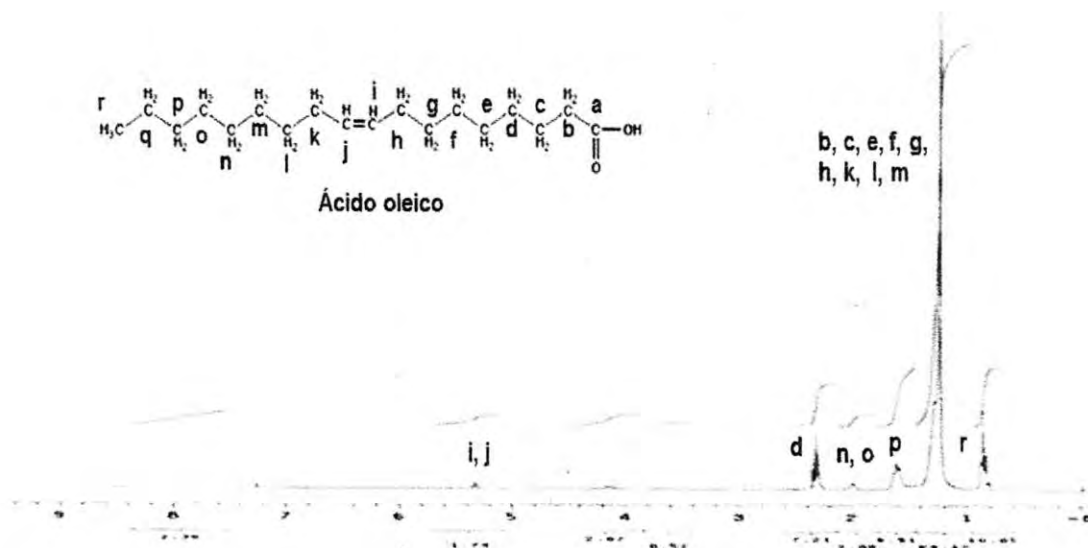
ANEXO 5

Cromatografía en columna (sílica gel 60 de 200-400 mesh) de la muestra (SFCAE-23 + M15).

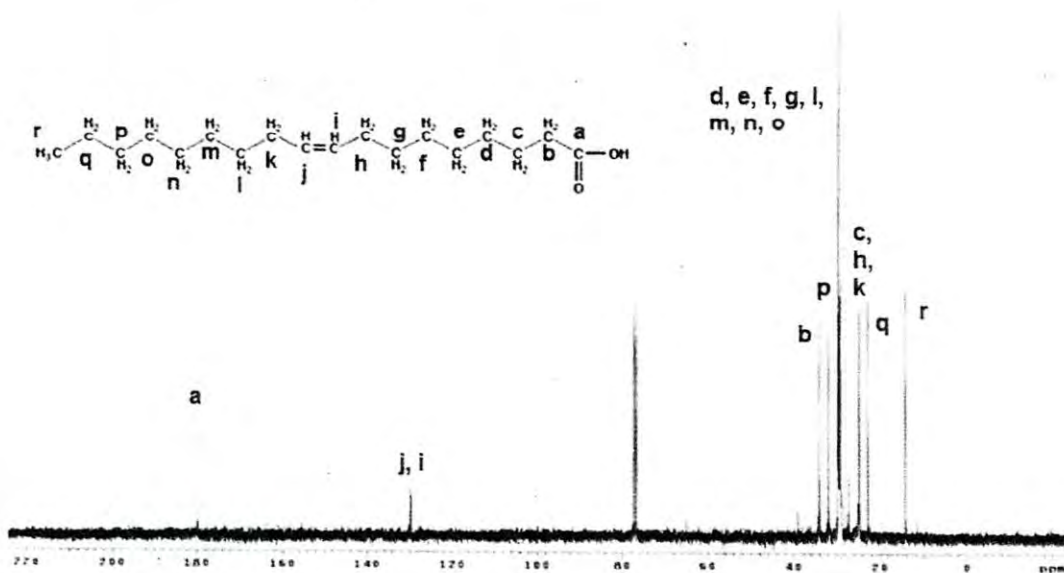
Subfracciones Cromatograficas	Eluciones	Fase Móvil
1	1-3	CH ₂ Cl ₂ :Hex (80:20)
2	15-18	CH ₂ Cl ₂ (100)
3	19-20	
4	26-29	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)
5	30-35	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)
6	36	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)
7	37-40	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (85:15)

