



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS QUÍMICO Y EFECTO
CITOTÓXICO DE EXTRACTOS
METANÓLICOS Y FRACCIONES
ALCALOIDEAS DE *Zephyranthes fosteri*
(AMARYLLIDACEAE) SOBRE LAS LÍNEAS
TUMORALES HUMANAS HELA Y SKLU-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KARLA PAOLA GARCÍA CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. LUCÍA YOSCELINA CENTENO
BETANZOS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
García
Cruz
Karla Paola
58 11 03 03
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
310015860
2. Datos del tutor
M. en C.
Lucía Yoscelina
Centeno
Betanzos
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Helia Reyna
Osuna
Fernández
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Sol
Cristians
Niizawa
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Silvia Laura
Guzmán
Gutiérrez
7. Datos del trabajo escrito
Análisis químico y efecto citotóxico de extractos metanólicos y fracciones alcaloides de
Zephyranthes fosteri (Amaryllidaceae) sobre las líneas tumorales humanas HeLa y SKLU-1
71 p
2017

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de **Becas Nacionales para la Educación Superior- MANUTENCION, UNAM.**

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT DGAPA UNAM):**

Proyecto IN210016. Bioprospección de la Flora Mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral.

Proyecto IG200513 "Compuestos antivirales (VIH-1) de árboles tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio químico y toxicogenómico".

Al **Dr. Ignacio González Sánchez**, por su gran apoyo y asesoría en las determinaciones de actividad citotóxica frente a las líneas celulares.

Al **Dr. Francisco Javier Pérez Flores**, del Laboratorio de Espectrometría de Masas en el Instituto de Química, UNAM. Por su apoyo técnico y disposición en la realización del método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Al **Ing. Q. Luis Velasco Ibarra**, del Laboratorio de Espectrometría de Masas en el Instituto de Química, UNAM. Por su amable apoyo en la obtención de los espectros de masas.

Al **M. en C. Felix Kregel**, por su apoyo en la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

Al **Q. en A. Raúl Adrián Mejía González**, por su ayuda y asesoría en el manejo y procesamiento de espectros de RMN en el programa Mestre Nova.

Al comité sinodal:

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

Dr. Sol Cristians Niizawa

M. en C. Lucía Yoscelina Centeno Betanzos

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser mi segunda casa desde el nivel medio superior y superior, por hacer posible que creciera académicamente proporcionándome todas las herramientas necesarias y porque en sus instalaciones de Ciudad Universitaria aprendí mucho de los estudiantes y académicos que la conforman.

A la **Facultad de Ciencias**, porque en sus instalaciones me forme como bióloga y gracias a sus profesores descubrí lo hermosa que es la ciencia.

Al **Instituto de Química**, por abrirme las puertas de sus laboratorios, en los cuales se realizó todo el análisis químico correspondiente, por el apoyo y trato amable de sus técnicos y los múltiples conocimientos adquiridos en sus diferentes cursos.

A la **M. en C. Lucía Yoscelina Centeno Betanzos**, por asesorar y dirigir esta tesis, por su entusiasmo al hablar de las amarillidáceas, por su apoyo, confianza y por hacer amena y divertida esta experiencia.

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa**, por abrirme las puertas de su laboratorio 2-4 de Productos Naturales, en el Instituto de Química, por su valiosa asesoría y apoyo en la realización de esta tesis. Sobre todo, por hacer más amplios mis conocimientos en biología y química.

A la **Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez**, por su ayuda en el manejo de los instrumentos de laboratorio, por sus sugerencias, consejos y asesoría en cada fase de la realización de esta tesis.

A la **Dra. Helia Reyna Osuna Fernández**, por las observaciones recibidas a lo largo del proyecto. Por su amabilidad y apoyo en la revisión de esta tesis.

Al **Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes**, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Facultad de Química y permitirme realizar las evaluaciones biológicas en las líneas celulares.

Al **Dr. Sol Cristians Niizawa**, por su valiosa asesoría y disposición en la revisión de esta tesis.

Al laboratorio 2-4 del Instituto de Química UNAM, en especial a mis amigos: Heidi, Dulce, Brenda, Mishel, Alma, Felix, Jorge, Ana, Griselda y Karla, por su grata compañía, amabilidad y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A mi familia, en especial a mis padres:

Julieta Cruz y Álvaro García

A Gustavo

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	8
Lista de compuestos	10
RESUMEN	11
I. INTRODUCCIÓN	
I.I <i>Zephyranthes fosteri</i>	13
I.II El cáncer en México	15
I.III Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento del cáncer	17
II. ANTECEDENTES	
II.I Alcaloides de la familia Amaryllidaceae	18
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
III.I Objetivos	20
III.II Hipótesis	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
IV.I Sitio de estudio	21
IV.II Extractos metanólicos	23
IV.III Fracciones alcaloideas	23
IV.IV Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)	26
IV.V Proceso de purificación de compuestos alcaloideos	
IV.V.I Cromatografía líquida al vacío (CLV)	26
IV.V.II Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)	27
IV.V.III Cromatografía en columna (CC)	28

IV.V.IV Caracterización por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹ H) de los compuestos obtenidos	28
IV.V.V Análisis del perfil alcaloideo por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	29
IV.VI Ensayo de citotoxicidad	31
IV.VI.I Soluciones requeridas para el cultivo celular	32
IV.VI.II Mantenimiento y propagación del cultivo celular	33
IV.VI.III Conservación de las células en congelación	34
IV.VI.IV Conteo celular	34
IV.VI.V Actividad citotóxica	35
IV.VI.VI Cálculo de la IC ₅₀	36
V. RESULTADOS	
V.I. Extractos metanólicos y fracciones alcaloideas	37
V.II. Purificación de compuestos alcaloideos	44
V.III. Evaluación de la actividad citotóxica	53
VI. DISCUSIÓN	56
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. PERSPECTIVAS	62
IX. LITERATURA CITADA	63
X. ANEXOS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
cbp	Cuanto baste para
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CLV	Cromatografía líquida al vacío
D	3'-demetoximesembranol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EA	Extractos de alcaloides (todas las FO2 de la colecta 2015)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EM	Espectrometría de masas
F	Fracción original
FA	Fase acuosa
FO1	Fase orgánica 1
FO2 y FO3	Fracciones alcaloideas
FO2	Fase orgánica 2
FO2A y FO3A	Fracciones alcaloideas de la colecta 2015
FO2B y FO3B	Fracciones alcaloideas de la colecta 2011
FO3	Fase orgánica 3
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico-uterino
HEPES	Ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]

IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
L	Licorina
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M ⁺	Masa del ion molecular
MeOH	Metanol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NCI	Instituto Nacional del Cáncer, U.S.A. (por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
REPSA	Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero bovino fetal
SKLU-1	Línea celular de cáncer de pulmón
TR	Tiempo de retención

LISTA DE COMPUESTOS

1. *m/z* 278 (279)
2. *m/z* 226 (287)
3. 3'-demetoximesembranchol
4. *m/z* 248 (249)
5. *m/z* 18 (287)
6. Galantamina
7. *m/z* 394 (395)
8. *m/z* 55 (285)
9. *m/z* 253 (296)
10. *m/z* 301 (301)
11. Clidantina
12. *m/z* 311 (311)

RESUMEN

Se estudió químicamente a la especie herbácea *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae), a la cual se le conoce popularmente como "mayito" por florecer en las primeras lluvias del mes de mayo. Ejemplares de esta especie se colectaron en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) para obtener los extractos metanólicos y los extractos de alcaloides correspondientes a diferentes partes de la planta (raíz, bulbo y partes aéreas) y evaluar su actividad citotóxica sobre dos líneas tumorales humanas: cáncer cérvico-uterino (HeLa) y cáncer de pulmón (SKLU-1). Los extractos de alcaloides mostraron una mayor actividad citotóxica en comparación con los extractos metanólicos en ambas líneas tumorales. Se determinó una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 3.07 µg/mL ± 0.26, 3.88 µg/mL ± 0.27 y 9.58 µg/mL ± 1.47 para la raíz, bulbo y partes aéreas respectivamente en células HeLa, y de 5.97 µg/mL ± 0.52, 5.55 µg/mL ± 0.61 y 9.05 µg/mL ± 2.00 para la raíz, bulbo y partes aéreas respectivamente en células SKLU-1. Se realizó la identificación de alcaloides presentes en los extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), resonancia magnética nuclear de hidrogeno (RMN ¹H) y espectrometría de masas (EM). Los alcaloides mayoritarios en las tres partes de la planta, detectados por CG-EM presentaron un *m/z*, es decir una relación masa/carga de 189 (261), 226 (287), 278 (279) y 248 (249), el primero se identificó como el 3'-demetoximesembranol, previamente reportado. En cuanto a la citotoxicidad, el extracto de la raíz y del bulbo fueron más potentes. Los resultados obtenidos indican que las mezclas de alcaloides tipo Amaryllidaceae de *Z. fosteri* presentan una actividad citotóxica contra las dos líneas tumorales humanas ensayadas. Por lo que sería importante continuar las investigaciones enfocadas al aislamiento, identificación y evaluación de la

actividad citotóxica particular de los alcaloides mayoritarios ya mencionados, además de elucidar su mecanismo de acción y su selectividad a ciertas células tumorales y normales. De resultar con potencial para la elaboración de un medicamento, sería necesaria también la investigación en cuanto a la propagación de esta especie para asegurar la obtención de los principios activos y su conservación en la REPSA.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 *Zephyranthes fosteri*

Popularmente a *Zephyranthes fosteri* se le conoce como “flor de mayo” o “mayito” debido a que florece en el mes de mayo, al caer las primeras lluvias. El género *Zephyranthes* consta de aproximadamente 70 especies (Spurrier *et al.*, 2015), de las cuales 36 se encuentran distribuidas en México. De acuerdo con Rzedowski y Calderón *et al.* (2005), *Z. fosteri* es una hierba perenne de 5 a 45 cm de altura; bulbo ovoide; el tallo presenta de 1 a 3 escapos cilíndricos de hasta 40 cm de largo, en dónde se encuentra una bráctea membranácea que envuelve al botón floral; las flores son solitarias, erectas, color rosa o blanco, simetría radial, bisexuales, seis tépalos que forman el perianto, seis estambres, ovario trilocular; las hojas son basales, arrosetadas; la raíz es fibrosa; los frutos son una cápsula dehiscente y las semillas son semicirculares, aplanadas y negras (Figura 1.1).

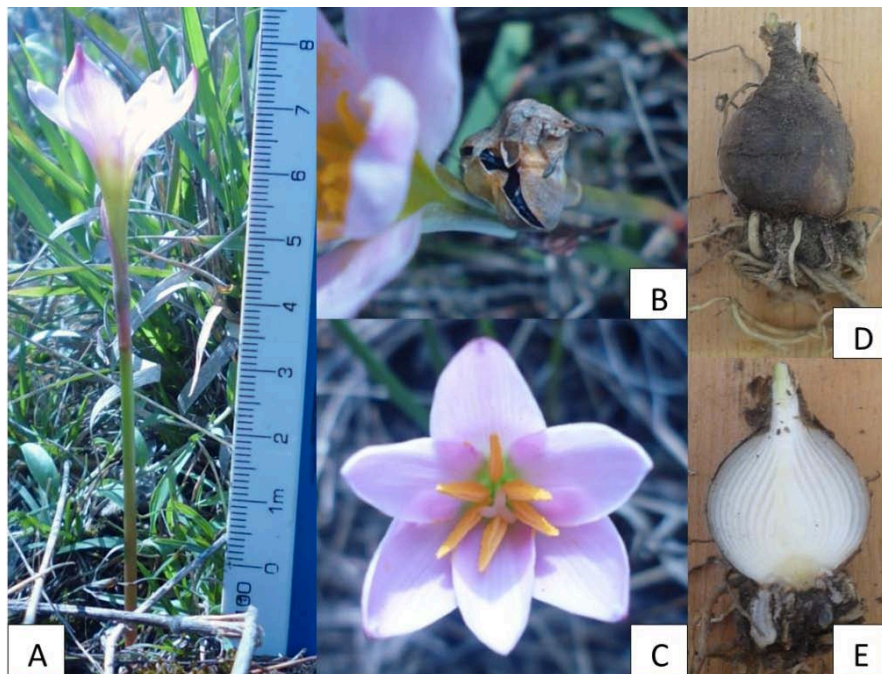


Figura 1.1: *Zephyranthes fosteri* en la REPSA, México, D.F. A) Hábito. B) Detalle del fruto: cápsula dehiscente con semillas. C) Detalle de la flor. D) Detalle del bulbo. E) Corte longitudinal de bulbo que muestra el tallo. Fotos: Karla Paola García (2015).

En México, *Z. fosteri* se encuentra distribuida en algunos estados como: San Luis Potosí, Jalisco, Guerrero, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala, Michoacán, Morelos, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México y en la Ciudad de México dónde se encuentra ubicada la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), dentro de las instalaciones y bajo el resguardo de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Figura 1.2). Ésta reserva es única en su tipo, de gran importancia no sólo por ser de carácter urbano y con gran valor paisajístico, sino también por su característica biodiversidad de especies vegetales y animales. Representa actualmente un último relictos del ecosistema del pedregal de la cuenca de México y en este lugar también se encuentran distribuidas algunas poblaciones de *Z. fosteri* (Lot y Camarena, 2009).

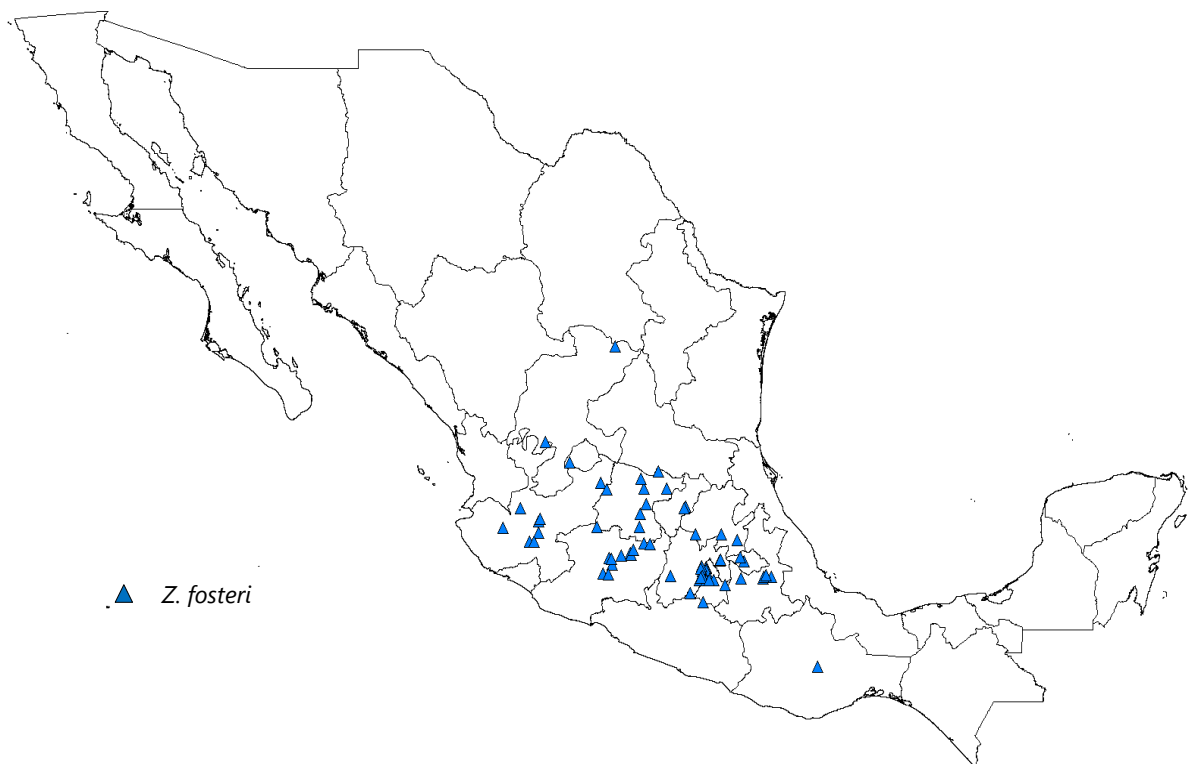


Figura 1.2: Mapa de las zonas de distribución de *Zephyrantes fosteri* en México, con base en la información de herbarios y colectas (L. Centeno, com. pers.).

Elaboró: Karla Paola García (2016).

Zephyranthes fosteri pertenece a la familia Amaryllidaceae, la cual consta de aproximadamente 860 especies en 50 géneros (López-Ferrari y Espejo-Serna, 2002). Esta familia es conocida no sólo por la belleza de sus flores, sino también por producir alcaloides que han sido de gran utilidad para la medicina como la galantamina, un alcaloide que constituye un fármaco que actualmente se utiliza para tratar la enfermedad de Alzheimer debido a su actividad como inhibidor de la acetilcolinesterasa (Pearson, 2001; Elgorashi *et al.*, 2004). Así mismo, las propiedades antitumorales de algunos alcaloides de esta familia también han sido reconocidas y estudiadas, desde que se describió por primera vez el efecto citostático de la licorina (Fitzgerald *et al.*, 1958).

I.II El cáncer en México

El término cáncer se utiliza para definir un conjunto de enfermedades en las cuales células anormales se dividen sin control, generado por un desequilibrio entre la división y muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011). Dichas células neoplásicas pueden invadir otros tejidos (metástasis), diseminando las células cancerosas a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático (NCI, 2015).

El cáncer se ha convertido en un problema de salud pública de gran importancia, siendo hoy día una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a escala mundial. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos (IARC, 2014). Además se estima que el número de nuevos casos aumentará en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones (casi una de cada seis muertes en el mundo), los principales tipos de cáncer que causaron un mayor número de muertes en

varones en todo el mundo fueron el de pulmón, hígado, colorrectal y próstata, y para las mujeres el de mama, pulmón, colorrectal, cervicouterino y estómago (OMS, 2017).

En México, durante el 2013 se reportó que existen diferencias por el tipo de género en las principales causas de morbilidad hospitalaria por neoplasias entre la población de 20 años y más. Por ejemplo, en los hombres, las tres causas principales fueron: el cáncer de órganos digestivos (25%), el de órganos genitales (11%) y de órganos hematopoyéticos (10.6%). Mientras que en las mujeres fueron el cáncer de mama (29.5%), el de órganos genitales (18.6%) y el de órganos digestivos (13.8 %). En cuanto a la mortalidad, del total de defunciones de la población de 20 años y más, 13.6% se debió a algún tumor y de éstas, 93.6% a los tumores malignos. Por tipo de género, del total de defunciones por cáncer, el 48.8% ocurren en varones y 51.2% en mujeres. Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad entre esta población en 2013 (32.52 casos por cada 100 mil habitantes), los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos ocupan el segundo sitio (10.58 defunciones por cada 100 mil) y en tercer lugar se ubican los tumores del sistema reproductor masculino (8.44 defunciones por cada 100 mil). Entre las mujeres el cáncer de mama aparece como segunda causa de mortalidad con 14 defunciones por cada 100 mil (INEGI, 2016).

Ahora bien, el objetivo en el tratamiento del cáncer consiste en curar la enfermedad o prolongar considerablemente la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente. Por ello, el tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas, según el tipo y

estado del cáncer. Entre los tratamientos más frecuentes se encuentran: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (OMS, 2015).

Sin embargo, estos tratamientos a pesar de su efectividad se sabe que causan efectos secundarios que reducen la calidad de vida, por tanto hay una necesidad de descubrir medicamentos alternativos que combatan el cáncer, con una actividad más potente, más selectiva y menos tóxica que los que actualmente se utilizan.

I.III Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento del cáncer

México es un país megadiverso y en el estudio de la materia vegetal se han encontrado plantas medicinales que podrían constituir una alternativa para el tratamiento del cáncer como una fuente importante de compuestos con actividad citotóxica o antitumoral. Tan solo hasta el 2011 se reportaron 300 especies de plantas pertenecientes a 90 familias botánicas que han sido utilizadas para este efecto, de las cuales, únicamente 181 han sido analizadas experimentalmente y 119 siguen usándose empíricamente para tratar enfermedades consistentes con la sintomatología del cáncer pero que aún no cuentan estudios que respalden dicha actividad (Alonso-Castro *et al.*, 2011). En 2012, el número de reportes de plantas utilizadas en el tratamiento del cáncer ascendió a 592 (tanto en México como en otros países), estas especies vegetales cuentan con fichas descriptivas con información botánica, etnofarmacológica y fitoquímica. Dependiendo del caso se mencionan los compuestos que presentan actividad biológica y/o antitumoral, con propiedades citotóxicas o que provocan la muerte celular programada (apoptosis), estas especies se agrupan en 125 familias botánicas, de las cuales

la familia Euphorbiaceae es la que cuenta con el mayor número de especies (59); (Waizel, 2012).