CH₂Cl₂ : Diclorometano ; Hex: Hexano; MeOH: Metanol

ANEXO 6

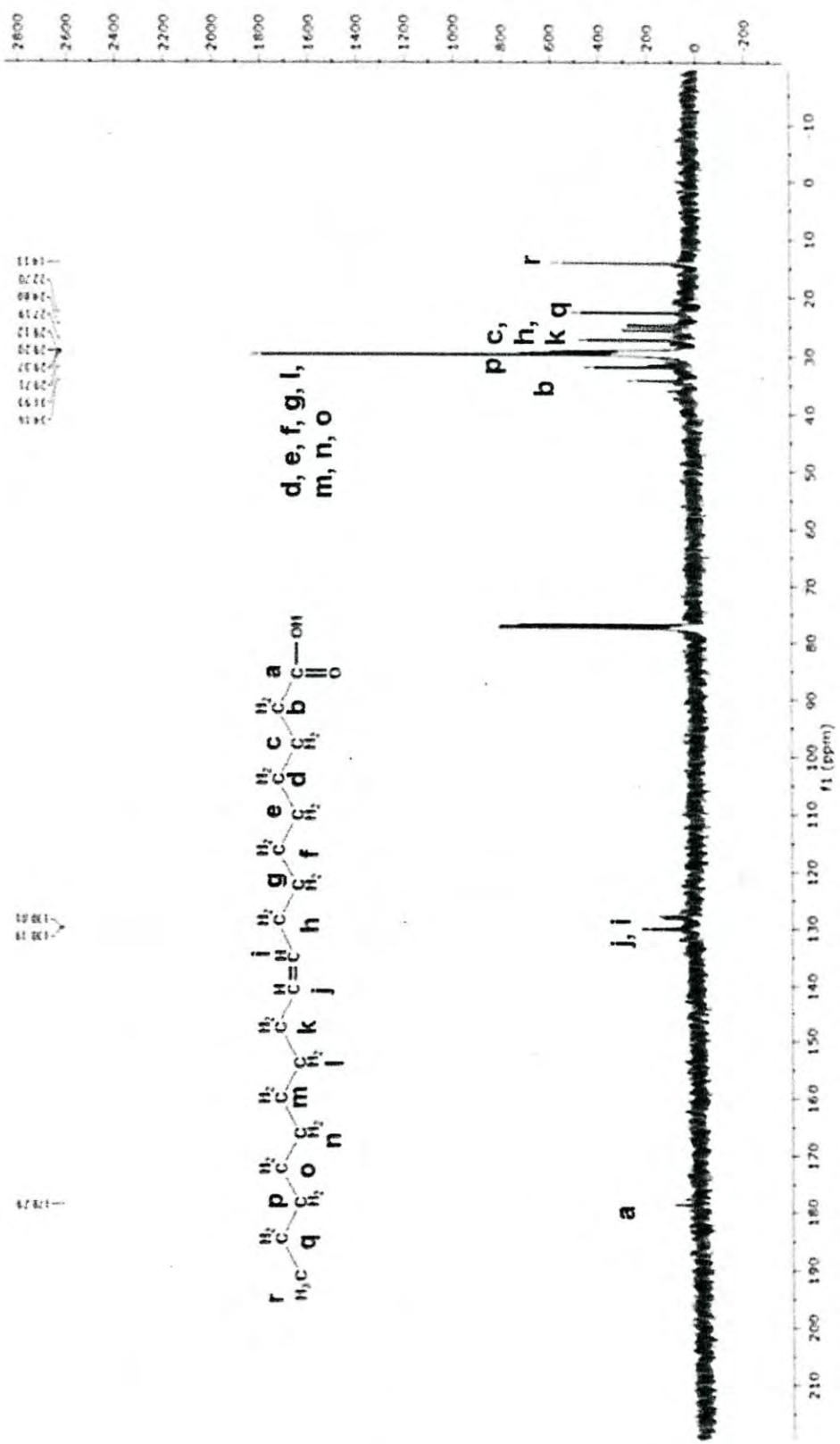


Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ del ácido oléico



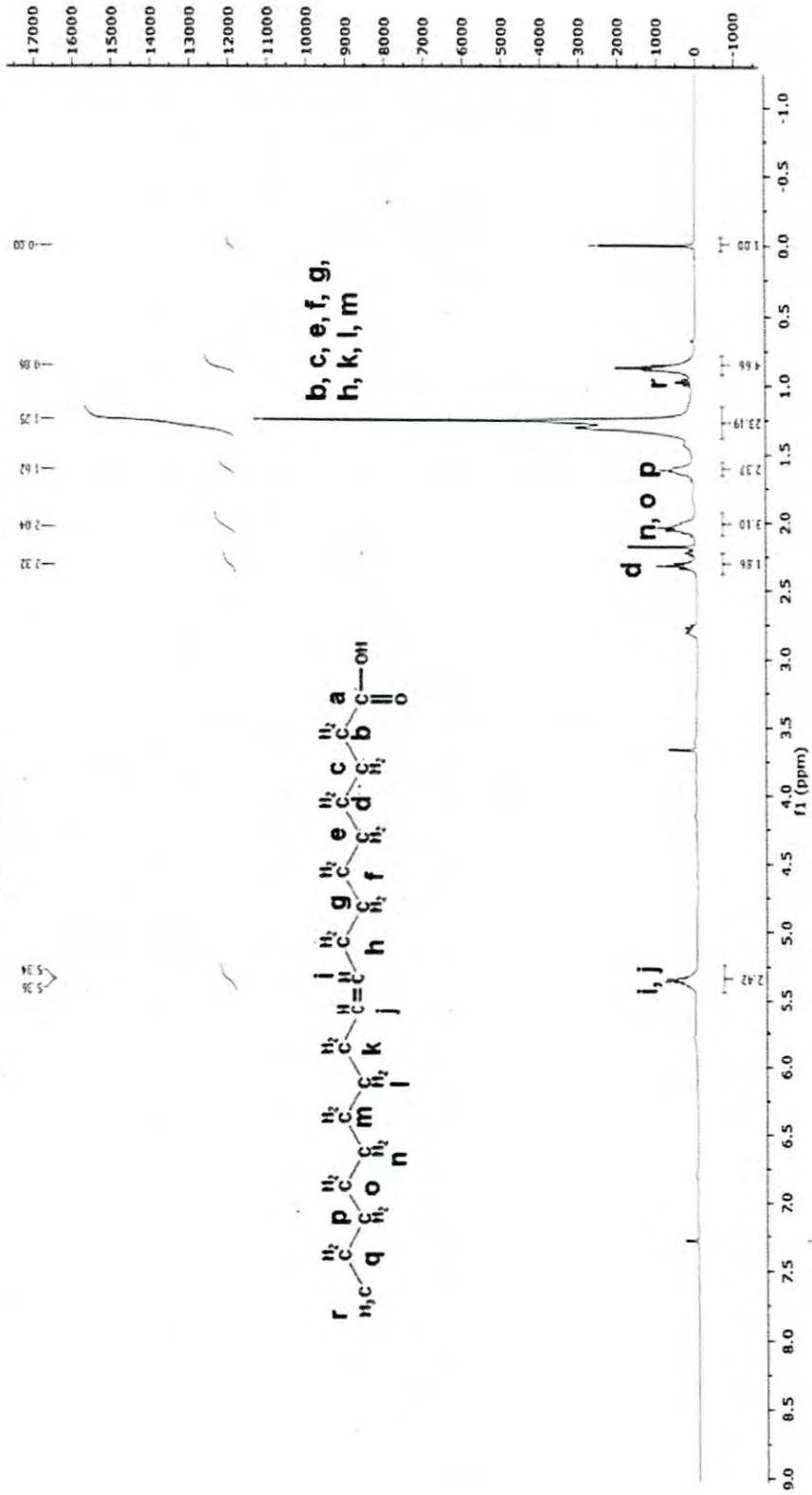
Espectro de RMN ¹³C en CDCl₃ del ácido oléico (Ramírez, 2008)

ANEXO 7



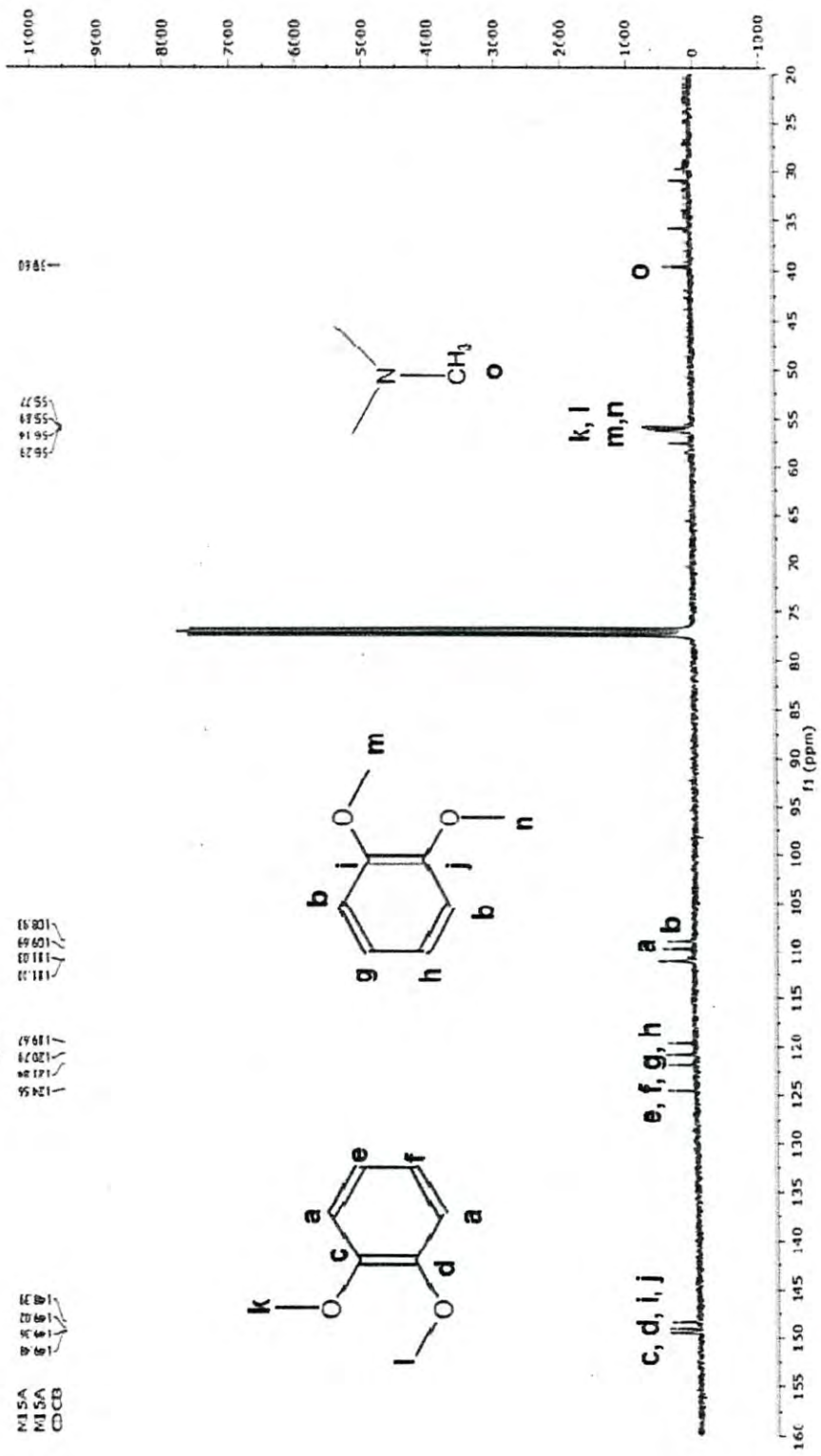
Espectro de RMN ¹³C en CDCl₃ de la muestra "M2" (ácido oléico).

ANEXO 8



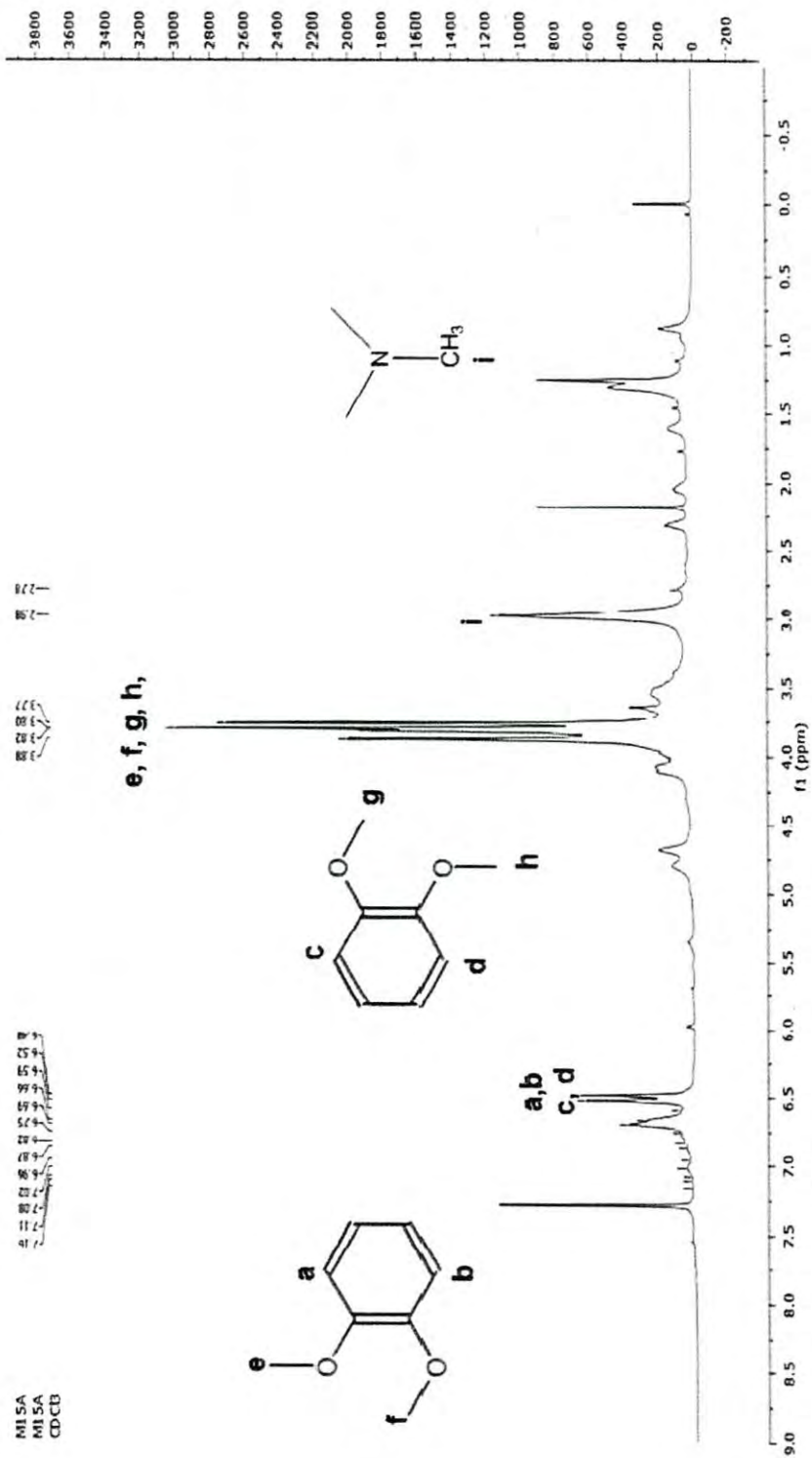
Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 de la muestra "M2" (ácido oleico)