II. ANTECEDENTES

II.1 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae es bien conocida por la importancia farmacológica de los alcaloides que produce y éstos se encuentran clasificados en diferentes tipos estructurales de acuerdo con el sistema heterocíclico que presentan como: galantamina, norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina y montanina (Herrera, 2001); (Figura 2.1).

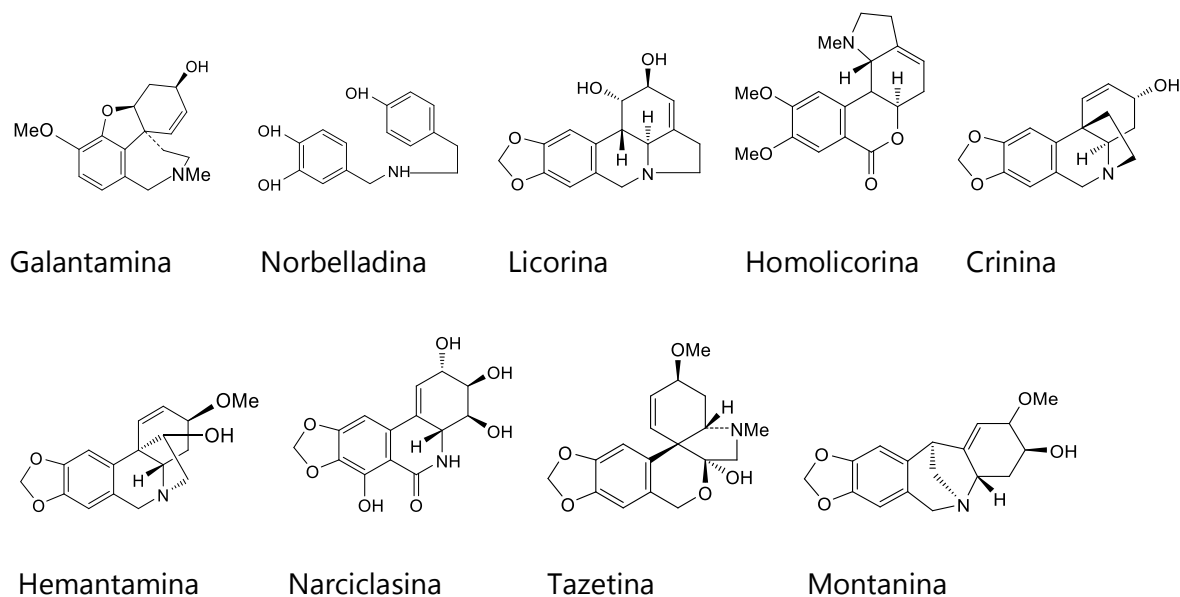


Figura 2.1: Tipos estructurales de los alcaloides de Amaryllidaceae.

En estudios realizados en especies de la familia Amaryllidaceae, se reportó que la licorina tiene efecto citostático (Fitzgerald *et al.*, 1958) y que puede suprimir el crecimiento de células de leucemia, reducir la supervivencia celular mediante la detención del ciclo celular, inducir la apoptosis de células tumorales (Liu *et al.*, 2004) y la detención del ciclo celular en una pre-B línea celular linfoide (KM3) (Li *et al.*, 2007). Otros tipos de alcaloides de Amaryllidaceae que también muestran efectos citostáticos son los de tipo tazetina o crinina (Antoun, *et al.*, 1993; Weniger *et al.*, 1995). Los alcaloides tipo crinina como la crinamina y hemantamina inducen apoptosis (McNulty *et al.*, 2007) e igualmente la 2-O-acetil-licorina induce apoptosis en células HeLa (Zupkó *et al.*, 2009). Sin embargo, los alcaloides más prometedores son de tipo narciclisina como la pancratistatina y narciclasina, los cuales alcanzaron la etapa de desarrollo preclínico, pero que aún no han podido ser formulados para uso *in vivo* debido a su baja solubilidad en agua (Pettit *et al.*, 1993; Pettit *et al.*, 2001; Torres-Labandeira *et al.*, 1991). Por todo lo anterior, Zupkó *et al.*, (2009) menciona que algunos de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae se pueden considerar como estructuras de partida prometedoras para el desarrollo de agentes anticancerígenos futuros.

En un estudio anterior, se realizó el perfil químico de la fracción de alcaloides de *Z. fosteri*, reportando la presencia de alcaloides típicos de las amarillidáceas de los cuales algunos presentan efectos citostáticos o con inducción de apoptosis como la licorina, este alcaloide se encontró en los bulbos y raíces, al igual que la 2-O-acetil-licorina, mientras que la crinamina se encontró solo en raíces; de los tres alcaloides, la licorina es la que se encontró en mayor proporción. Además de éstos también se reportó la presencia de otro tipo de alcaloide, el 3'-demetoximesembranol, el cual además de no ser un alcaloide

típico de la familia, no cuenta con un análisis experimental sobre su efecto citostático, citotóxico o antitumoral. Este compuesto se encontró presente principalmente en los bulbos y únicamente fue evaluada su actividad enzimática como inhibidor de la acetilcolinesterasa, la cual fue poco relevante (Centeno-Betanzos, 2014). Cabe mencionar que los alcaloides tipo mesembrano, generalmente se encuentran presentes en la familia Aizoaceae (Pigni, 2013).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

III.I Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos metanólicos y extractos de alcaloides de *Zephyranthes fosteri*, y para esto, los objetivos particulares fueron:

- Obtener los extractos metanólicos y las fracciones alcaloideas de los bulbos, partes aéreas y raíces de *Z. fosteri*.
- Caracterizar y aislar los compuestos y/o mezclas mayoritarias de los extractos de alcaloides por medios cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos y extractos de alcaloides de las diferentes partes de la planta en dos diferentes líneas celulares: cáncer de pulmón (SKLU-1) y cáncer cérvico-uterino (HeLa).

III.II Hipótesis

El efecto citotóxico *in vitro* de varios alcaloides aislados dentro de especies de la familia Amaryllidaceae como la licorina ya se ha comprobado, si *Z. fosteri* presenta mayoritariamente alcaloides tipo licorina, entonces se espera que los diferentes extractos de esta especie presenten un efecto citotóxico relevante.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.I Sitio de colecta

Se realizó una colecta de *Z. fosteri* el 2 de Junio de 2015 en el campus de Ciudad Universitaria de la UNAM, específicamente en una de las zonas de amortiguamiento de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) ubicada junto a la zona cultural (19°18'55.9" N 99°10'56.4" O) (Figura 4.1). Se obtuvieron ejemplares de herbario que fueron depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) (folio 158645) y en el herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM), a cargo de la M. en C. Abigail Aguilar los cuales aún se encuentran en proceso de foliación.



Figura 4.1: Mapa de la REPSA, se señala en amarillo la zona de amortiguamiento en la cual se realizó la colecta de *Z. fosteri*. Imagen tomada de: <http://www.repsa.unam.mx>.

IV.II Extractos metanólicos

De la colecta, se procesaron por separado las raíces, los bulbos y las partes aéreas que incluyeron hojas, escapos y algunos frutos con semillas. Los órganos frescos se cortaron en pedazos pequeños y se pusieron a secar a la sombra por varias semanas en el invernadero del Instituto de Química de la UNAM. Una vez secos, se trituraron con ayuda de un mortero. Se maceraron en metanol (MeOH) durante cuatro días a temperatura ambiente (9.9 g de raíces, 83.8 g de bulbos y 26.3 g de partes aéreas, con MeOH cubriendo todo el material vegetal), los extractos fueron concentrados a presión reducida en un rotavapor, repitiendo este procedimiento siete veces. Por último, los extractos se colocaron en una cámara de vacío para eliminar completamente el disolvente.

IV.III Fracciones alcaloides

Se realizó una extracción de alcaloides ácido-base de los extractos metanólicos y de los obtenidos en una colecta anterior de mayo del 2011 de la siguiente forma: a los extractos metanólicos (500 mg) se les agregó 2.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 25% y la mezcla se puso en un baño de ultrasonido por 5 min. Este proceso se repitió dos veces o hasta que el extracto estuviera disuelto completamente. Posteriormente el extracto se puso en un embudo de separación y se le agregó 5 mL de éter, se tapó y se agitó, formándose así dos fases. La fase inferior se denominó fase acuosa (FA1) y la superior fase orgánica (FO1), esta última se recogió en un matraz, este proceso se realizó seis veces, extrayendo así sustancias neutras y compuestos apolares. A la FA1 se le agregó 1 mL de hidróxido de amonio hasta llevarlo a un pH de 9 o 10 (monitoreando con tiras de pH) y enseguida se le agregó 5 mL de acetato de etilo (AcOEt), se agitó y se obtuvo nuevamente dos fases. La fase orgánica superior (FO2), que

es la más importante del proceso debido a que es en esta dónde se extrae la mayor cantidad de alcaloides, se recogió en un matraz, el proceso se realizó varias veces hasta que la FO2 se observara transparente. Por último, a la fase acuosa inferior (FA2), se le agregó 5 mL de una mezcla de AcOEt y MeOH (3:1), se agitó y se formaron dos fases. La fase orgánica superior (FO3) se recogió en un matraz, el proceso se repitió varias veces para extraer el resto de alcaloides que fuesen más polares. Al finalizar la extracción, las fracciones alcaloideas (FO2 y FO3) fueron concentradas en un rotavapor y se secaron en una cámara de vacío (Figura 4.2).

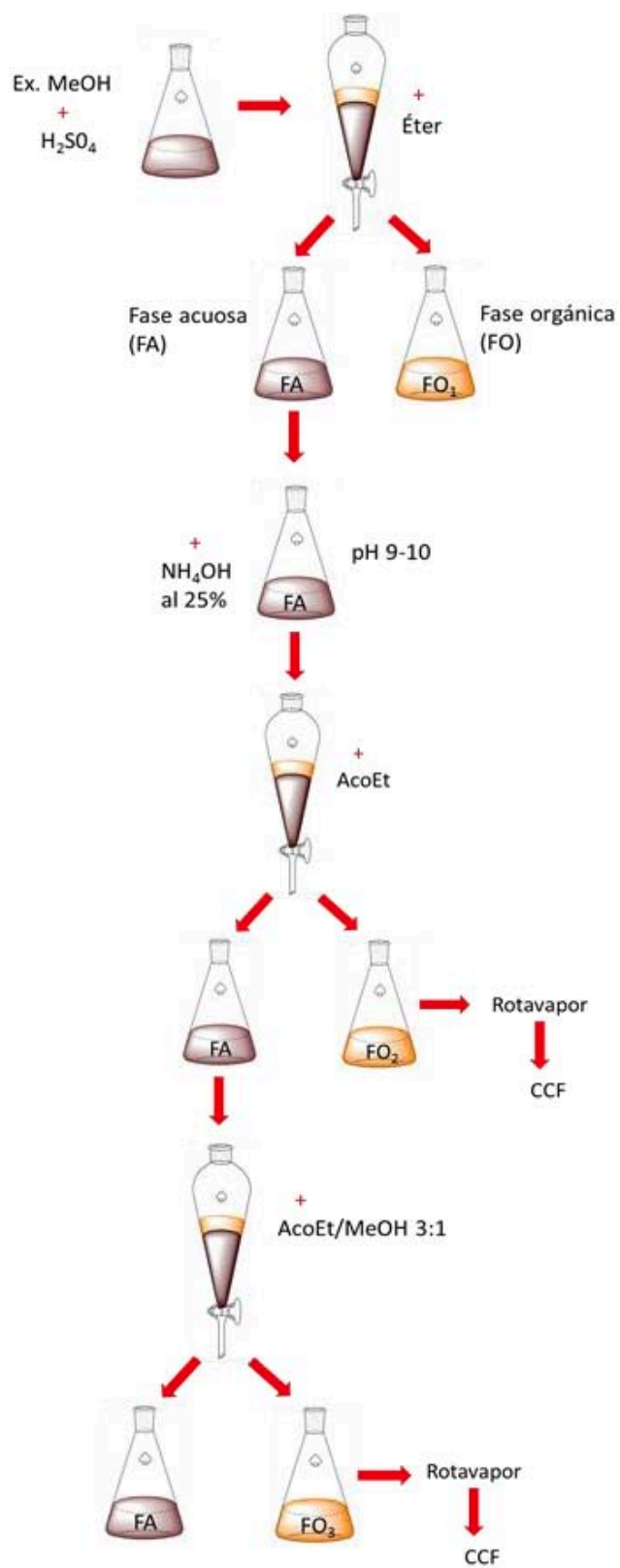


Figura 4.2: Esquema del método ácido-base para la obtención de las fracciones alcaloides. Elaboró: Karla Paola García (2016).

IV.IV Análisis por cromatografía de capa fina (CCF)

Tanto los extractos metanólicos como las fracciones alcaloideas se analizaron por CCF empleando cromatofolios de sílica gel 60 (MACHEREY-NAGEL) con indicador de fluorescencia UV₂₅₄ de 20 x 20 cm de tamaño y 0.20 mm de espesor. Se aplicaron 5µl de la muestra en cada placa con ayuda de un capilar graduado. La fase móvil utilizada varió un poco de acuerdo a la polaridad de cada muestra, sin embargo la más utilizada fue la mezcla de AcOEt-MeOH (4:6). Para observar los diferentes patrones de resolución de las placas, se usaron como reveladores la luz UV onda corta de 254 nm y onda larga de 365 nm, la solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N para detección de compuestos orgánicos (Anexo 1) y el reactivo Dragendorff para la detección específica de alcaloides. Para la preparación del reactivo Dragendorff se mezclaron partes iguales de la solución A y B. Solución A: 0.85 g de nitrato básico de bismuto, 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua destilada. Solución B: 10 g de yoduro de potasio y 40 mL de agua destilada (Domínguez, 1988).

IV.V Proceso de purificación de compuestos alcaloideos

IV.V.I Cromatografía líquida al vacío (CLV)

Con el fin de purificar algunos compuestos alcaloideos de la fracción alcaloidea total de la planta, se empleó CLV. Las fracciones alcaloideas de ambas colectas (2011 y 2015) se juntaron para aumentar el rendimiento de los compuestos. La fracción alcaloidea total (1.024 g) fue disuelta con MeOH, mezclada con celita y colocada en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro empaquetada a 7 cm de altura con sílica gel (230-400 µm). La elución se inició con 240 mL de Hexano 100%, las eluciones posteriores fueron con una mezcla de Hexano-

AcOEt incrementando progresivamente la cantidad de AcOEt hasta llegar a 100%. Las primeras diez fracciones se obtuvieron de 240 mL, las siguientes de 60 mL y a partir de la fracción 25 (con reacción positiva para alcaloides) de 10 mL. Las fracciones fueron concentradas en rotavapor y analizadas por CCF usando la fase móvil MeOH-AcOEt (3:1). Se obtuvieron 210 fracciones en total. De la fracción 25 a la 192, hubo reacción positiva para alcaloides con el reactivo Dragendorff por lo que las fracciones se agruparon de acuerdo a su similitud cromatografica, resultando en seis grupos. Los grupos 2, 3, 4 y 5 presentaron reacción positiva a alcaloides. Los componentes del grupo 4 fueron separados por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) debido a su abundancia y mayor pureza en comparación con los otros grupos, posteriormente se hizo la separación de los grupos 2 y 3 por cromatografía en columna (CC) (Figura 4.3).

IV.V.II Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)

Para la separación por CCFP de los compuestos del grupo 4 (145.8mg), se usó un cromatofolio con base de vidrio, sílica gel de 20 cm x 20 cm. Como fase móvil se empleó MeOH-AcOEt (3:1) eluyendo dos veces. Se obtuvieron cinco bandas (A-D). La banda B, C y D presentaron reacción positiva a alcaloides con el reactivo Dragendorff. Todas las bandas se rasparon con una espátula. El adsorbente se colocó en viales de vidrio y se les agregó AcOEt grado analítico. Se agitaron en vortex y se trataron 10 minutos en un baño de ultrasonido. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se extrajo con micropipeta automática. Este proceso se repitió cinco veces con AcOEt y dos veces más con una mezcla de AcOEt-MeOH (85:15) por cada banda. Los sobrenadantes se reunieron en viales los cuales fueron secados en una cámara de vacío.

IV.V.III Cromatografía en columna (CC)

El grupo 2 y 3 de las fracciones obtenidas por CLV (104.3mg), se volvieron a purificar por CC. Para ello se utilizó una columna de vidrio de 2 cm de diámetro empaquetada a 20 cm de altura con sílica gel (230-400 μm). La muestra fue disuelta con MeOH y colocada en la columna empacada. La elución se inició con 150 mL de Hexano 50% y AcOEt 50% y en las eluciones posteriores se incrementó progresivamente la cantidad de AcOEt hasta llegar a 100%. Posteriormente las eluciones fueron con una mezcla de AcOEt-MeOH, incrementando progresivamente la cantidad de MeOH hasta llegar a 35%. Las primeras diez fracciones fueron de 20 mL, las siguientes de 10 mL y a partir de la fracción 80 (con reacción positiva a alcaloides) de 5 mL. Las fracciones fueron concentradas en rotavapor y analizadas por CCF, usando la fase móvil MeOH-AcOEt (3:1). Se obtuvieron 132 fracciones en total. De la fracción 80 a la 118, hubo reacción positiva para alcaloides con el reactivo Dragendorff. Las fracciones se agruparon de acuerdo con su similitud cromatografica, resultando en cinco grupos.

IV.V.IV Caracterización por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) de los compuestos obtenidos.

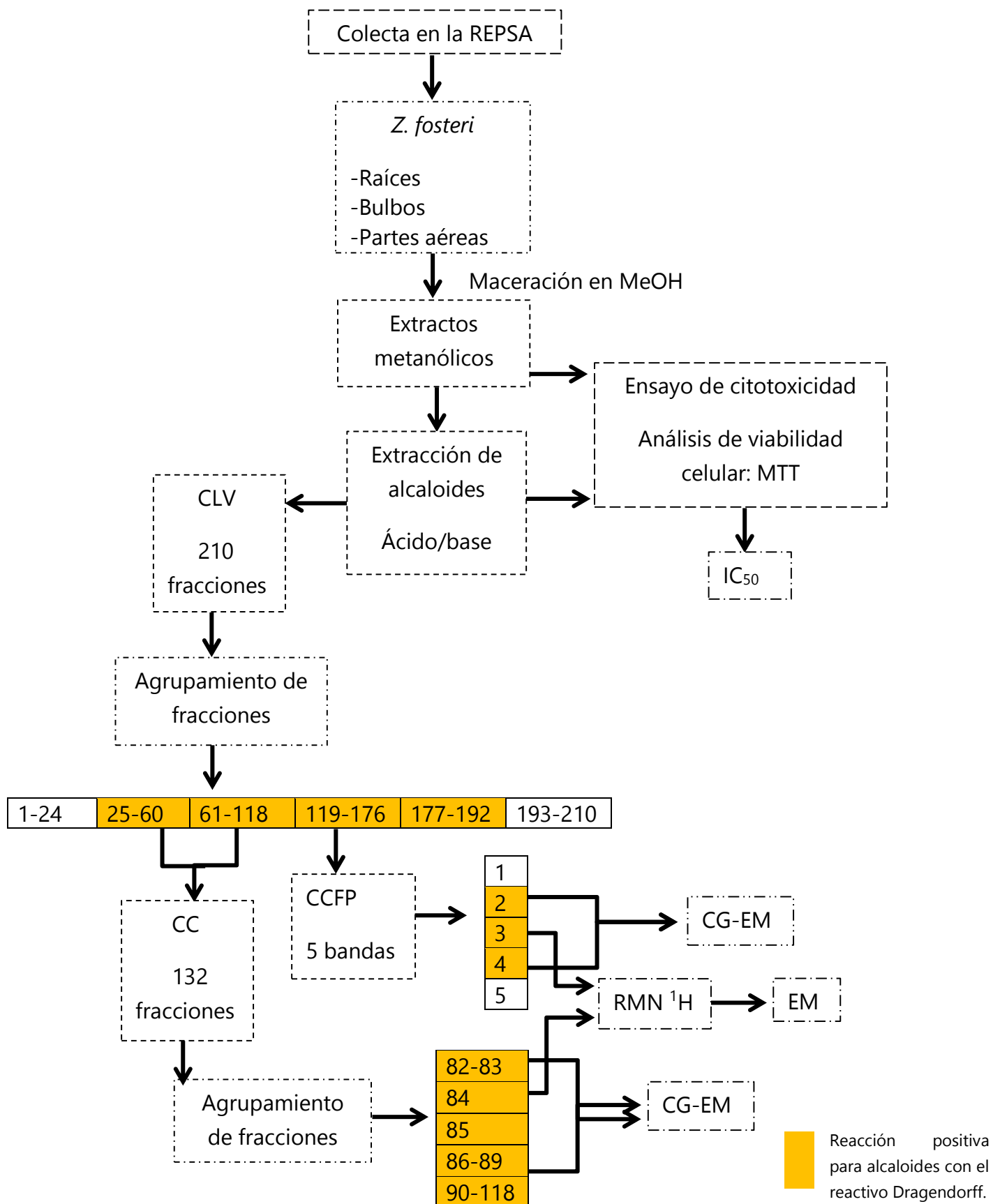
La banda C (11 mg) aislada por CCFP y el grupo 2 (6.5 mg) de las fracciones obtenidas por la CC se analizaron por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) a 300 MHz, en un equipo *Varian Unity de 300 MHz*, usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, con el objetivo de elucidar la estructura química de los compuestos aislados de dichas muestras. Posteriormente, éstas mismas también se analizaron por espectrometría de masas (EM), el modo de ionización fue por impacto electrónico, en un equipo

MStation JMS-700. Este análisis se realizó para obtener la masa molecular de los compuestos y su patrón de fragmentación para poder identificar o caracterizar a la molécula.

IV.V.V Análisis del perfil alcaloideo por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Las fracciones alcaloideas (FO2) de las tres partes de la planta, la banda B y D aisladas por CCFP y los grupo 1, 2, 3, 4 y 5 de las fracciones obtenidas por CC, se analizaron mediante CG-EM en un cromatógrafo de gases (*Agilent GC, modelo 6890*) acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (*JEOL GCMate II mass*) en modalidad de energía de ionización a 70 eV. El cromatógrafo cuenta con una columna de sílica gel *HP-5* (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). El programa de temperatura utilizado fue: de 100 a 180°C (15°C/min⁻¹), por un minuto se mantuvo a 180°C, luego se aumentó de 180°C a 300°C (15°C/min⁻¹), por un minuto se mantuvo a 300°C. La temperatura de inyección fue a 280°C, la velocidad de flujo del gas acarreador (Helio) fue de 0.8 mL min⁻¹ y la relación del Split fue de 1:20. De cada muestra se obtuvo un cromatograma, en el cual para cada pico se registró su tiempo de retención (TR), además cada pico fue identificado con base en su espectro de masas (comparándolos con la literatura) y aquellos que no fueron identificados se nombraron con base en los picos principales de su espectro de masas (relación masa/carga, m/z). Aquellos compuestos con un ion molecular (M^+) impar, se asumieron como alcaloides debido a la presencia de nitrógeno.

Figura 4.3: Diagrama de flujo del resumen metodológico.



IV.VI Ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica de los extractos metanólicos y extractos de alcaloides *in vitro* se determinó mediante un método colorimétrico (MTT), usando sales de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para determinar la viabilidad celular. Estas sales amarillas son reducidas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciendo formazán, el cual forma cristales purpura en medio acuoso (Figura 4.4). Dicha reducción solo ocurre en células vivas, lo que permite evaluar su viabilidad comparando con el respectivo control (Carmichael *et al.*, 1988). Por lo que, si las células tumorales viven, la reducción se llevará a cabo y los pozos se observarán de color purpura, por el contrario, si hay muerte celular la reducción hacia formazán no se realizara o será menor y los pozos se observarán incoloros o con tonalidades más tenues del color purpura, dependiendo de la cantidad de células muertas.

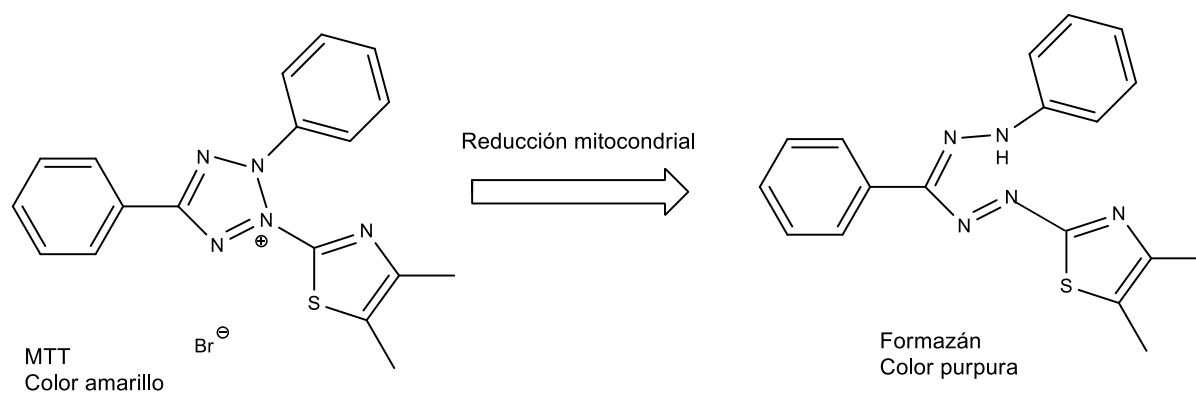


Figura 4.4: Reducción del MTT hacia formazán.

Para este ensayo se emplearon líneas celulares de cáncer de pulmón (SKLU-1) y cérvico-uterino (HeLa), debido a que son tipos de cáncer con alta incidencia.

IV.VI.I Soluciones requeridas para el cultivo celular

Medio de cultivo

Para la preparación de un litro de medio, se utilizaron los siguientes reactivos: un sobre con 10 g de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), L-Piruvato 100X (10 mL), antibiótico-Antimicótico 100X (10 mL), aminoácidos no esenciales (10 mL), NaHCO_3 (63.3 mM), HEPES (9.23 mM) y agua desionizada estéril cbp (900 mL).

Se disolvieron los componentes sólidos en 700 mL de agua desionizada, en un vaso de precipitados usando un agitador magnético. Se adicionaron los componentes líquidos, se agitó y se llevó a un volumen final de 900 mL con agua desionizada. Este medio de cultivo se esterilizó por filtración pasándolo a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm , posteriormente se complementó con 10% de suero bovino fetal (SFB) inactivado (este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar).

Medio para conservar células en congelación

Se utilizó medio de cultivo DMEM complementado (95%) y DMSO dimetilsulfóxido (5%).

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Para la preparación de un litro de solución se utilizaron los siguientes reactivos: NaCl (136.89 mM), KCl (2.68 mM), KH_2PO_4 (1.76 mM), Na_2HPO_4 (10.14 mM) y agua desionizada estéril (1L). El pH se ajustó a 7.4. La solución se esterilizó también por filtración.

Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA (PBS-EDTA)

La solución se preparó de la misma forma que el PBS, adicionando 1 mM de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético).

Solución de MTT

Se pesó MTT (125 mg) en un tubo eppendorf estéril y se disolvió con 50 mL de PBS. El tubo se cubrió de la luz con papel aluminio.

Para el almacenamiento del medio de cultivo, el medio de congelación y la solución de MTT, las soluciones se pusieron en refrigeración.

IV.VI.II Mantenimiento y propagación del cultivo celular

En la manipulación del cultivo celular, se utilizó material estéril y los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en cajas Petri de plástico, con medio de cultivo DMEM. El medio se cambió cada tercer día. Para esto se decantó el medio y las células adheridas se lavaron con una solución de PBS-EDTA con el fin de eliminar los detritos, los cuales son productos de la degradación de compuestos orgánicos. Una vez que por microscopio óptico se verificó que las células se encontraran libres de detritos, se agregó medio fresco y se incubaron. La incubación fue en un ambiente con 5% de CO₂ y con una humedad relativa del 98% a 37°C. Cuando la confluencia fue del 90%, es decir, cuando las células cubren el 90% de la superficie de la caja Petri, las células se propagaron en otra caja con el objetivo de evitar la saturación. Para ello, se decantó el medio de cultivo, las células adheridas se lavaron con una solución de PBS, la cual también se decantó. Las células se incubaron en PBS+EDTA hasta que éstas presentaron una morfología esférica y entonces se retiró el PBS+EDTA agregando medio para despegarlas

con ayuda de una micropipeta. Por último una parte de la suspensión celular resultante se sembró nuevamente en otra caja Petri, adicionando nuevamente medio DMEM y homogeneizando con movimientos circulares para incubar otra vez.

IV.VI.III Conservación de células en congelación

Se obtuvo una suspensión celular de aquellas células con una confluencia del 90%, la suspensión celular se colectó en un tubo eppendorf y se centrifugo a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con medio de congelamiento colocándolo en un criotubo (aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células/mL), el cual se congeló a -70°C . Para descongelar las células: se froto con las manos el criotubo, se centrifugó, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con medio DMEM, la suspensión se colocó en una caja Petri y se incubó.

IV.VI.IV Conteo celular

Para realizar el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer. Para cada tipo celular ensayado se tomó una alícuota de la suspensión celular, la cual se colocó en la cámara y con un microscopio se hizo un conteo de los ocho cuadrantes, de los cuales se calculó el promedio. Para determinar el número de células por mililitro se aplicó la siguiente fórmula.

$$\text{Células/mL} = (\text{promedio de células}) \times [1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}]$$

Posteriormente se calculó el volumen de suspensión celular necesario para sembrar en una placa de 96 pozos con 7000 células por pozo y a un volumen final de 200 μL por pozo.

IV.VI.V Actividad citotóxica

Para determinar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos y los extractos de alcaloides (EA), se cultivaron las líneas celulares de cáncer de pulmón (SKLU-1) y cérvico-uterino (HeLa) como se describió anteriormente. Se pesaron 5 mg de los extractos metanólicos y los extractos de alcaloides, se disolvieron en 100 μL de DMSO calculando la concentración de cada disolución. Posteriormente, en la placa de 96 pozos, se colocaron 50 μL en cada pozo de diferentes concentraciones de las muestras (Cuadro 4.1), en las seis primeras filas (A-F), en la fila G DMSO (vehículo) y en la fila H solo medio DMEM (Figura 4.5). Las células tratadas se incubaron durante 48 hrs. Para determinar la viabilidad se agregaron 20 μL de solución MTT a cada pozo y se incubó nuevamente durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se retiró el sobrenadante y los cristales de formazán que se precipitaron se disolvieron con 100 μL de DMSO por pozo para obtener o no la coloración púrpura, de la cual se determinó su absorbancia a 250 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

Cuadro 4.1. Preparación de los stocks para los tratamientos con extractos metanólicos y extractos de alcaloides. El stock se reparte en 6 pozos, aplicando 50 μL por pozo.

STOCK	Volumen de muestra (μg)	Volumen de medio (μL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en cada pozo
A	4.900	345.1	140
B	2.450	347.6	70
C	1.225	348.8	35
D	0.613	349.4	17.5
E	0.306	349.7	8.75
F	0.153	349.8	4.375

STOCK	Volumen de muestra (µg)	Volumen de medio (µL)	Concentración (µg/mL) en cada pozo
G (DMSO)	2.450	347.6	
H (Medio)	-	350	

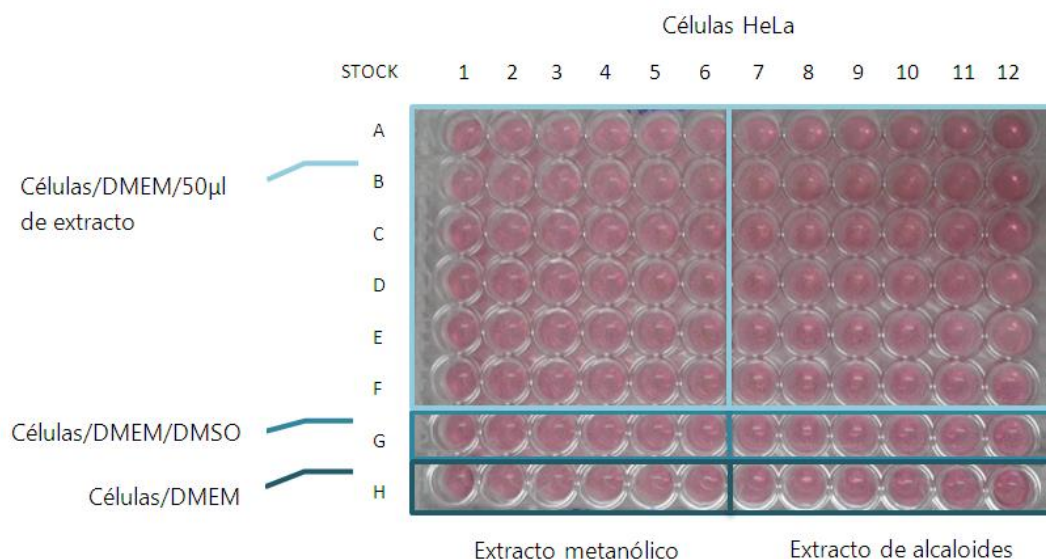


Figura 4.5 Distribución de los tratamientos en la placa de 96 pozos. Por cada placa se probaron dos muestras distintas. Cada muestra se probó a 6 concentraciones sucesivas iniciando con 140 µg y finalizando con 4.375 µg. Se hicieron 6 repeticiones (1-6 y 7-12). Se agregó DMSO como control (fila G) y células con DMEM (fila H).

IV.VI.VI Cálculo de la IC₅₀

El porcentaje de viabilidad se calculó con la fórmula: $100 (A_F/A_C)$, donde A_F =absorbancia de las células tratadas y A_C = absorbancia de las células sin tratamiento. Posteriormente para cada muestra se determinó una concentración inhibitoria media (IC₅₀), la cual representa la concentración que produce una disminución de la viabilidad celular del 50% con respecto al vehículo. Esto se calculó usando un análisis de regresión no lineal con los datos de viabilidad celular respecto a cada concentración del tratamiento correspondiente. El análisis se realizó con el programa OriginPro® 7.0, los experimentos se realizaron por triplicado y se sacó un promedio para obtener

el valor final de la IC₅₀ (I. González, com. pers.). Posteriormente con los valores de IC₅₀ de los extractos de alcaloides se realizó una ANOVA seguida de una prueba Tukey por medio del programa informático Graph Pad Prism versión 5.0., para determinar si los resultados eran significativamente diferentes.

V. RESULTADOS

V.I. Extractos metanólicos y fracciones alcaloideas

De la colecta realizada en el 2015, se obtuvieron extractos metanólicos y fracciones alcaloideas de cada parte de la planta, es decir de los bulbos, raíces y partes aéreas por separado. El peso seco del material inicial y sus respectivos rendimientos se muestran en el cuadro 5.1. En el caso de las fracciones alcaloideas, el rendimiento de estas corresponde a la fase orgánica dos (FO2), ya que en ésta fase fue dónde se extrajo la mayor cantidad de alcaloides en todos los casos y en relación con la FO3 fueron más abundantes, lo cual se corroboró por CCF. Por tanto, en el texto los extractos de alcaloides (EA) harán referencia a las FO2 de cada parte de la planta. En el cuadro 5.1, puede observarse que el mayor rendimiento en los extractos metanólicos se obtuvo de las partes aéreas siendo casi de la misma forma en los extractos de alcaloides ya que en este caso las raíces tuvieron un ligero mayor rendimiento. Sin embargo de los bulbos se obtuvo mayor cantidad de extracto metanólico y de extracto de alcaloides.

Cuadro 5.1. Rendimientos de extractos metanólicos y extractos de alcaloides (EA) obtenidos por cada parte de la planta. En negritas se muestran los valores más altos de cada sección. Se presentan también valores en % con respecto al peso seco (para los extractos metanólicos) y al extracto metanólico (para los extractos de alcaloides).

	Peso seco (g)	Extracto Metanólico (g-%)	Extracto de alcaloides (mg-%)
Raíz	9.9	1.6-16.6	38.3- 2.3
Bulbo	83.8	10.8-12.9	172.5-1.5
Partes aéreas	26.3	4.7- 18.1	105.1-2.2

Por otro lado, en el cuadro 5.2, se muestran los alcaloides mayoritarios de los EA de cada parte de la planta detectados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). De la mayoría de alcaloides se presentan su relación masa/carga (m/z) para caracterizarlos. La relación m/z de cada alcaloide se basa en los picos principales de su espectro de masas, es decir, el pico base (el pico más alto del espectrograma, que es el más estable y con mayor abundancia) y el ion molecular M^+ (el fragmento que perdió un electrón de la molécula). Los compuestos mayoritarios se asumieron como alcaloides ya que su ion molecular (M^+) fue impar debido a la presencia de nitrógeno. Como puede observarse en dicha tabla, el alcaloide mayoritario en cada parte de la planta es diferente; sin embargo, en todas se detectó la presencia de los alcaloides m/z 278 (279) y m/z 226 (287). El 3'-demetoximesembranol únicamente se encontró en las partes aéreas.

Cuadro 5.2: Alcaloides mayoritarios detectados por GC-EM de los EA.

Alcaloide	Bulbo	Raíz	Partes aéreas
<i>m/z</i> 226 (287)	**	*	*
<i>m/z</i> 278 (279)	*	*	*
<i>m/z</i> 248 (249)	*	**	
3'-demetoximesembranol			**

Se detectaron ocho alcaloides en el bulbo y seis en la raíz y partes aéreas.

* Presencia de alcaloides en cada parte de la planta. ** Alcaloide más abundante en cada parte de la planta.

En el análisis de CG-EM de los EA del bulbo, se detectaron ocho alcaloides, de los cuales, el más abundante corresponde a un compuesto desconocido con un tiempo de retención (TR) de 23.23 en el cromatograma (Figura 5.1) y con *m/z* de 226 (287) (Figura 5.2).

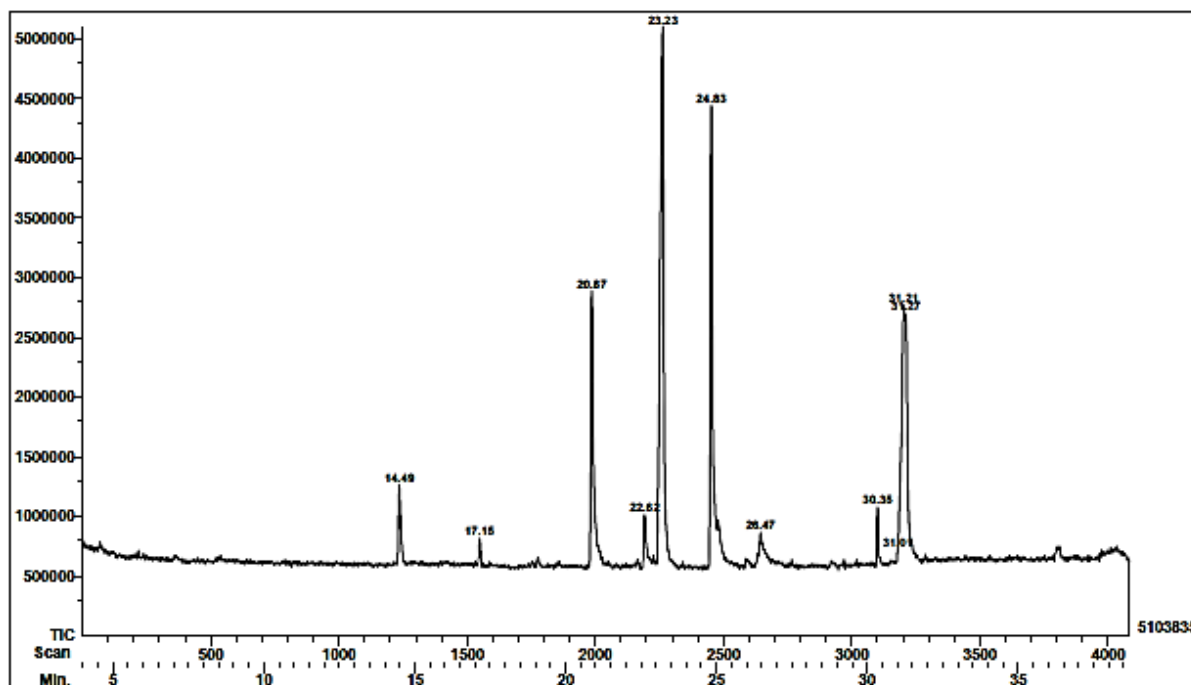


Figura 5.1: Cromatograma del EA del bulbo, con un pico mayoritario en un TR de 23.23.