ANEXO 9



Espectro de RMN ^{13}C en CDCl_3 de la muestra "M15"

ANEXO 10



Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ de la muestra "M15"

ANEXO 11

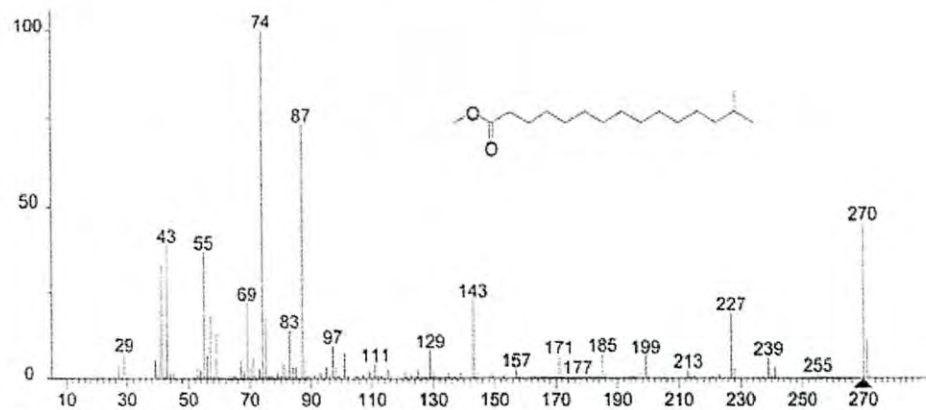
Actividad antiproliferativa de drogas de referencia

Droga Control	IC ₅₀ (µg/mL)			
	M12.C3F6	RAW 264.7	HeLa	L-929
Doxorrubicina	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.3	> 200
5-fluoracil	1.9 ± 0.6	0.6 ± 0.1	>130.08	>130.08
Colchicina	> 39.94**	0.06 ± 0.2	> 39.94 **	>39.4**

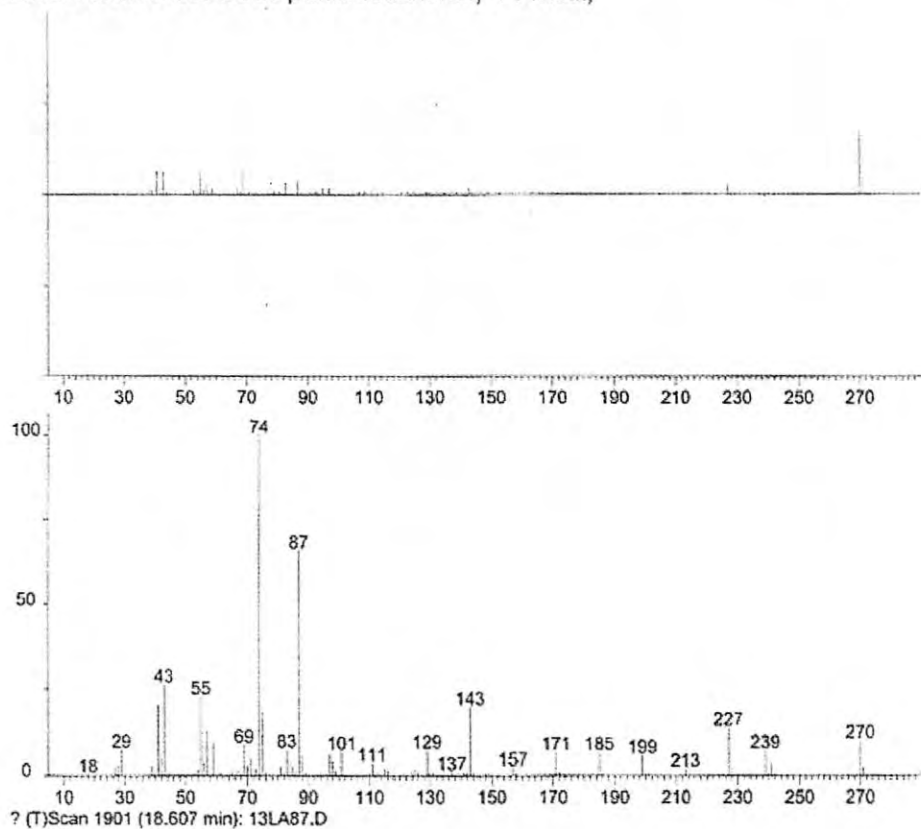
Los valores de IC₅₀ de cada una de las drogas probadas (µg/mL) representan el promedio de, por lo menos, tres experimentos independientes ± la desviación estándar. (Becerra, 2011)