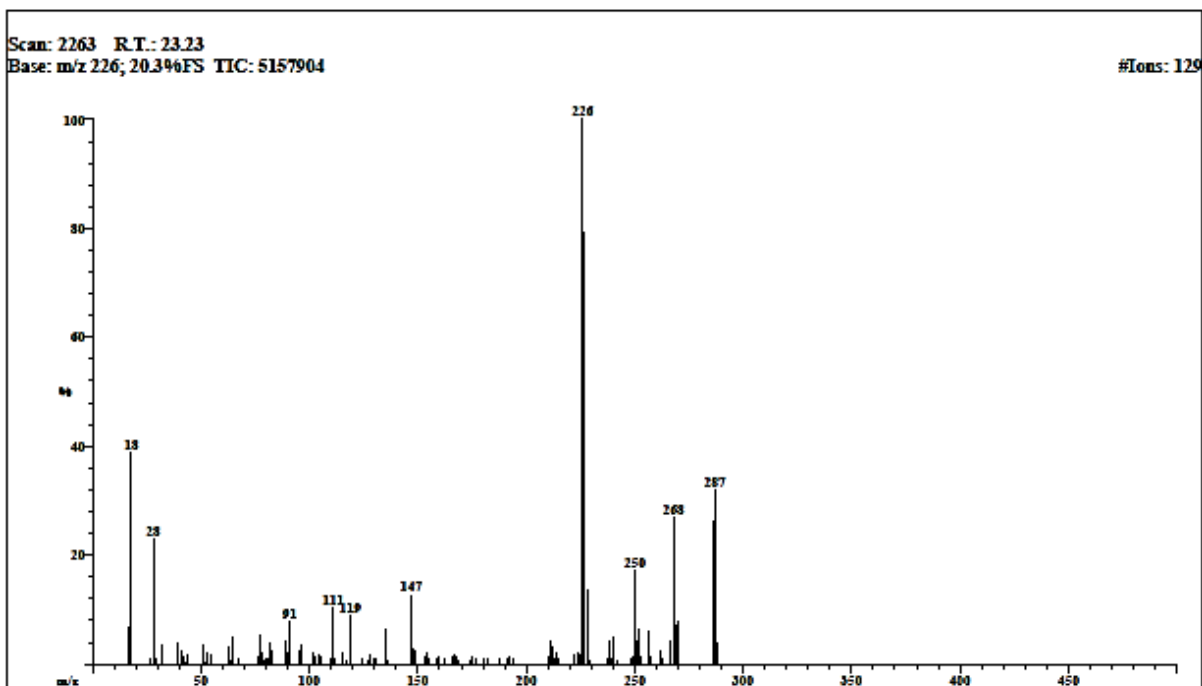


Figura 5.2: Espectro de masas del pico mayoritario del EA del bulbo, con m/z de 226 (287).

Para el EA de las partes aéreas se detectaron seis alcaloides, el alcaloide más abundante tuvo un TR de 14.44 en el cromatograma (Figura 5.3), un m/z de 186 (261) en el espectro de masas (Figura 5.4) y corresponde al 3'-demetoximesembranol, un alcaloide previamente reportado por Centeno-Betanzos (2014); (Figura 5.5).

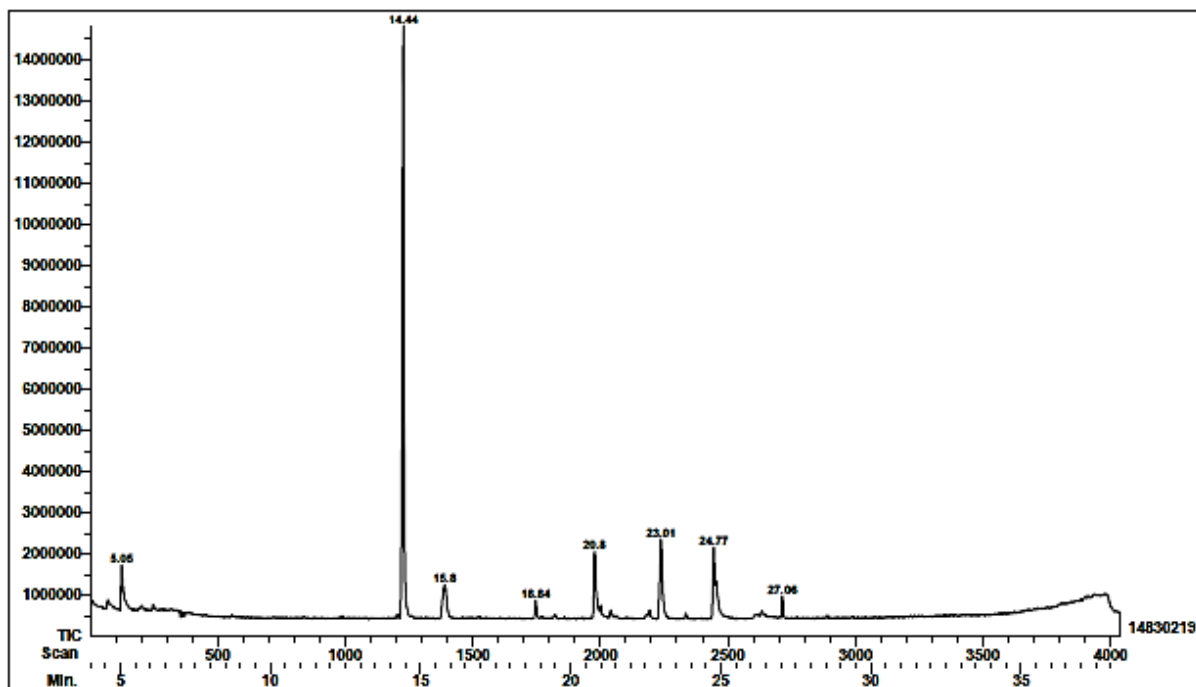


Figura 5.3: Cromatograma del EA de las partes aéreas, con un pico mayoritario en un TR de 14.44.

Scan: 1229 R.T.: 14.44
 Base: m/z 189; 32%FS TIC: 15639936

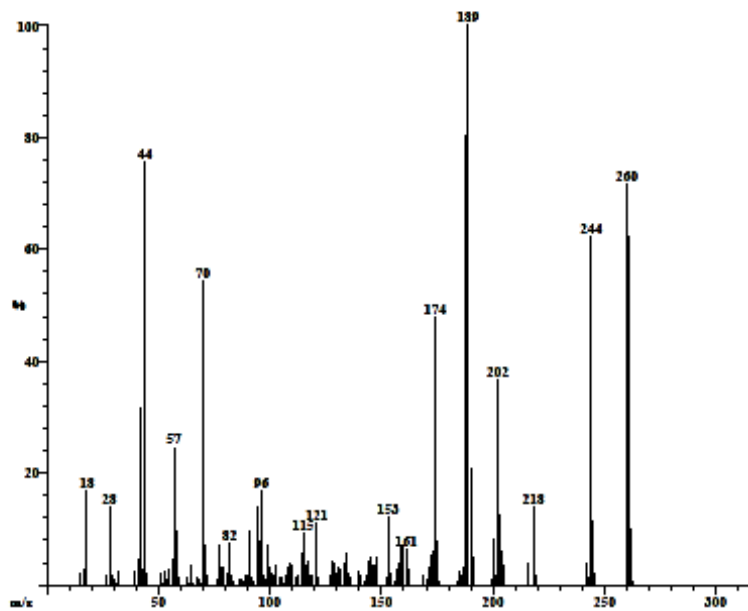


Figura 5.4: Espectro de masas del pico mayoritario del EA de las partes aéreas, con m/z de 189 (261).

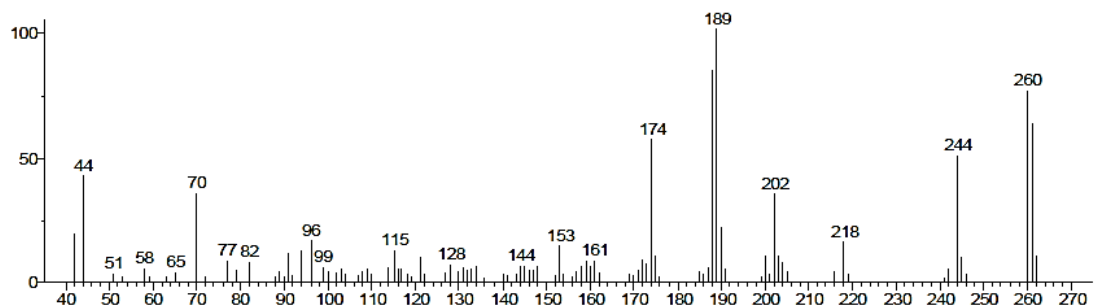
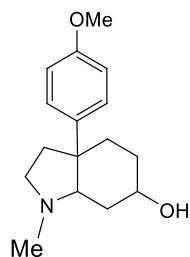


Figura 5.5: Espectro de masas del 3'-demetoximesembranol (Centeno-Betanzos, 2014), el cual corresponde al compuesto mayoritario en el EA de las partes aéreas con m/z de 189 (261).

En cuanto al EA de la raíz, se detectaron seis alcaloides y el alcaloide más abundante corresponde a un compuesto con un TR de 20.85 (Figura 5.6) y con m/z de 248 (249) (Figura 5.7).

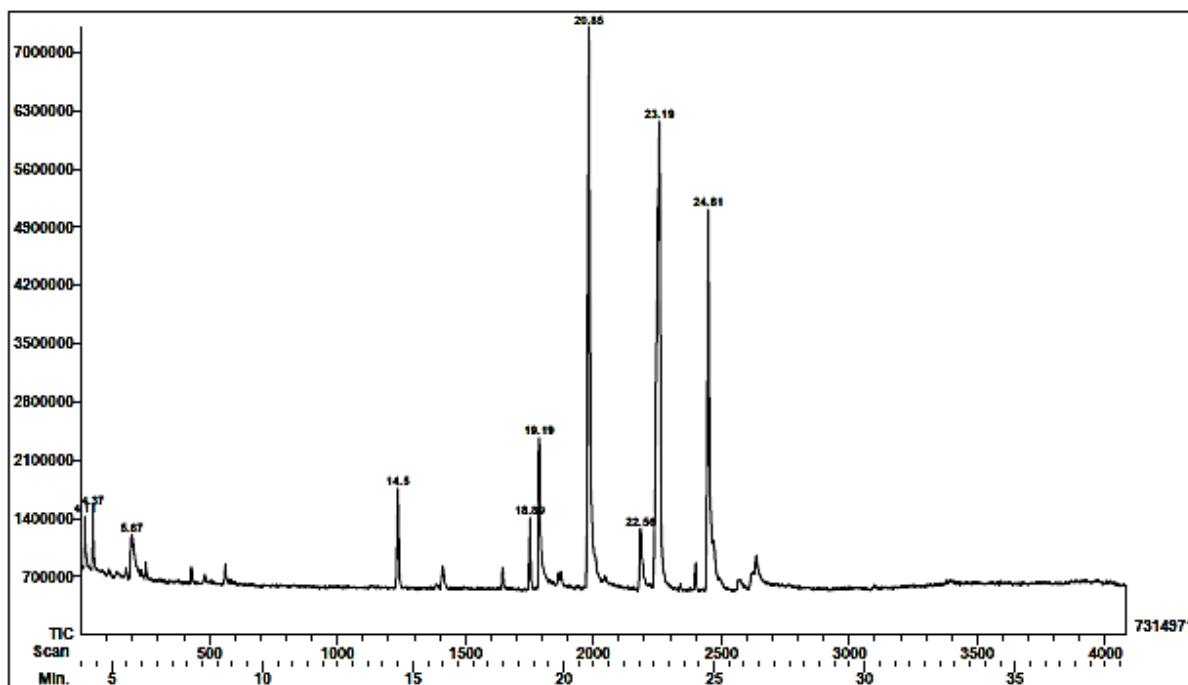


Figura 5.6: Cromatograma del EA de las raíces, con un pico mayoritario en un TR de 20.85.

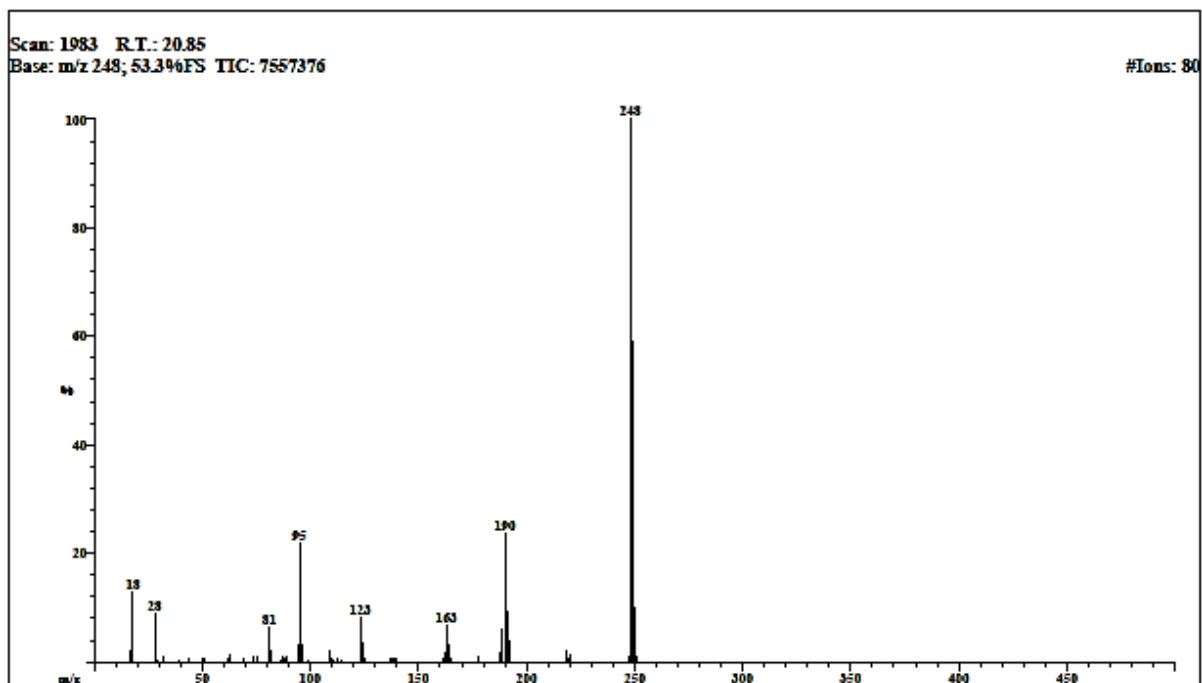


Figura 5.7: Espectro de masas del pico mayoritario del EA de las raíces, con m/z de 248 (249).

Como se detalló en la metodología, se juntaron todos los EA de las diferentes partes de la planta (bulbo, raíces y partes aéreas) con los EA obtenidos de una colecta anterior realizada en el 2011. Para poder hacer esto, previamente se realizó una comparación de las FO2 y FO3 (fase orgánica 2 y 3) de ambas colectas por CCF (Figura 5.8), observándose una reacción positiva para alcaloides únicamente en las FO2, por lo que las FO3 no se incluyeron en los análisis posteriores. En la comparación de las FO2 se observó que los EA de ambas colectas se resolvieron casi de la misma manera, incluyendo la presencia del 3'-demetoximesembranol y la licorina, dos alcaloides que se usaron como referencia. Además de esto, en la FO2 de la colecta 2011 se observó que había una reacción mayor (una mancha más grande) al reactivo de Dragendorff por lo que se decidió juntar las FO2 de ambas colectas con el fin de obtener mayor cantidad de los compuestos alcaloideos que se pudieran aislar.

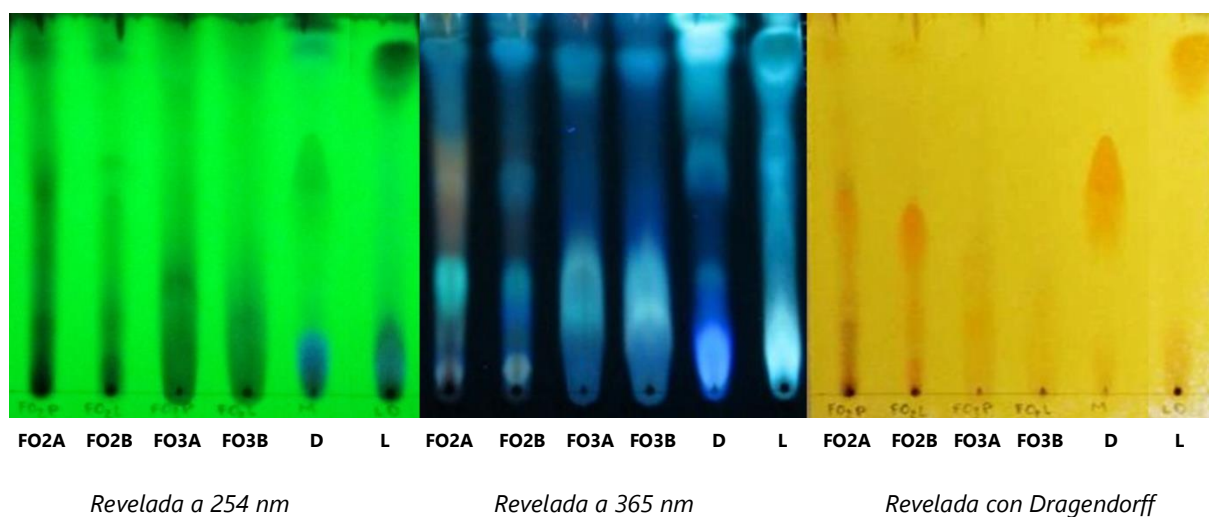


Figura 5.8: CCF de las fracciones alcaloides observadas en UV corto (254 nm), largo (365 nm) y con Dragendorff. FO2A y FO3A: Fase orgánica, colecta 2015. FO2B y FO3B: Fase orgánica, colecta 2011. D: 3'-demetoximesembranol. L: Licorina. Se observa que en las FO2 de ambas colectas hay reacción positiva para alcaloides. En las FO3 los compuestos no reaccionan positivamente a Dragendorff. Fase móvil: AcOEt /Acet / MeOH 3:5:1.5.

V.II. Purificación de compuestos alcaloides

Del proceso de purificación de los compuestos alcaloides por CLV (1,024 g), se obtuvieron 210 fracciones agrupadas en seis (de acuerdo a su similitud cromatografica) de los cuales, el grupo 2 (50.1 mg), 3 (56.4 mg), 4 (157.5mg) y 5 (47.6mg) presentaron reacción positiva para alcaloides (Figura 5.9). En la placa revelada con Dragendorff, se observa que el grupo 2 presenta una mancha naranja más grande que denota mayor cantidad de alcaloides en comparación con los otros grupos, en los que dicha mancha va disminuyendo paulatinamente hasta el grupo 5. En la placa revelada con UV corto y largo se observa que en cada grupo aún existen compuestos diferentes, por lo que se continuó con el proceso de purificación de los mismos.

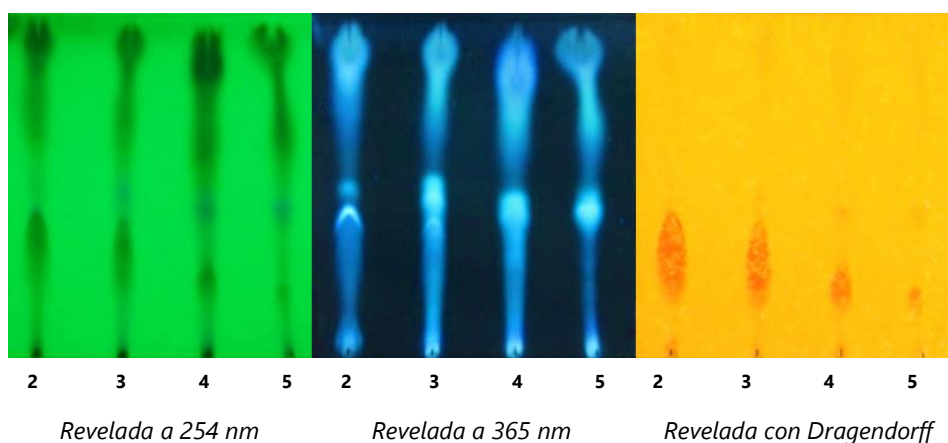


Figura 5.9: CCF de los cuatro grupos de fracciones con reacción positiva a alcaloides obtenidos mediante CLV. En la placa revelada con Dragendorff, se observa que la cantidad de los alcaloides va decreciendo del grupo 2 hacia el 5. Fase móvil: AcOEt /Acet / MeOH 3:5:1.5.

Los compuestos del grupo 4 (145.8 mg), fueron separados por CCFP, la fase móvil utilizada fue: MeOH/ AcOEt 3:1. De la CCFP resultaron cinco bandas (A-E). La banda B (8.2 mg), C (11 mg) y D (9.1 mg) presentaron reacción positiva para alcaloides. La banda C fue analizada por EM, debido a que fue la más abundante. El espectro de masas presenta la estructura típica de un ftalato, sin embargo, existen otras señales que podrían corresponder a un alcaloide (por la reacción positiva al reactivo Dragendorff); (Anexo 2 y 3). En las bandas B y D analizadas por CG-EM se encontraron otros alcaloides, de los cuales, se identificó la galantamina (Cuadro 5.3).

Cuadro 5.3: Alcaloides mayoritarios detectados por GC-EM en las bandas B y D del grupo 4 obtenidas por CCFP.

Compuesto	Banda	
	B	D
<i>m/z</i> 18 (287)	**	
Galantamina	*	
<i>m/z</i> 394 (395)		**
<i>m/z</i> 55 (285)		*

Se detectaron tres alcaloides en la banda B y quince en la banda D.

* Presencia de alcaloides en cada banda. ** Alcaloide más abundante en cada banda.

En la banda B, el alcaloide mayoritario corresponde a un compuesto desconocido con un TR de 16.79 en el cromatograma (Anexo 4) y con m/z de 18 (287); (Figura 5.10).

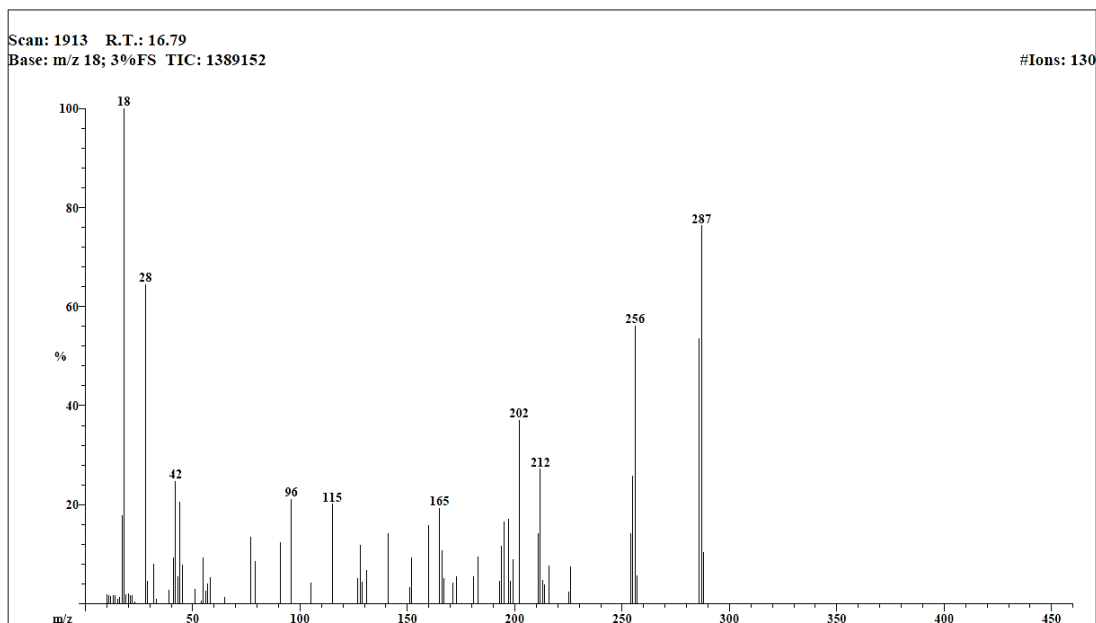


Figura 5.10: Espectro de masas del pico mayoritario de la banda B, con m/z de 18 (287).

En la banda D, el alcaloide mayoritario corresponde a un compuesto desconocido con un TR de 25.64 en el cromatograma (Anexo 5) y con m/z de 394 (395) (Figura 5.11).

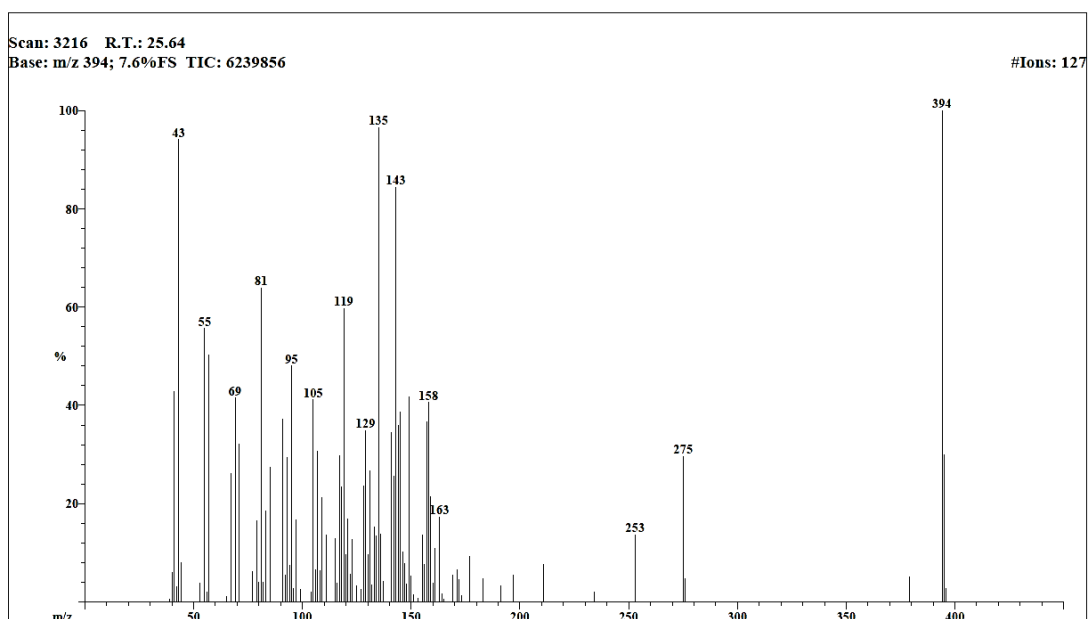


Figura 5.11: Espectro de masas del pico mayoritario de la banda D, con m/z de 394 (395).

Por otro lado, en el análisis de CG-EM de los grupos 2 y 3 de las fracciones obtenidas por CLV, los cuales se decidió juntar (104.3 mg) debido a su similitud cromatografica (Figura 5.9), denominada de aquí en adelante en el texto como “la mezcla”, se observó que el alcaloide mayoritario corresponde a un compuesto con un TR de 17.62 (Figura 5.12) y con m/z de 286 (287); (Figura 5.13), además su espectro de masas es igual a uno de la base de datos correspondiente a la galantamina (Figura 5.14). El segundo alcaloide mayoritario en el cromatograma con un TR de 14.46 y con m/z de 189 (261) en el espectro de masas, corresponde al 3'-demetoximesembranol. Además de estos dos alcaloides, en la mezcla también se detectó la presencia de otros dos más: m/z 253 (296) y m/z 301 (301) (Anexo 6 y 7).

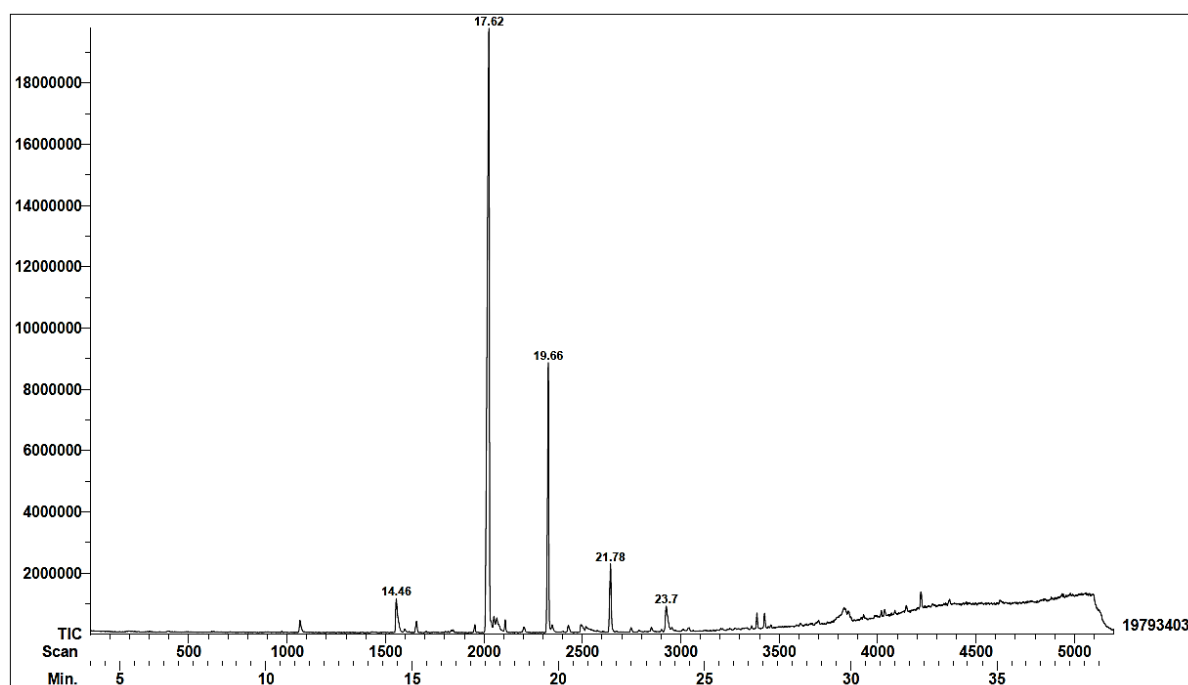


Figura 5.12: Cromatograma de la mezcla, con un pico mayoritario en un TR de 17.62.

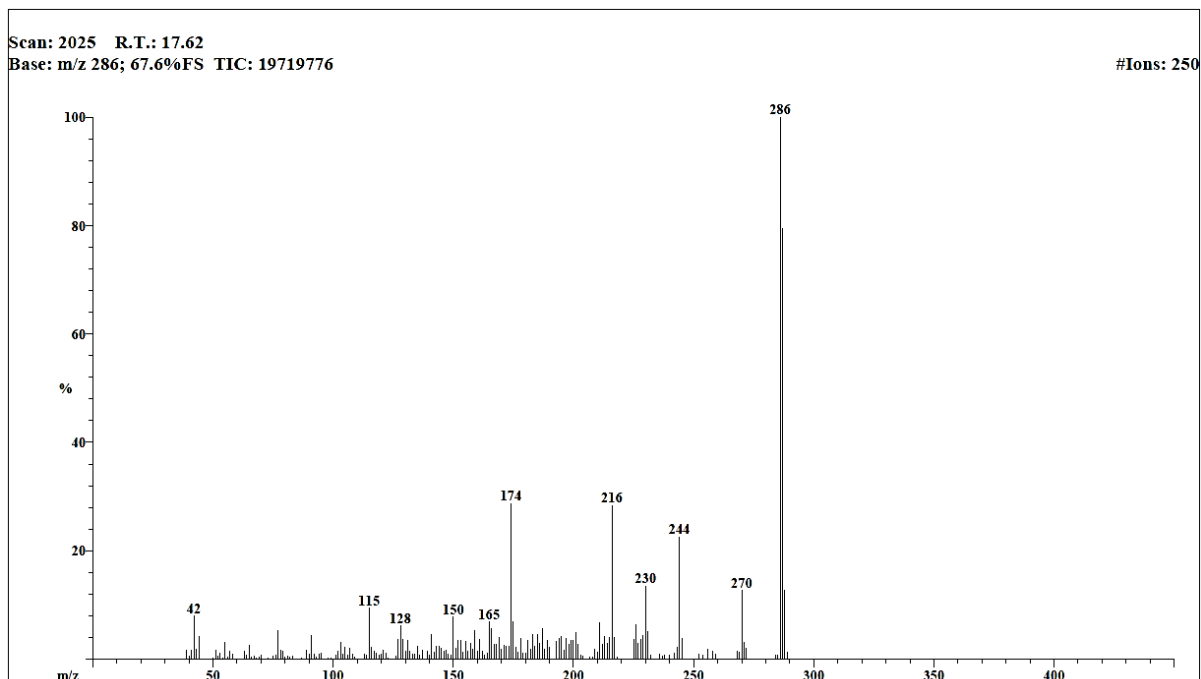


Figura 5.13: Espectro de masas del pico mayoritario de la mezcla, con m/z de 286 (287).

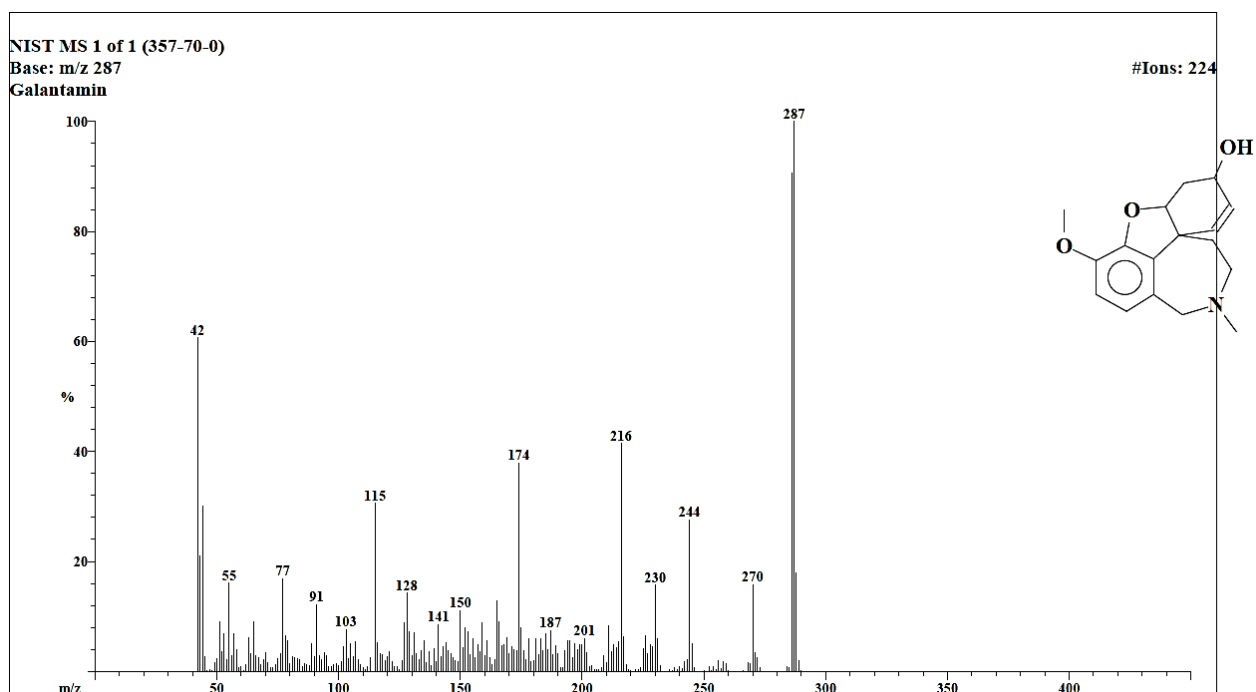


Figura 5.14: Espectro de masas de la base de datos (galantamina), con m/z de 286 (287).

De la CC de la mezcla se obtuvieron 132 fracciones en total. De la fracción 80 a la 118 hubo reacción positiva para alcaloides y de acuerdo a la similitud cromatografica, se formaron cinco grupos; 1 (1.1 mg), 2 (6.5 mg), 3 (0.7 mg), 4 (5.2 mg) y 5 (22 mg) (Figura 5.15). Para el grupo 1, bajo luz UV (365 nm) se

observó por lo menos dos compuestos (dos manchas azules) mismas que al ser reveladas con Dragendorff son menos visibles. Los grupos 2 y 3 bajo luz UV presentan dos tipos de alcaloides cada uno, los cuales si bien se encuentran traslapados, se observó mejor su presencia principalmente a luz UV 365 nm y en menor grado con Dragendorff (Figura 5.15). En cuanto a los grupos 4 y 5, se observó aparentemente una sola mancha revela con Dragendorff.

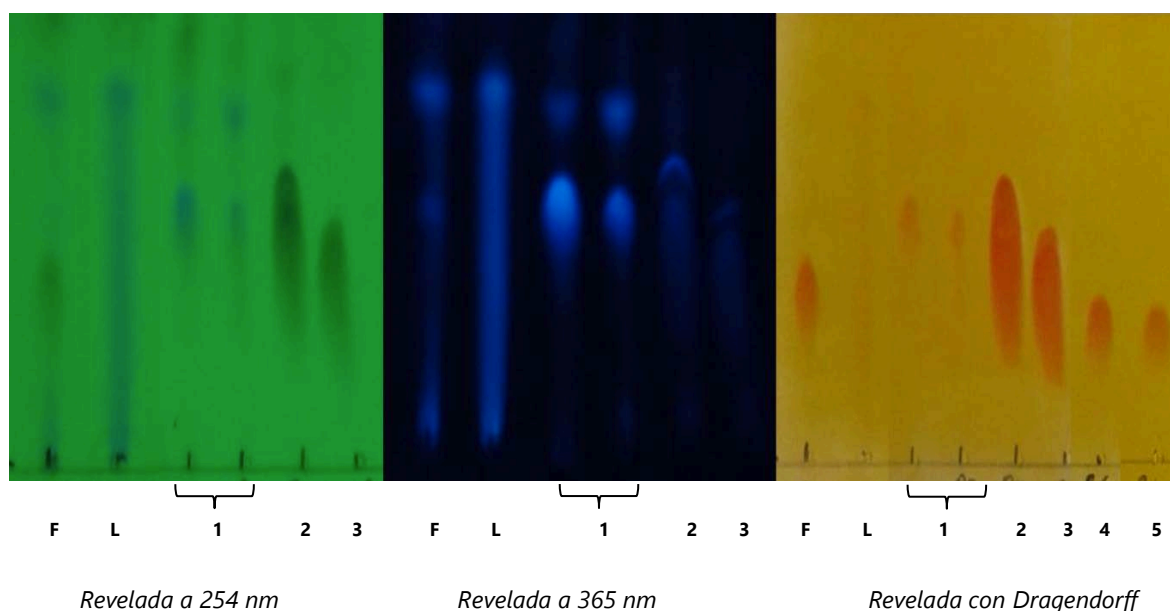


Figura 5.15: CCF de los cinco grupos de fracciones obtenidos por CC de la mezcla. F: fracción original, L: licorina. 1-5: grupo de fracciones. En el grupo 2 y 3 se observan dos compuestos traslapados a 365 nm, de la misma forma que con Dragendorff. En los grupos 1, 4 y 5 la reacción con Dragendorff es menor a los grupos 2 y 3. Fase móvil: AcOEt/ MeOH 7:3.

Del análisis de CG-EM de los cinco grupos obtenidos de la CC, en el grupo 1 (1.1mg) se detectaron nueve alcaloides, en el 2 (6.5mg) cuatro, en el 3 (0.7mg) dos, en el 4 (5.2mg) tres y en el 5 (22mg) uno (Anexo 8, 9, 10, 11 y 12). En el cuadro 5.4 se muestran los alcaloides mayoritarios en cada uno de los cinco grupos.

Cuadro 5.4: Alcaloides mayoritarios detectados por GC-EM en los cinco grupos obtenidos por CC de la mezcla.

Alcaloide	Grupo				
	1	2	3	4	5
Galantamina		**	**	**	**
Clidantina				*	
3'-demetoximesembranol		*	*		
<i>m/z</i> 311 (311)	**				

Se detectaron nueve alcaloides en el grupo 1, cuatro en el 2, dos en el 3, tres en el 4 y uno en el 5.