** Concentración máxima probada a la cual no se alcanzaron valores de IC₅₀

ANEXO 12

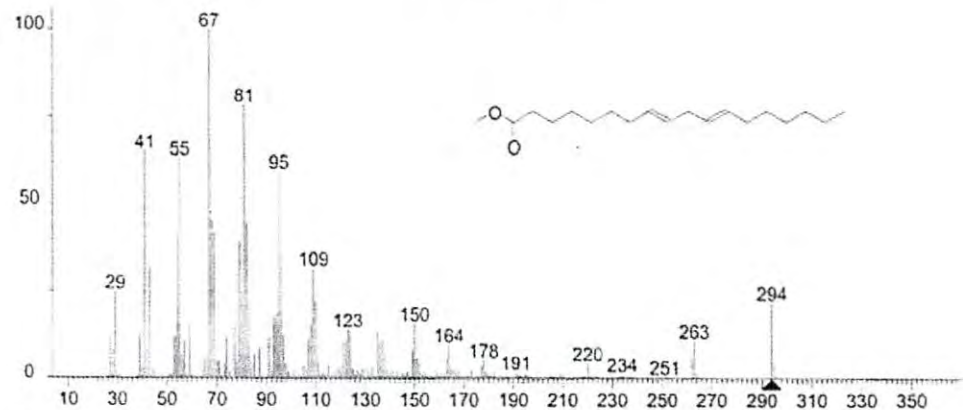


Éster metílico del ácido pentadecanoico, 14-metil,

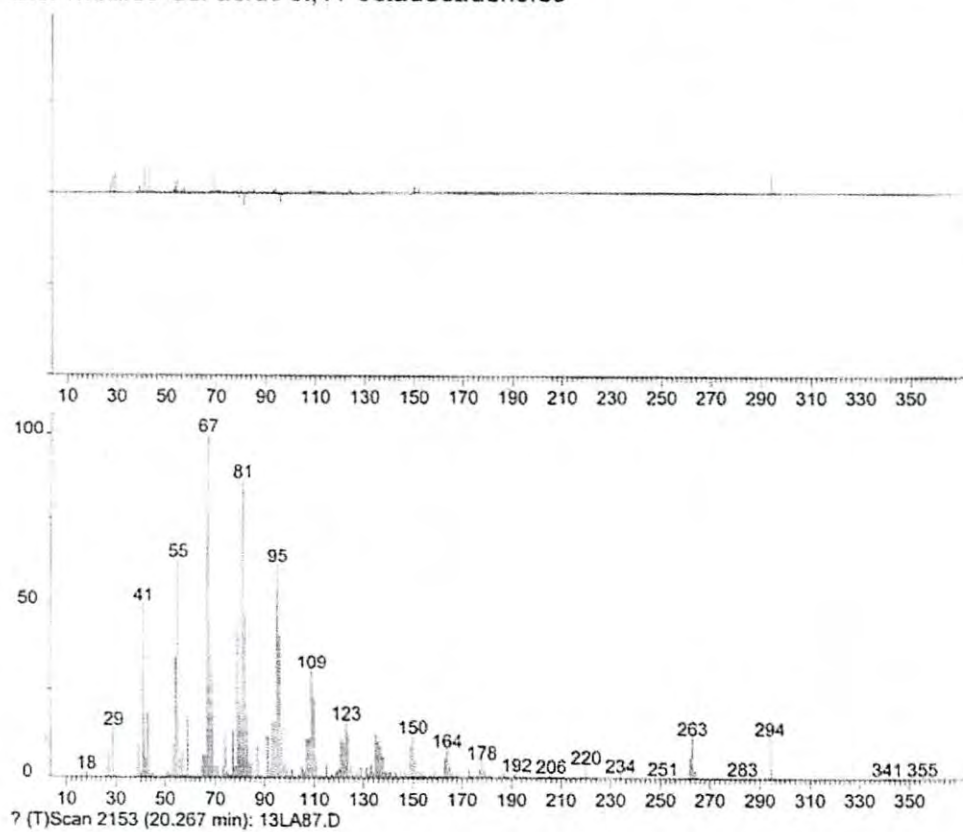


Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecenoico, 14-metil (tiempo de retención: 18.60 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 13

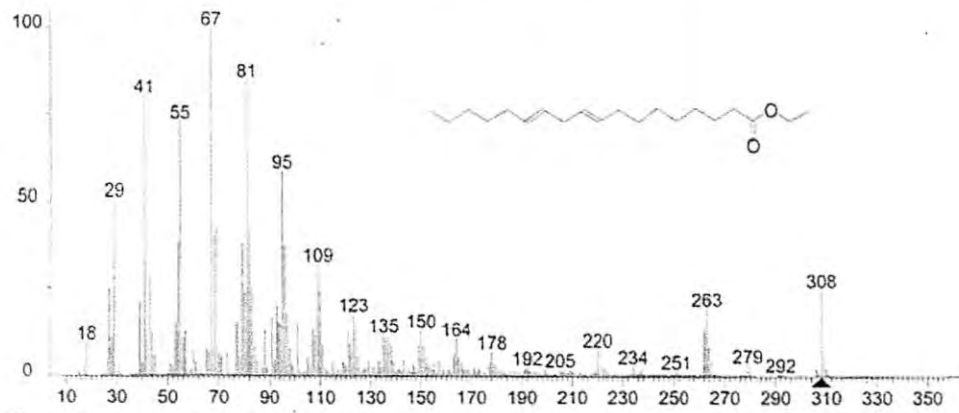


Éter metílico del ácido 8,11-octadecadienoico

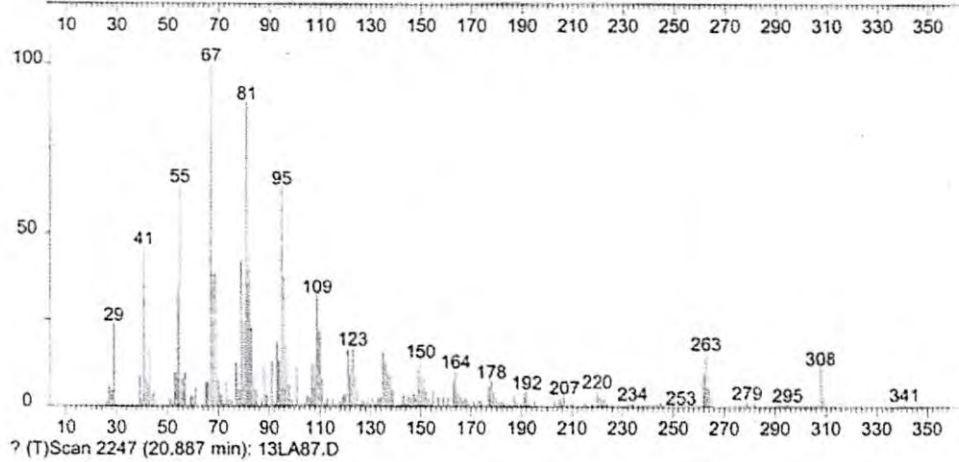
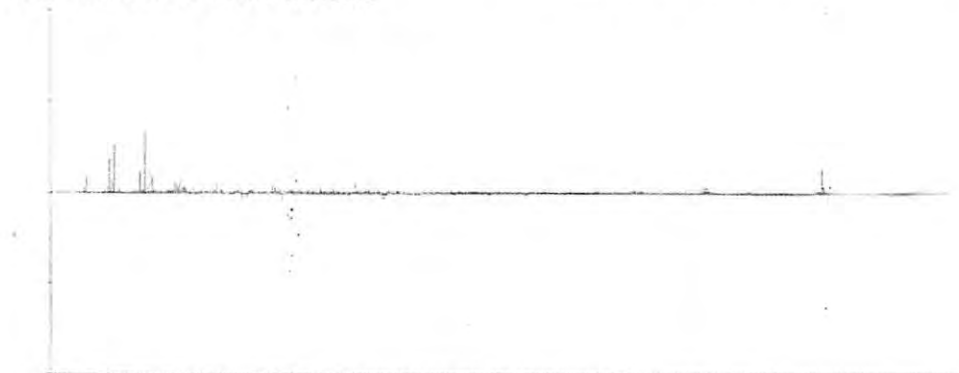


Espectro de masas del éter metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (tiempo de retención: 20.26 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 14