* Presencia de alcaloides en cada grupo. ** Alcaloides más abundantes en cada grupo.

Para el grupo 1, el alcaloide mayoritario en el cromatograma corresponde a un compuesto desconocido con un TR de 21.3 (Anexo 8) y con una *m/z* de 311 (311) (Figura 5.16).

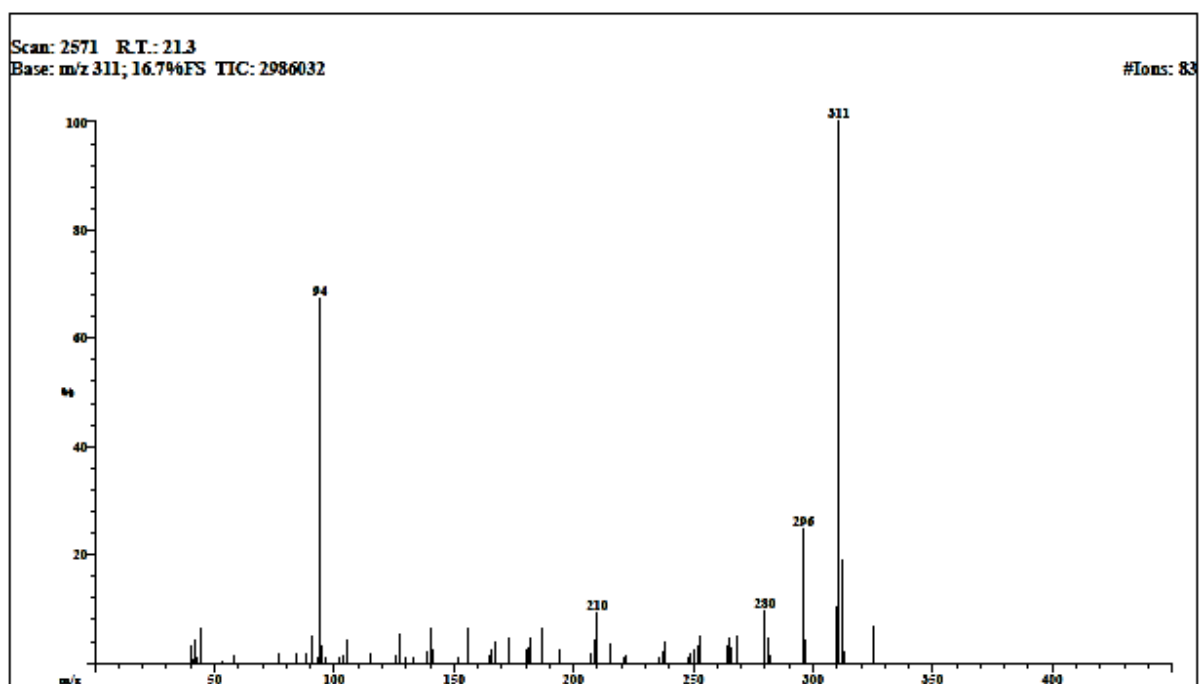


Figura 5.16: Espectro de masas del pico mayoritario del grupo 1, con *m/z* de 311 (311).

En el análisis de CG-EM del grupo 2, 3, 4 y 5, se puede observar que el alcaloide mayoritario en todos estos grupos corresponde a un compuesto con *m/z* de 286 (287), cuyo espectro de masas corresponde a la galantamina (S. Berkov *et al.*, 2012). A pesar de que en el análisis de CG-EM se observó que los grupos 3 y 5 son los grupos más puros porque presentan menos compuestos (Cuadro

5.4), se decidió analizar al grupo 2 por RMN de ^1H debido a que se tenía en mayor cantidad. Dicho análisis confirmó la presencia del 3'-demetoximesembranol así como de la galantamina (Figura 5.17) ya que los espectros de RMN ^1H presentaron los mismos patrones de desplazamiento previamente reportados por Centeno-Betanzos (2014) para el 3'-demetoximesembranol y por Reyes-Chilpa *et al.*, (2011) para la galantamina.

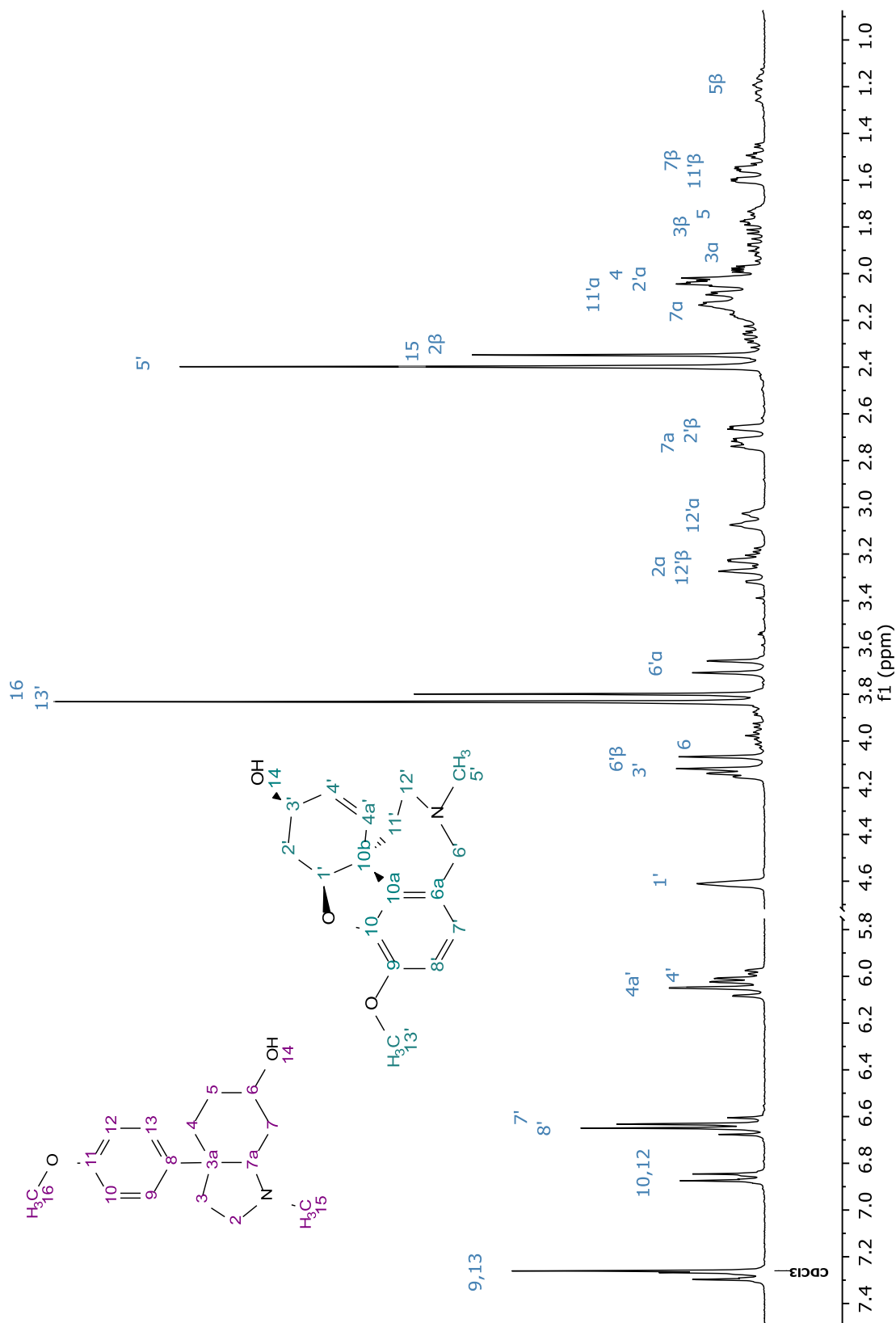


Figura 5.17: Espectro de RMN- ^1H (300 MHz) del grupo 2, registrado en CDCl_3 , se observan las señales correspondientes a la galantamina y al 3'-demetoximesembranol.

V.III. Evaluación de la actividad citotóxica

Los extractos metanólicos del bulbo y raíces disminuyeron la viabilidad celular en las dos líneas tumorales probadas (HeLa y SKLU-1) alrededor del 60%, mientras que el extracto metanólico de las partes aéreas fue el menos activo disminuyendo la viabilidad celular en ambas líneas tumorales solo hasta el 45%.

Con los datos de concentración respecto a la viabilidad celular se determinó una IC₅₀ (concentración a la que se produce una disminución de la viabilidad celular del 50%) para cada uno de los extractos metanólicos y extractos de alcaloides. Para los extractos metanólicos de la raíz en ambas líneas celulares y del bulbo en células HeLa, se obtuvo una IC₅₀ entre 20 y 30 µg/mL. Mientras que para los extractos metanólicos del bulbo en células SKLU-1 y de las partes aéreas en HeLa y SKLU-1, no se determinó un valor de IC₅₀ debido a que no presentaron una disminución de la viabilidad celular por debajo del 50% a las concentraciones evaluadas (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Evaluación citotóxica de los extractos metanólicos de las tres partes de la planta en dos líneas celulares.

Línea celular	Extracto metanólico	IC ₅₀ (µg/mL)*
HeLa	Raíces	22.49±3.11
	Bulbos	31.07±3.89
	Partes aéreas	> 120**
SKLU-1	Raíces	18.62±7.44
	Bulbos	>40**
	Partes aéreas	> 120**

*IC₅₀ ± error estándar, n=3.

** No se determinó el valor exacto de la IC₅₀ debido a que a las concentraciones evaluadas no se presentó una disminución de la viabilidad celular por debajo del 50%.

Por el contrario en los extractos de alcaloides del bulbo, raíces y partes aéreas la viabilidad celular disminuyó alrededor de un 65% en ambas líneas tumorales en general (Figura 5.18 y 5.19).

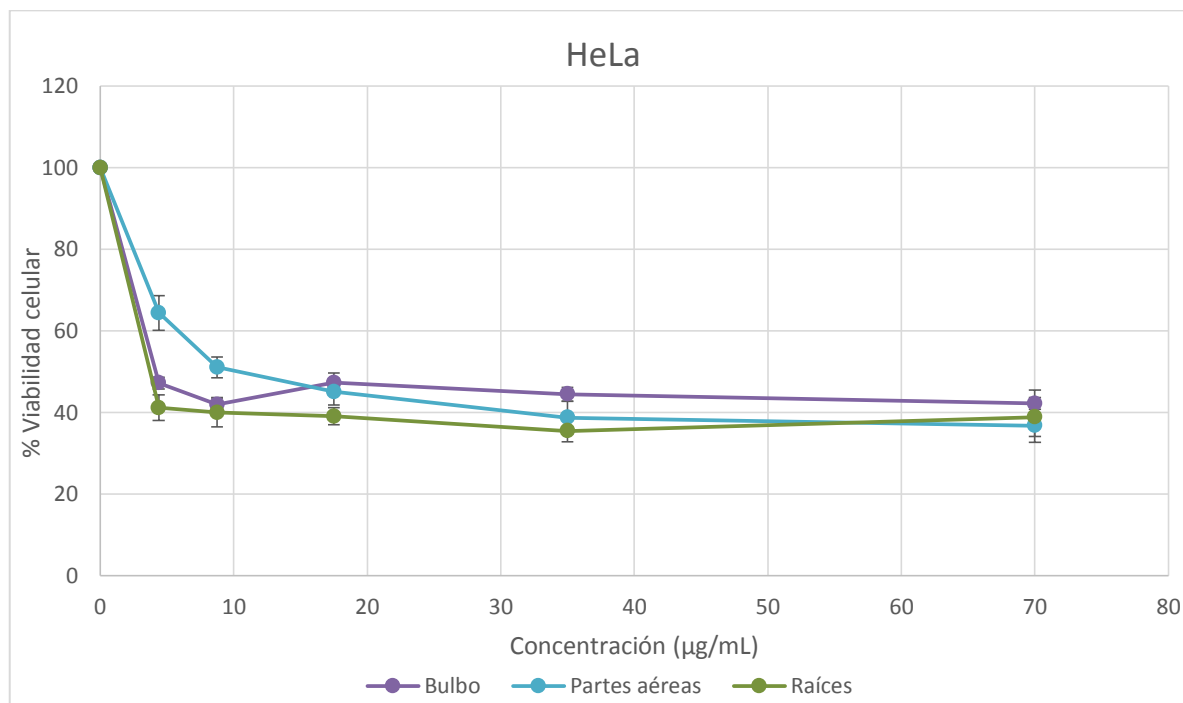


Figura 5.18: Efecto de los extractos de alcaloides sobre la viabilidad de las células HeLa. Los valores son promedios \pm el error estándar, $n=3$.

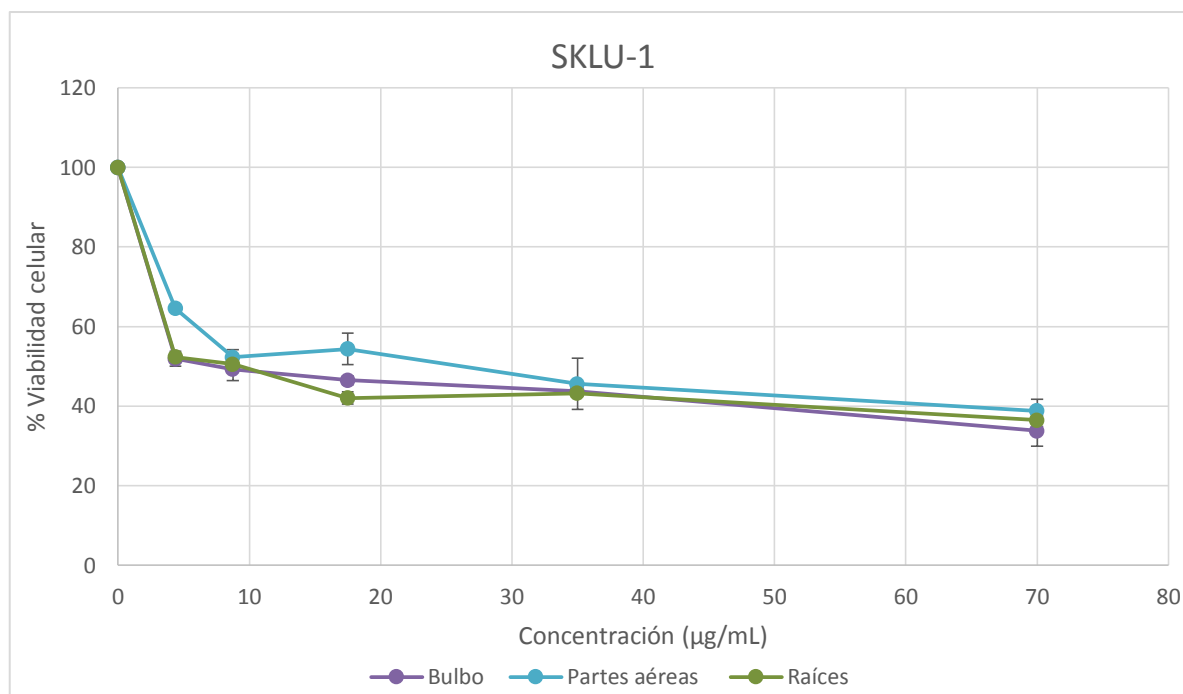


Figura 5.19: Efecto de los extractos de alcaloides sobre la viabilidad de las células SKLU-1. Los valores son promedios \pm el error estándar, $n=3$.

En el caso de la IC₅₀ de los extractos de alcaloides, la actividad citotóxica fue relevante ya que los valores de ésta, se encuentran entre 3 y 9.5 µg/mL. Si bien la actividad citotóxica es muy similar en los tres extractos, el extracto de la raíz fue 3.1 veces más potente que el de las partes aéreas y el extracto del bulbo fue 2.5 veces más potente que el extracto de las partes aéreas en células HeLa, mientras que en células SKLU-1, el extracto de la raíz fue 1.5 veces más potente que el de las partes aéreas y el extracto del bulbo fue 1.6 veces más potente que el extracto de las partes aéreas (Cuadro 5.6). De esta manera se comprobó que los extractos de alcaloides fueron más activos.

Cuadro 5.6. Evaluación citotóxica de los extractos de alcaloides de las tres partes de la planta en dos líneas celulares.

Línea celular	Extractos de alcaloides	IC ₅₀ (µg/mL)*
HeLa	Raíces	3.07±0.26
	Bulbos	3.88±0.27
	Partes aéreas	9.58±1.47**
SKLU-1	Raíces	5.97±0.52
	Bulbos	5.55±0.61
	Partes aéreas	9.05±2.00**

*IC₅₀ ±error estándar, n=3.

** ANOVA, Significativamente diferente p<0.5, seguida de una prueba Tukey.

VI. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que el mayor rendimiento tanto en los extractos metanólicos como en los extractos de alcaloides, se obtuvo en la raíz, seguido de las partes aéreas y por último en el bulbo. De este último llama la atención que aunque presenta mayor masa en comparación con las otras partes de la planta, se obtuvo un ligeramente menor rendimiento (Cuadro 5.1). Ahora bien, lo anterior se compensa debido a que el bulbo ostenta la mayor cantidad de masa de toda la planta a diferencia de las raíces que por el contrario son las menos abundantes. Si bien no se cuenta con reportes acerca de la merma de poblaciones silvestres de *Z. fosteri*, es importante tomar en cuenta que al obtener extracto de la raíz se puede perjudicar a las poblaciones de *Z. fosteri*, ya que para obtener la raíz se colecta la planta completa, esto pasa de la misma forma con el bulbo, pero en este caso se ha observado que sí se colecta solo la mitad haciendo un corte tangencial del bulbo a la altura del tallo, la planta puede recuperarse, sobrevivir y continuar con su ciclo de vida (L. Centeno, com. pers.), por tanto esta podría ser una mejor alternativa. Otra alternativa podría ser optar por una "poda" de la planta, obteniendo así las partes aéreas, siempre y cuando solo se colecten las hojas o el escapo sin flores ni semillas, ya que de colectar las semillas también se perjudicaría la dispersión y la variabilidad genética de las siguientes generaciones. Ahora bien, en el caso de aquellas plantas cuyos principios activos sean destinados a la elaboración de medicamentos, la colecta de estas debe ser a partir de cultivos, ya que de esta forma hay un control de calidad de los compuestos obtenidos y con buenos rendimientos, por lo que de ser el caso de esta especie, sería indispensable la investigación en cuanto a la propagación,

ya sea a partir de semillas, cortes tangenciales del bulbo o por medio de cultivo de tejidos para producir raíces (extracto de alcaloides más activo).

En cuanto a la purificación de compuestos alcaloideos, se encontró que en los grupos 2 al 5 de las fracciones obtenidas por medio de CC, el alcaloide más abundante fue la galantamina (Cuadro 5.4), este alcaloide no ha sido reportado para *Z. fosteri*, pero si para *Habrantus concolor* (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011 y Centeno-Betanzos, 2014), lo cual podría sugerir que algunos extractos metanólicos utilizados en el presente estudio provenientes de una colecta anterior realizada en 2011 en diferentes zonas de amortiguamiento de la REPSA, correspondían a *Habrantus concolor* y no a *Z. fosteri*. Esto debido, por un lado, a que se hubiera colectado *H. concolor* por error ya que ésta puede presentar morfotipos parecidos a *Z. fosteri* sobre todo en etapas tempranas del desarrollo de la planta y que solo en algunos casos podría confundirse con *Z. fosteri*, sobre todo en las zonas de distribución que comparten. Por lo tanto se considera corroborar estos resultados con la realización de una nueva colecta, ya que habrá que tener en cuenta que no existe información acerca de las probables variaciones en la síntesis de compuestos alcaloides debido a las múltiples variables como son el hábitat, las diferentes etapas del ciclo de vida, estrés u otros factores que provoquen cambios en el metabolismo secundario de esta especie, por lo cual se desconoce la posibilidad de que *Z. fosteri* pudiera presentar otros quimiotipos. También se encuentra la posibilidad de que en dichas zonas de colecta pueda distribuirse un probable híbrido entre *Z. fosteri* y *H. concolor* que presentara galantamina (L. Centeno, datos no pub.).