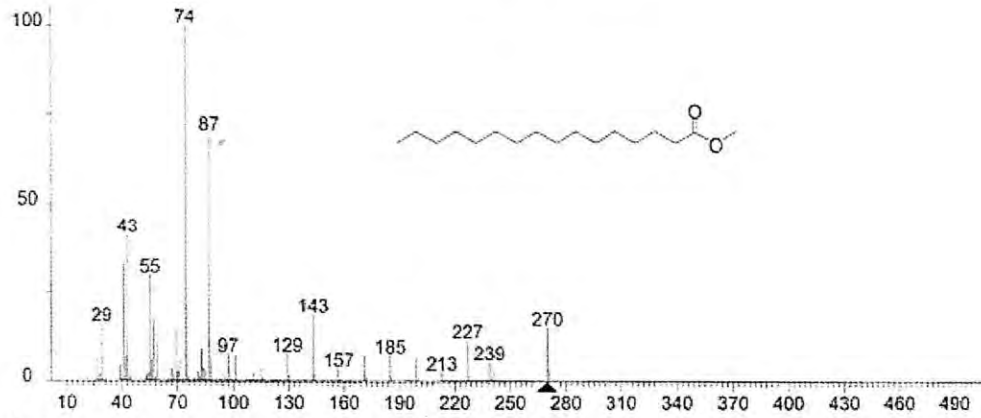


Éster etílico del ácido linoleico

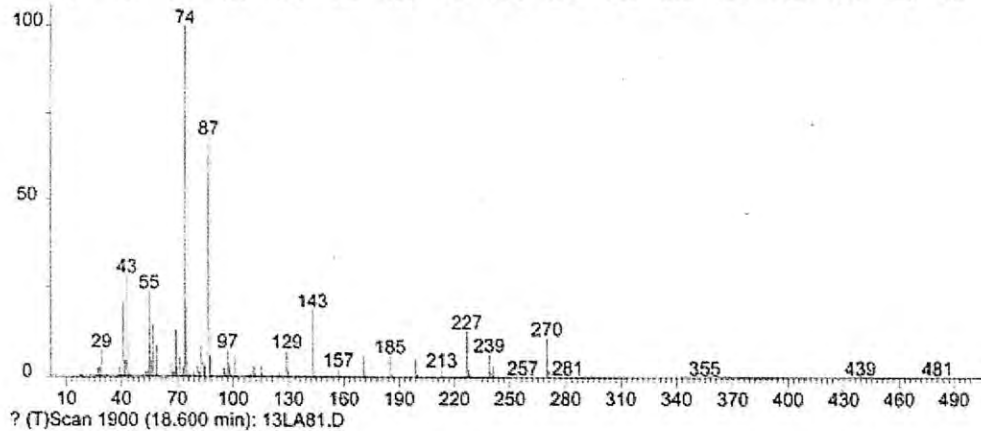
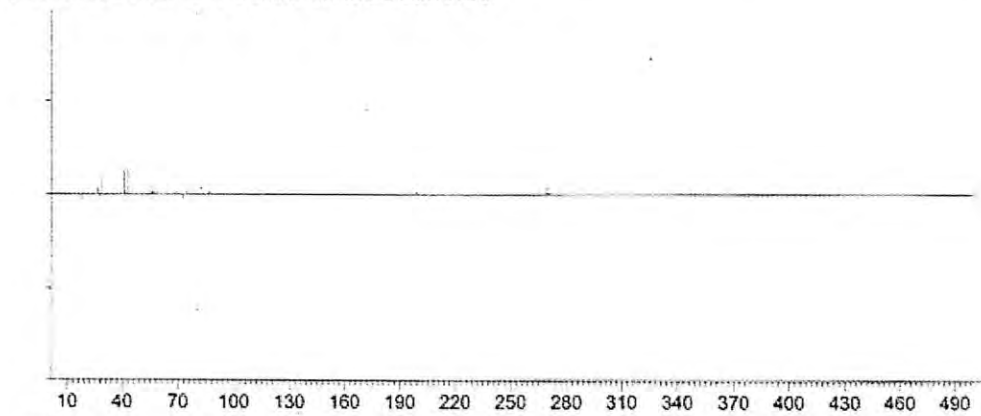


Espectro de masas del éster etílico del ácido linoleico (tiempo de retención: 20.88 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 15

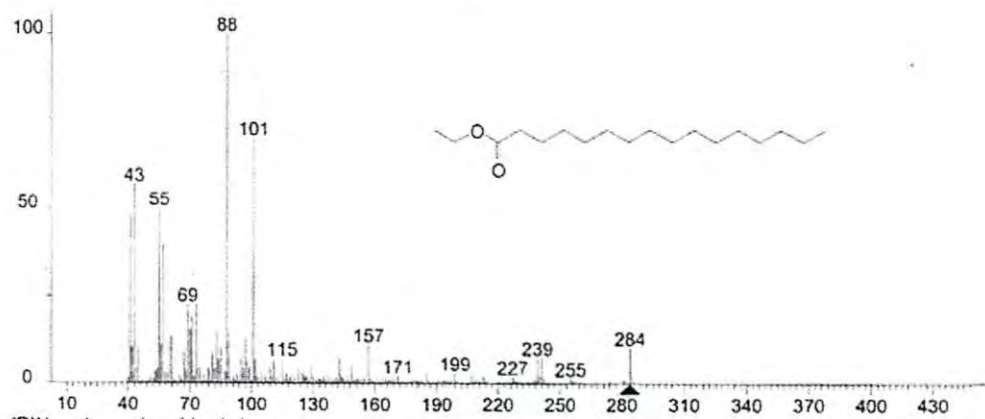


Éster metílico del ácido hexadecanoico

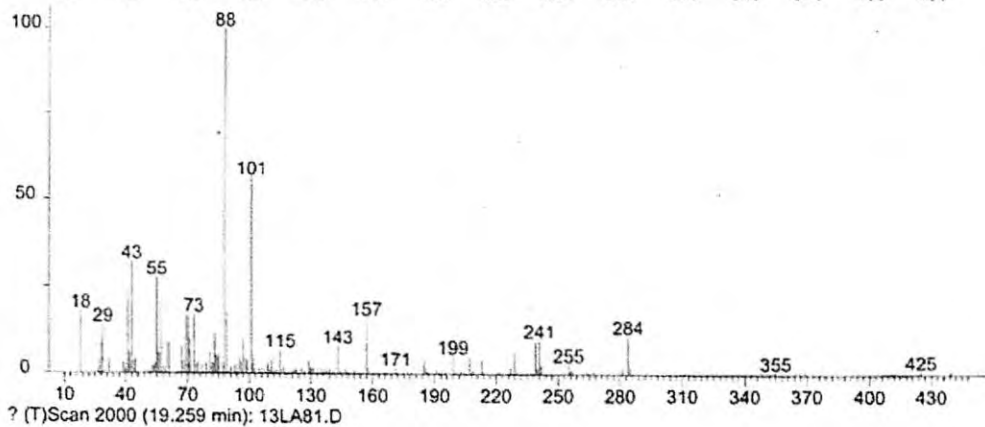
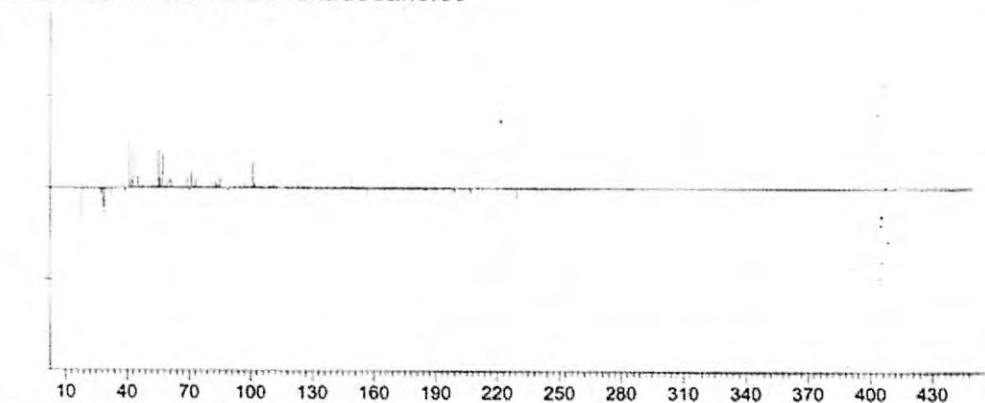


Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (tiempo de retención: 18.60 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 16

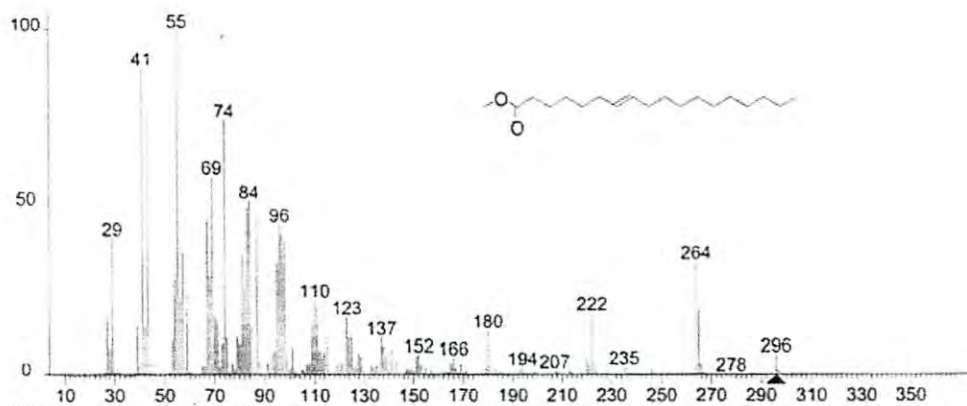


Éster etílico del ácido hexadecanoico

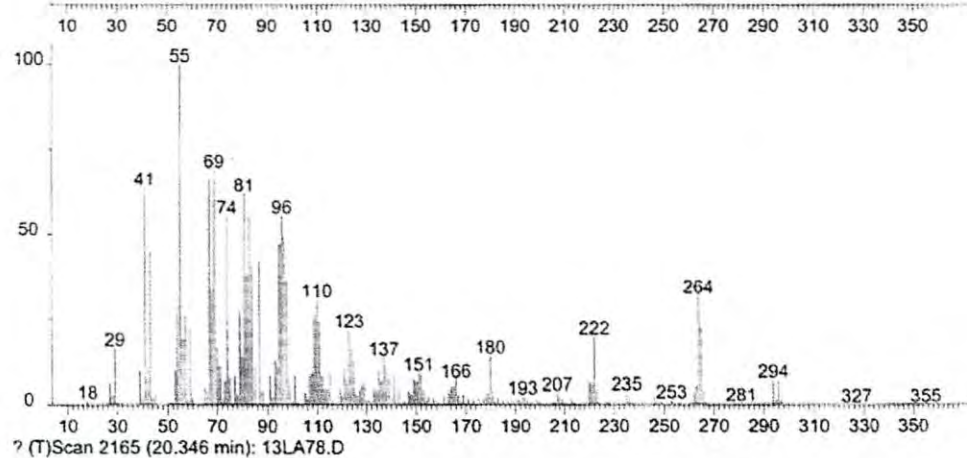


Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico (tiempo de retención: 19.25 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 17