En cuanto a la actividad citotóxica, los extractos de alcaloides redujeron la viabilidad celular alrededor de un 65% (Figura 5.18 y 5.19) y por tanto presentaron valores de IC₅₀ menores (Cuadro 5.6) a lo de los extractos

metanólicos (Cuadro 5.5.). La citotoxicidad de los extractos alcaloideos de la raíz ($3.07 \mu\text{g/mL} \pm 0.26$ en HeLa y $5.97 \mu\text{g/mL} \pm 0.52$ en SKLU-1) y del bulbo ($3.88 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ en HeLa y $5.55 \mu\text{g/mL} \pm 0.61$ en SKLU-1) fueron más potentes que los de las partes aéreas ($9.58 \mu\text{g/mL} \pm 1.47$ en HeLa y $9.05 \mu\text{g/mL} \pm 2.00$ en SKLU-1). Los extractos metanólicos mostraron una menor actividad en las dos líneas tumorales ensayadas (SKLU-1 y HeLa). La diferencia de la actividad citotóxica de los extractos de alcaloides en comparación con los metanólicos se debe a la composición de estos. Centeno-Betanzos (2014), reportó la presencia de alcaloides mayoritarios como la licorina en bulbos y raíces y en menor abundancia la 2-O-acetil-licorina y crinamina en raíces, dichos alcaloides presentan efectos citostáticos o con inducción de apoptosis (Liu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; McNulty *et al.*, 2007; Zupkó *et al.*, 2009). En cambio en los extractos metanólicos de *Z. fosteri* se encuentra mayoritariamente ácidos grasos, ácido glutámico, esterol y sitosterol, por lo que la cantidad de alcaloides se encuentra menos concentrada.

En este estudio los alcaloides mayoritarios en las tres partes de la planta fueron el 3'-demetoximesembranol, m/z 226 (287), m/z 278 (279) y m/z 248 (249), el primero coincidió como mayoritario con lo ya reportado por Centeno-Betanzos (2014), en cambio el m/z 226 (287), m/z 278 (279) y m/z 248 (249), se reportaron con concentraciones menores del 7 al 1% del total, lo cual pudo deberse a los cambios hechos en la metodología, principalmente en el estado del ciclo de vida de la planta que en el presente estudio fue después de dispersar las semillas y en el de Centeno-Betanzos fue durante la floración. La época de colecta de la planta es importante, ya que se pueden presentar variaciones en la cantidad y naturaleza de los compuestos o principios activos, aunque el

análisis de esta variación no era parte de los objetivos, se pudieron observar claramente las variaciones en los compuestos alcaloideos obtenidos.

Por otro lado, se observó que los extractos de alcaloides del bulbo, raíz y partes aéreas, presentan una actividad citotóxica relevante en células SKLU-1 y HeLa, lo cual puede deberse al sinergismo entre ellos o por la actividad de alguno de sus alcaloides mayoritarios, por lo que sería interesante realizar su aislamiento e identificación para poder evaluar su actividad citotóxica particular, además de su mecanismo de acción y su selectividad a ciertas células tumorales y células normales.

En el caso del 3'-demetoximesembranol (Cuadro 5.2) el compuesto mayoritario en el extracto de alcaloides de las partes aéreas, que no fue posible aislar debido principalmente a la poca cantidad de la muestra, se han realizado reportes acerca de la actividad biológica de este tipo de estructuras. Este alcaloide que no es típico de las amarillidáceas, tiene un esqueleto tipo mesembrano, este tipo de alcaloides se encuentran presentes principalmente en la familia Aizoaceae o Mesembryanthemaceae (Pigni, 2013). El género *Sceletium* es popular por sus alcaloides tipo mesembrano, tales como: mesembrina, mesembrenol, mesembrenona y mesembranol. En especial *S. tortuosum* ha sido muy estudiada, pues tradicionalmente se utiliza como un remedio para tratar padecimientos que afecten al SNC. Por otra parte, en un estudio ya reportado, los alcaloides tipo mesembrano que se encuentran en dicha planta como la mesembrina, mesembrenol y mesembrenona, no presentaron efectos citotóxicos en dos líneas celulares: HepG2 (hepatoma humano) y HS27 (fibroblastos humanos), (Harvey *et al.*, 2011). Pero la mesembranona si presentó un efecto citotóxico en la línea celular Molt4 (Leucemia linfoblástica aguda humana) (CE₅₀ 0.6 µg/ml) y además mostró

especificidad en comparación con una línea celular no tumoral murina (LMTK) (CE_{50} 10 $\mu\text{g/mL}$) y HepG2 (hepatoma humano) (CE_{50} >50 $\mu\text{g/mL}$). En ese trabajo se sugirió que el efecto nulo en la citotoxicidad sobre células HepG2 se pudo deber a que expresan cierta actividad de catabolización por el complejo enzimático del citocromo P450, lo que podría explicar su resistencia farmacológica relativa (Weniger *et al.*, 1995). De acuerdo con estos antecedentes, se podría sugerir que el compuesto 3'-demetoximesembranol mayoritario en el extracto de alcaloides de las partes aéreas de *Z. fosteri* puede estar relacionado con la actividad citotóxica observada, ya que su estructura difiere poco con la de la mesembranona; un metoxilo en el carbono 5', un alcohol en vez de una cetona en el carbono 6 y un doble enlace entre en carbono 4 y 5 (Anexo 13).

VII. CONCLUSIONES

- 1 El extracto de alcaloides de la raíz, presento el mayor rendimiento seguido de las partes aéreas y del bulbo.
- 2 Los extractos de alcaloides mostraron una mayor actividad citotóxica en comparación con los extractos metanólicos.
- 3 Los extractos de alcaloides presentaron una actividad citotóxica relevante en las dos líneas tumorales ensayadas (HeLa y SKLU-1), siendo mayores el de la raíz y del bulbo.
- 4 Se identificaron cuatro alcaloides mayoritarios en las tres partes de la planta, el 3'-demetoximesembranol fue el más abundante en las partes aéreas, este alcaloide se había reportado anteriormente como el segundo más abundante en *Z. fosteri* en todas las partes de la planta. También se detectó la presencia de los alcaloides con m/z 226 (287), m/z 278 (279) y m/z 248 (249).
- 5 Se aisló e identificó por CG-EM y RMN ^1H una mezcla de galantamina y 3'-demetoximesembranol.

VIII. PERSPECTIVAS

- 1 Realización de más colectas de *Z. fosteri* o su cultivo para verificar la presencia de galantamina u otros compuestos similares a los de *H. concolor*.
- 2 Aislamiento e identificación de los alcaloides más abundantes en las tres partes de la planta, por métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.
- 3 Evaluación citotóxica particular de los alcaloides mayoritarios.
- 4 Elucidación del mecanismo de acción de los alcaloides sobre las líneas celulares HeLa y SKLU-1.
- 5 Determinación de un índice de selectividad entre las células HeLa y SKLU-1 con respecto a células normales (linfocitos) u otras líneas tumorales humanas.
- 6 Estandarización de un método de cultivo de *Z. fosteri* para asegurar un control de calidad y de abundancia de los alcaloides activos.

IX. LITERATURA CITADA

Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., y García-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.

Antoun, M. D., Mendoza, N. T., Ríos, Y. R., Proctor, G. R., Wickramaratne, D. B., Pezzuto, J. M., y Kinghorn, A. D. (1993). Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *Journal of natural products*, 56(8), 1423-1425.

Berkov, S., Viladomat, F., Codina, C., Suárez, S., Ravelo, A., y Bastida, J. (2012). GC-MS of amaryllidaceous galanthamine-type alkaloids. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(8), 1065-1073.

Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E. y Minna, J. D. (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *British Journal of Cancer*, 57(6), 540.

Centeno-Betanzos L. Y. (2014). Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. Concolor*. Tesis de Maestría. UNAM, D.F., 142 pp.

Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. México, D.F., 281 pp.

Elgorashi, E. E., Stafford, G. I., y van Staden, J. (2004). Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta medica*, 70(03), 260-262.

Fitzgerald, D. B., Hartwell, J. L., y Leiter, J. (1958). Tumor-damaging activity in plant families showing antimalarial activity: Amaryllidaceae. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 20(4), 763-774.

Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Harvey, A. L., Young, L. C., Viljoen, A. M., y Gericke, N. P. (2011). Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant *Sceletium tortuosum* and its principal alkaloids. *Journal of ethnopharmacology*, 137(3), 1124-1129.

IARC (2014). "World Cancer Report 2014." Consultado el 30/05/16 en: <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/wcr-order.php>

INEGI (2016). "Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer (4 de febrero)." Consultado el 30/05/16 en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

Jaworek, K., y Czaplicka, M. (2013). Determination of phthalates in polymer materials-comparison of GC/MS and GC/ECD methods. *Polímeros*, 23(6), 718-724.

Li, Y., Liu, J., Tang, L. J., Shi, Y. W., Ren, W., y Hu, W. X. (2007). Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology reports*, 17(2), 377-384.

Liu, J., Hu, W. X., He, L. F., Ye, M., y Li, Y. (2004). Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS letters*, 578(3), 245-250.

López-Ferrari, A. R. y Espejo-Serna, A. (2002). Amaryllidaceae. En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 128. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.

Lot, A., y Camarena, P. (2009). El Pedregal de San Ángel de la ciudad de México: Reserva ecológica urbana de la Universidad Nacional. *Biodiversidad del Pedregal de San Ángel. UNAM, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Coordinación de la Investigación Científica, México*, 19-25.

McNulty, J., Nair, J. J., Codina, C., Bastida, J., Pandey, S., Gerasimoff, J., y Griffin, C. (2007). Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, 68(7), 1068-1074.

NCI. (2015). "What Is Cancer?". Consultado el 30/05/16 en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.

OMS (2017). "10 datos sobre el cáncer". Consultado el 27/03/17 en: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>.

Pearson, V. E. (2001). Galantamine: a new Alzheimer drug with a past life. *Annals of Pharmacotherapy*, 35(11), 1406-1413.

Pettit, G. R., Melody, N., y Herald, D. L. (2001). Antineoplastic Agents. 450. Synthesis of (+)-Pancratistatin from (+)-Narciclasine as Relay1a. *The Journal of organic chemistry*, 66(8), 2583-2587.

Pettit, G. R., Pettit 3rd, G. R., Backhaus, R. A., Boyd, M. R., y Meerow, A. W. (1993). Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostyrils from *Hymenocallis*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1682-1687.

Pigni, N. B. (2013). Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos: las amarillidáceas como fuente de productos bioactivos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 204 pp.

Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C. K., Arseneau, S., Clotet-Codina, I., Esté, J., Codina, C., Viladomat, F., y Bastida, J. (2011). Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16(11), 9520-9533.

Rzedowski, G., Calderón. de, J. Rzedowski y colaboradores. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.

SEREPSA (Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel) (2013). Portal oficial de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. Ciudad Universitaria, México, D.F. Consultado el 30/05/2015 en: <http://www.repsa.unam.mx>.

Spurrier, M. A., Smith, G. L., Flagg, R. O., y Serna, A. E. (2015). A New Species of *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) from México. *Novon*, 24(3), 289-295.

Torres-Labandeira, J. J., Davignon, P., y Pitha, J. (1991). Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 80(4), 384-386.

Waizel, B. J. (2012). Las plantas y su uso anitumoral. *Un conocimiento ancestral con futuro prometedor. México: Instituto Politécnico Nacional*. 495 pp.

Weniger, B., Italiano, L., Beck, J. P., Bastida, J., Bergonon, S., Codina, C., Lobstein, A., y Anton, R. (1995). Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta medica*, 61(01), 77-79.

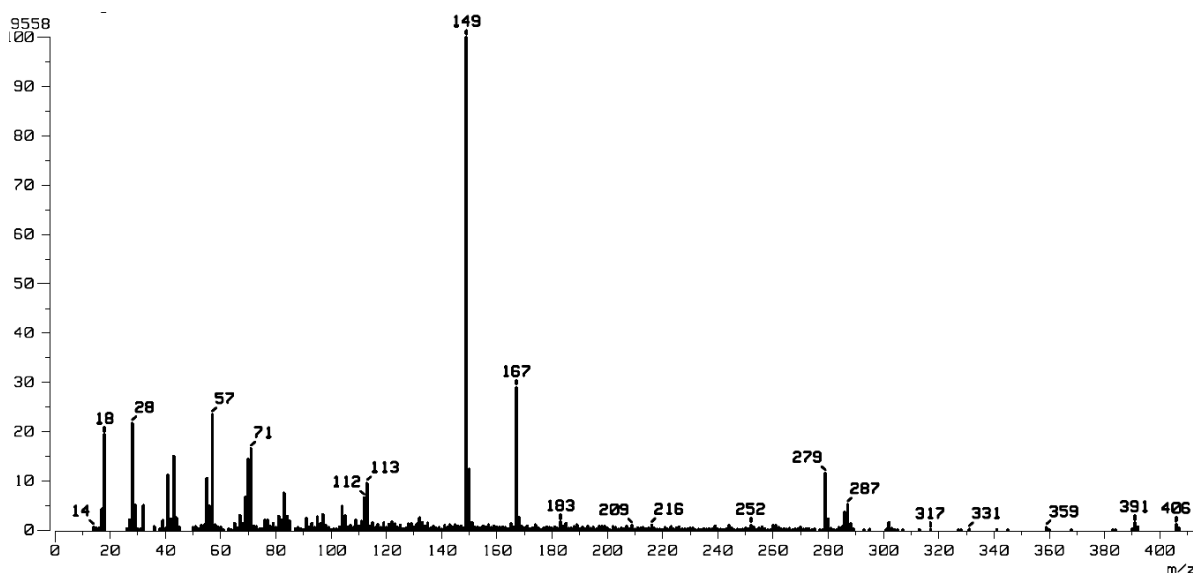
Zupkó, I., Rethy, B., Hohmann, J., Molnar, J., Ocsovszki, I., y Falkay, G. (2009). Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In vivo*, 23(1), 41-48.

X. ANEXOS

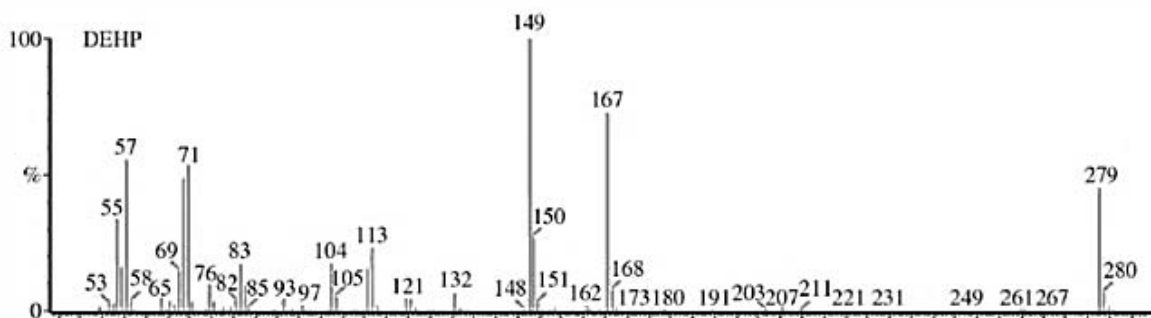
Preparación de la solución de sulfato cérico al 1%

Anexo 1: Se añaden 12 g de CeSO_4 a 350 g de hielo, posteriormente se agregan 22.2 mL de H_2SO_4 concentrado (40 g) y se agita con una varilla de vidrio.

Ftalato

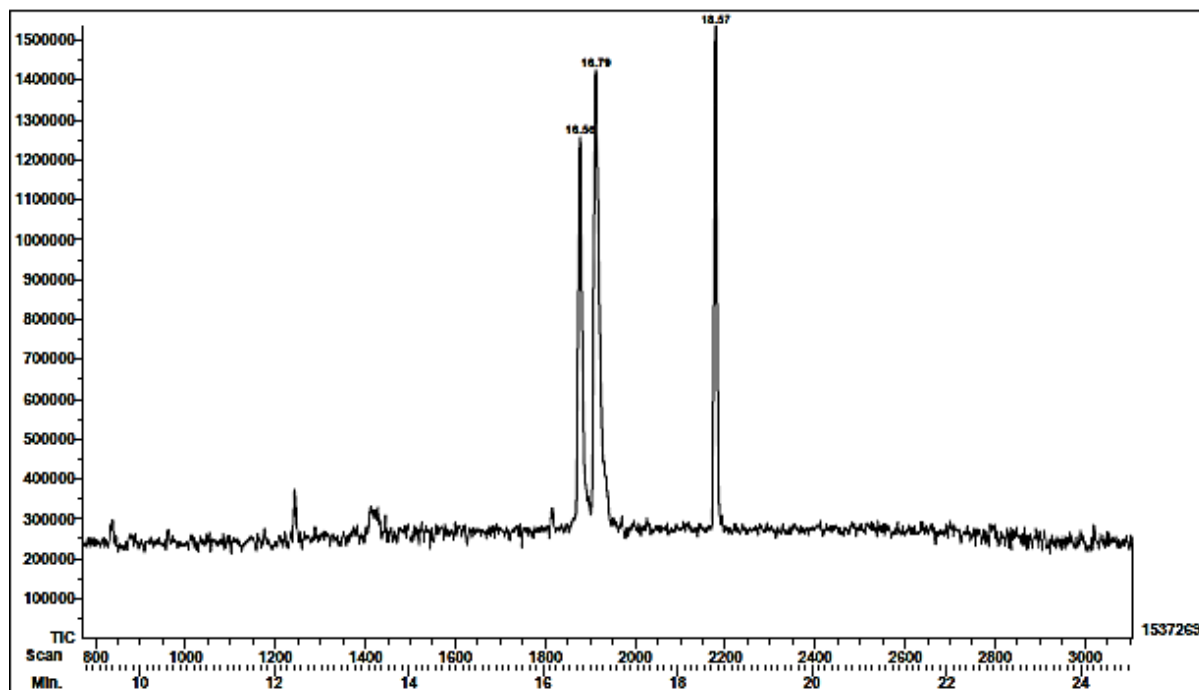


Anexo 2: Espectro de masas de la banda C (ión molecular: 406, pico base: 149).

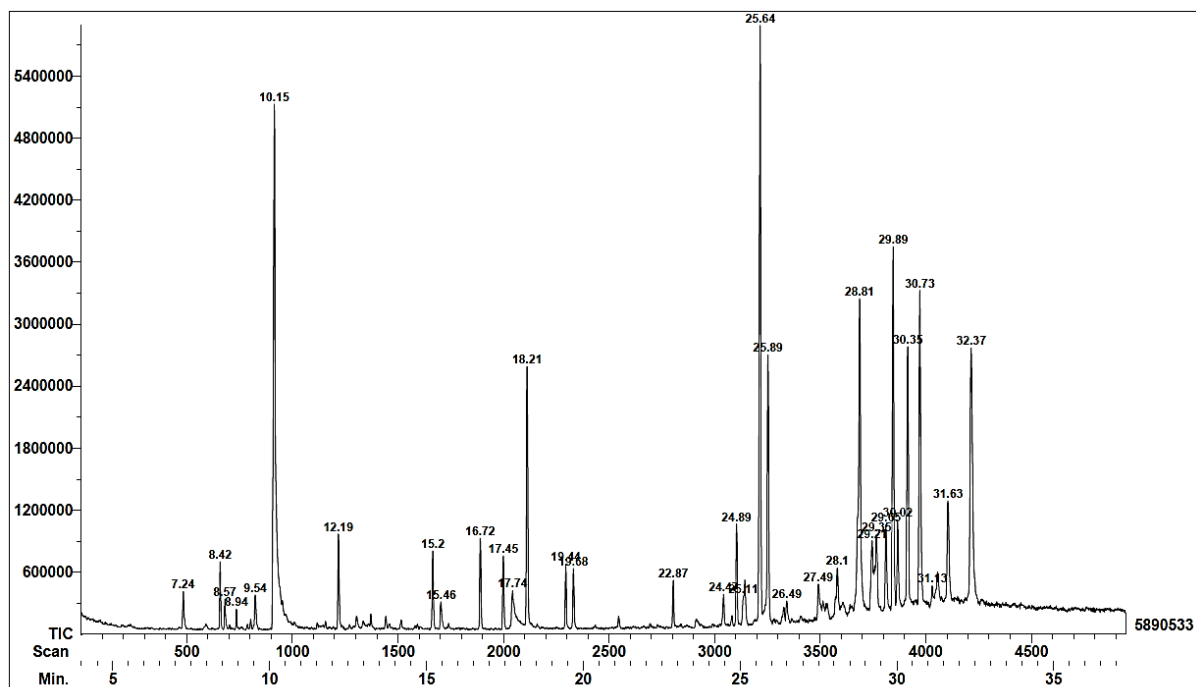


Anexo 3: Espectro de masas del di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), reportado por Jaworek y Czaplicka, 2013.