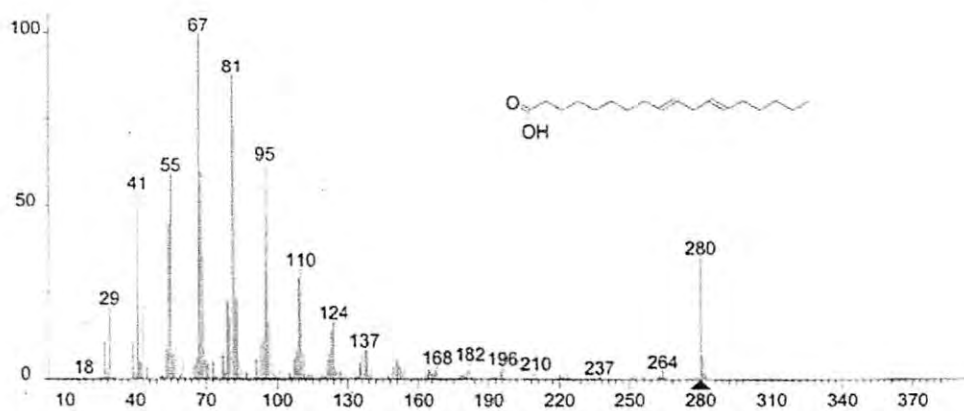


Éster metílico del ácido 7-octadecenoico,

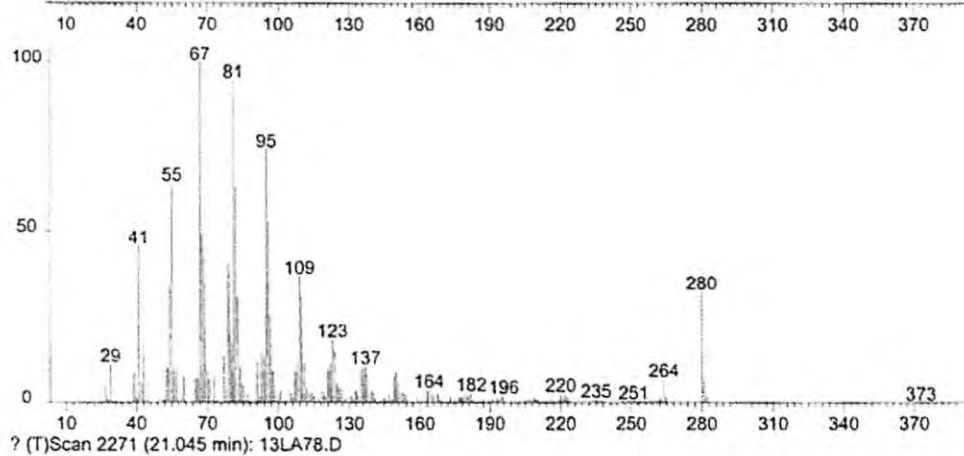
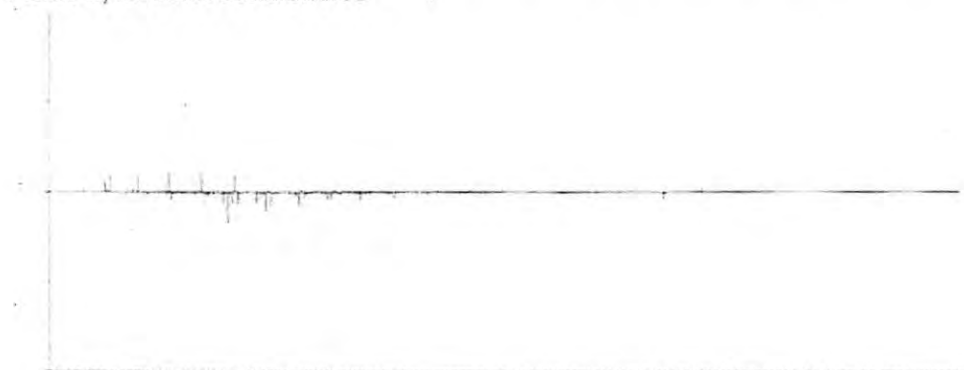


Espectro de masas del éster metílico del ácido 7-octadecenoico (tiempo de retención: 20.34 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 18

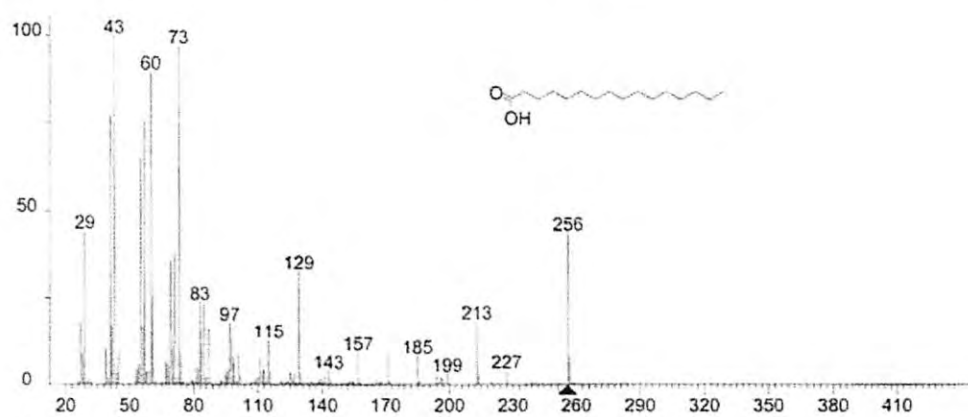


Ácido 9,12-octadecadienoico

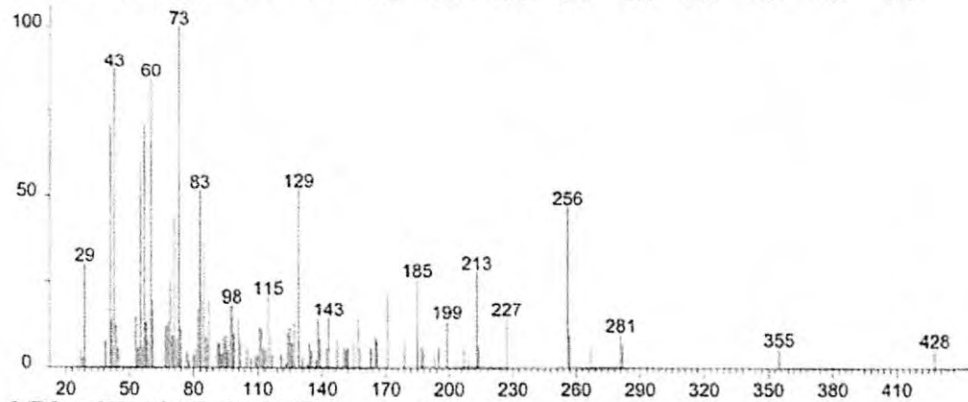
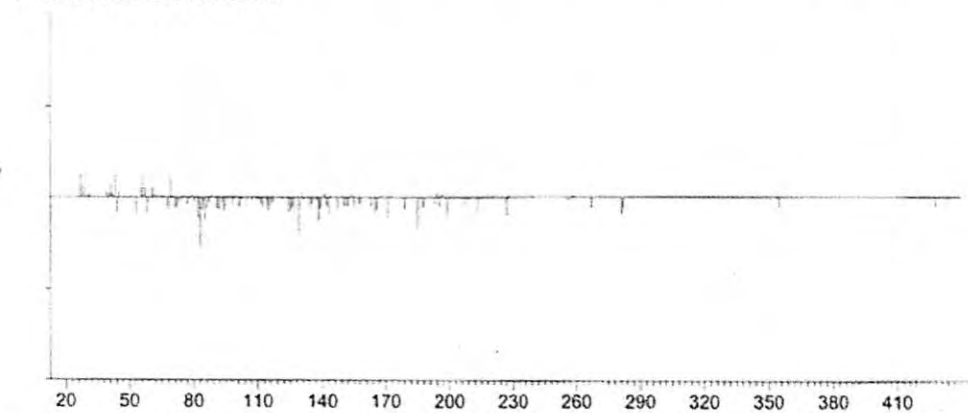


Espectro de masas del ácido 9,12-octadecadienoico (tiempo de retención: 21.04 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).

ANEXO 19



Ácido hexadecanoico



? (T)Scan 2024 (19.417 min): 13LA85.D

Espectro de masas del ácido hexadecanoico (tiempo de retención: 19.41 min). Biblioteca de compuestos del programa NIS versión 17.9 (2001).