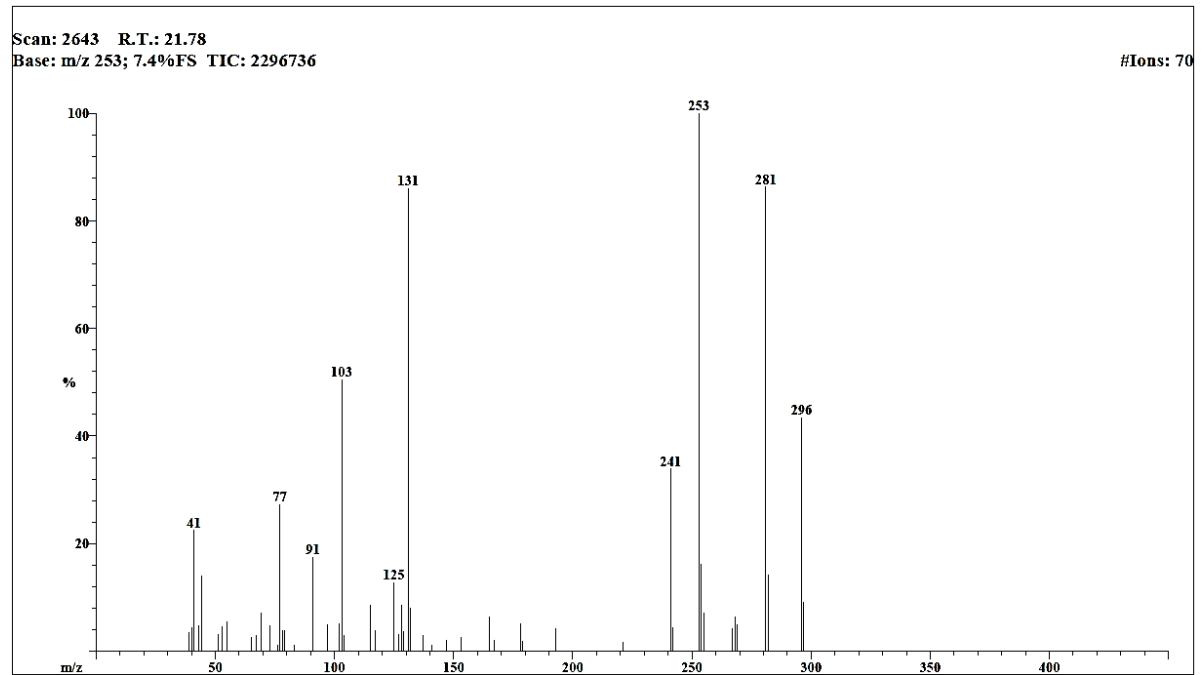
Cromatogramas y espectros de masas



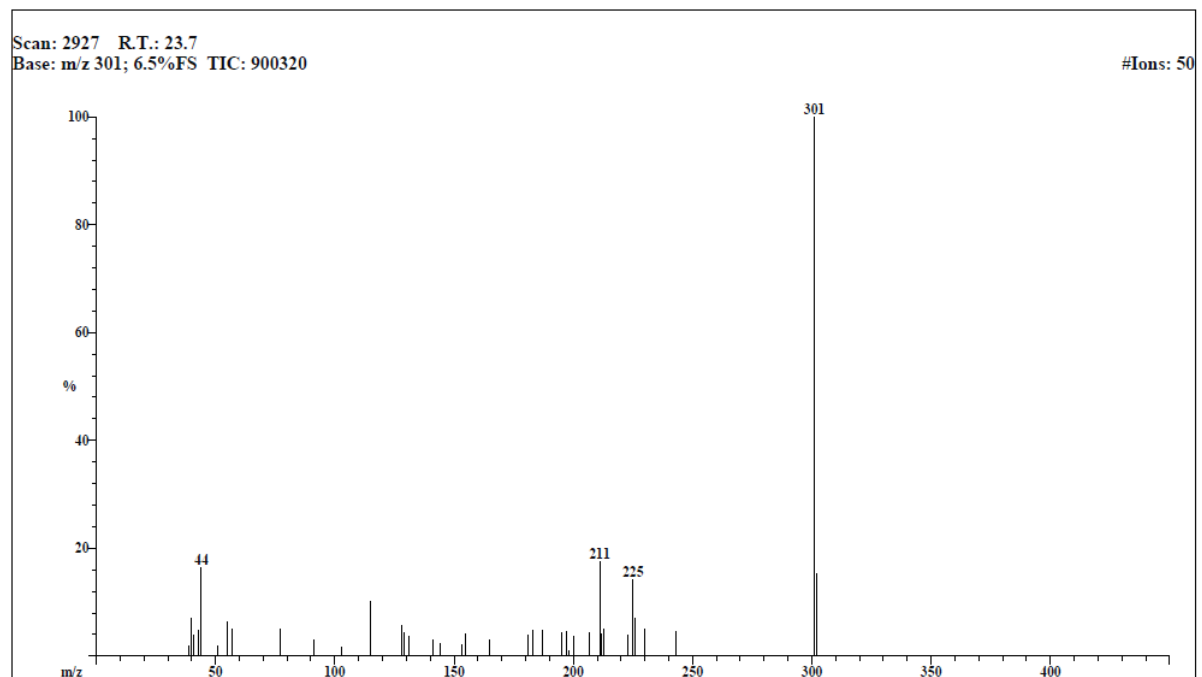
Anexo 4: Cromatograma de la banda B, con un pico mayoritario en un TR de 18.57. El alcaloide mayoritario tiene un TR de 16.79.



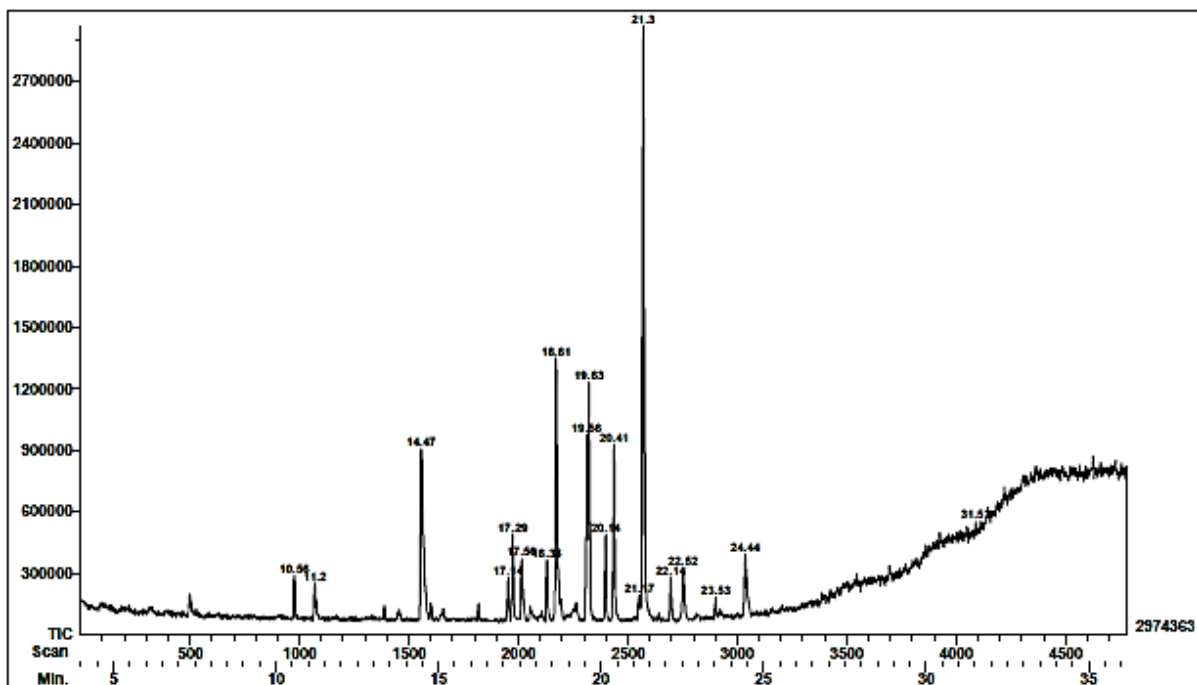
Anexo 5: Cromatograma de la banda D, con un pico mayoritario en un TR de 25.64.



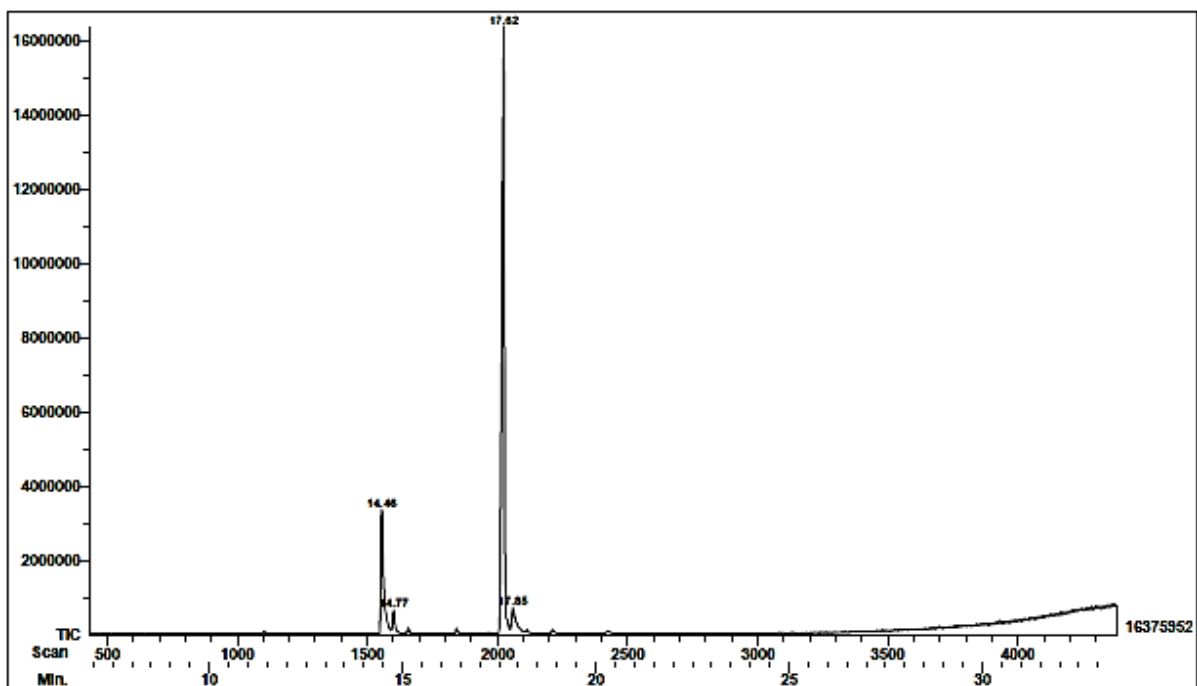
Anexo 6: Espectro de masas de un compuesto mayoritario de la mezcla, con m/z 253 (296).



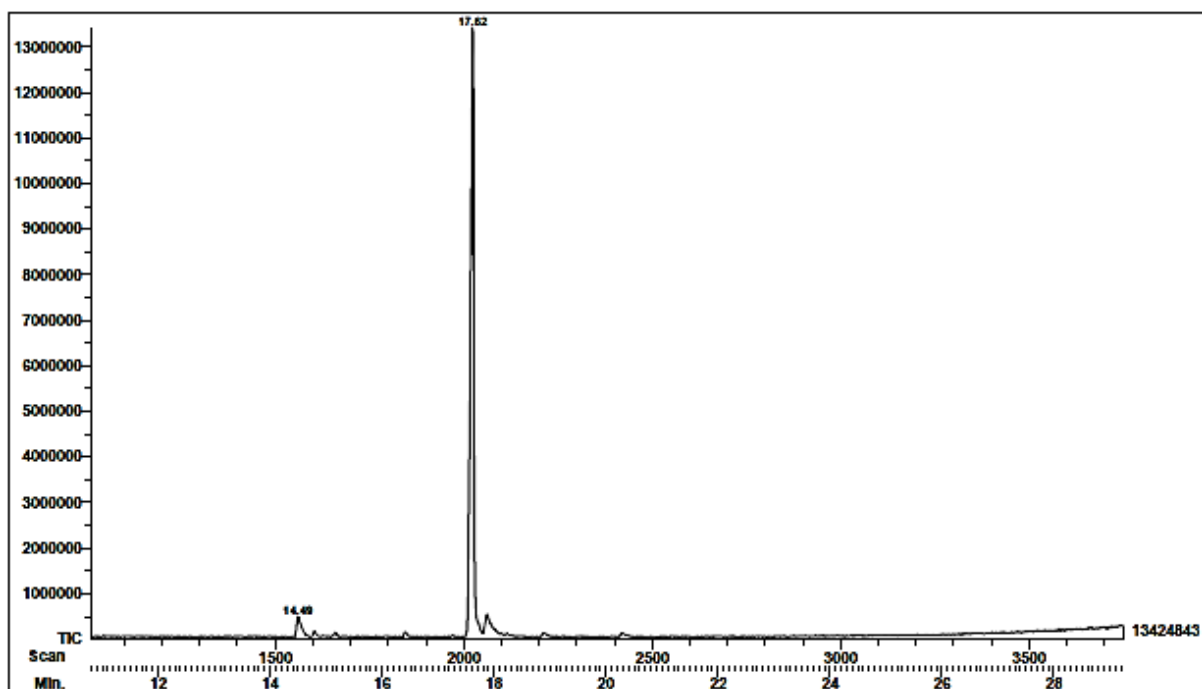
Anexo 7: Espectro de masas de un compuesto presente en la mezcla, con m/z 301 (301).



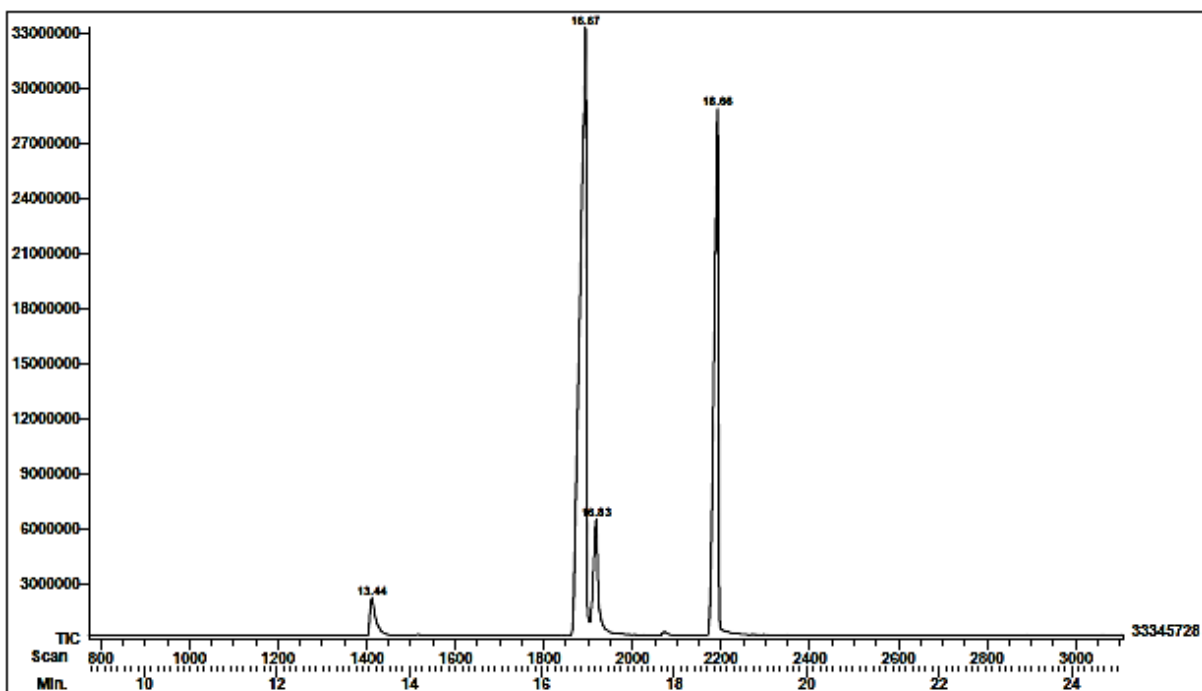
Anexo 8: Cromatograma del grupo 1 (obtenido por CC), con un pico mayoritario en un TR de 21.3.



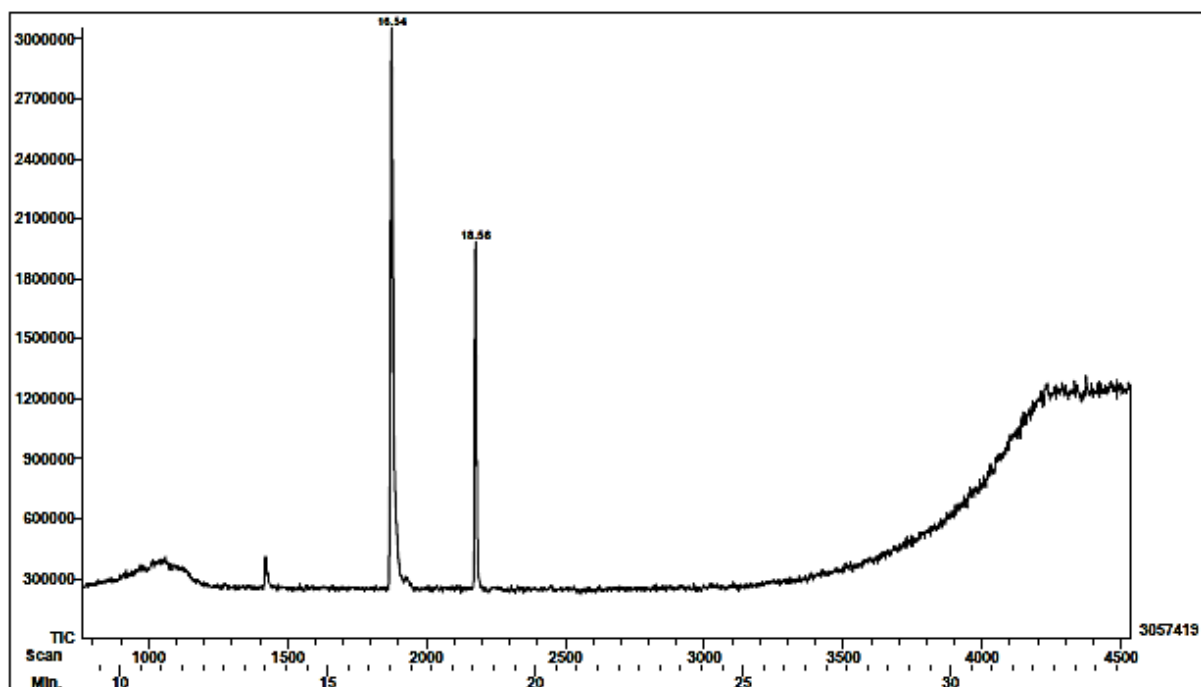
Anexo 9: Cromatograma del grupo 2 (obtenido por CC), con un pico mayoritario en un TR de 17.62.



Anexo 10: Cromatograma del grupo 3 (obtenido por CC), con un pico mayoritario en un TR de 17.62.

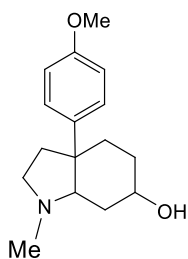


Anexo 11: Cromatograma del grupo 4 (obtenido por CC), con un pico mayoritario en un TR de 16.67.

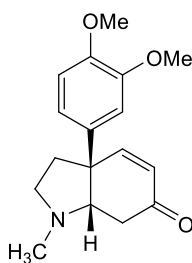


Anexo 12: Cromatograma del grupo 5 (obtenido por CC), con un pico mayoritario en un TR de 16.54.

Estructuras del 3'-demetoximesembranol y la mesembranona



3'-demetoximesembranol



Mesembranona

Anexo 13: Comparación estructural del 3'-demetoximesembranol y la mesembranona. Difieren en el metoxilo del carbono 5' en la mesembranona, una cetona en vez de un alcohol en el carbón 6 y un doble enlace entre en carbón 4 y 5.