



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio sobre la neurofarmacología y toxicidad aguda de
Zephyranthes fosteri Traub. (Amaryllidaceae), "Huetzcanixochitl"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

REBECA GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ
CONAHCyT-INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

COMITÉ TUTORAL:

**DR. RICARDO REYES CHILPA (Co-director)
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE GERIATRÍA**

Ciudad Universitaria, CD. MX. , noviembre de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio sobre la neurofarmacología y toxicidad aguda de
Zephyranthes fosteri Traub. (Amaryllidaceae), "Huetzcanixochitl"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

REBECA GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ
CONAHCyT-INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

COMITÉ TUTORAL:

**DR. RICARDO REYES CHILPA (Co-director)
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE GERIATRÍA**

Ciudad Universitaria, CD. MX. , noviembre de 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

OFICIO: CGEP/CPCB/FC/0699/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de junio de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **GARCÍA HERNÁNDEZ REBECA** con número de cuenta **313514173** con la tesis titulada **"Estudio sobre la neurofarmacología y toxicidad aguda de *Zephyranthes fosteri* Traub. (Amaryllidaceae), "*Huetzcanixochitl*"**", realizada bajo la dirección del **DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA**
Vocal: **DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ**
Vocal: **DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS**
Vocal: **DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**
Secretario: **DR. RICARDO REYES CHILPA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de septiembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/AAC/GEMF/EARR/ipp



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme los medios para continuar con mi formación científica.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) por medio del Proyecto IG-200321 “Filogenómica, química, farmacología y propagación del laurel mexicano (*Litsea spp. Lauraceae*): un estudio interdisciplinario para su aprovechamiento sustentable” quien aportó el financiamiento para la realización de este trabajo y la beca proporcionada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por otorgarme la beca 803692 a través del programa de Becas Nacionales para realizar mis estudios de maestría.

A los miembros del comité tutorial:

Tutor principal: Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez. Mi agradecimiento por aceptarme como su alumna, por el tiempo que dedicó siempre a este proyecto, por su asesoría, su apoyo y su paciencia. Gracias porque siempre me ayudo y resolvió mis dudas a lo largo de la maestría.

Co-director: Dr. Ricardo Reyes Chilpa. Mi agradecimiento por permitirme incorporarme a su laboratorio, por brindar los recursos necesarios para la realización de este proyecto y por aceptar ser parte de mi comité tutorial.

Dra. Isabel Arrieta Cruz. Mi agradecimiento por ser parte de mi comité tutorial, por su contribución al desarrollo de este proyecto y su continuo apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Se agradece a la Dra. M. Reyes Lezama, al M. en C. E. Tapia Mendoza y a la M. en C. M. León Santiago del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio cultural LANCIC, Instituto de Química.

A la M. en C. Lucia Yoscelina Centeno Betanzos por su apoyo técnico en el análisis químico de los extractos y revisión de la tesis.

Al Laboratorio de Histología de la Facultad de Superiores Iztacala, al Biol. José del Carmen Flores Benítez y la M. en C. María del Rosario González Valle, por su apoyo para realizar el estudio histológico.

Al Arqueólogo Ramón López Valenzuela, responsable administrativo de la zona arqueológica y museo de sitio Cuicuilco-INAH, por la autorización del trabajo de campo.

DEDICATORIA

A mi familia, por siempre apoyarme en mis estudios. A mi mamá y papá por su apoyo en todo momento y su compañía. A mis primos, en especial a Luis, Elisa y Úrsula por acompañarme y pasar su tiempo conmigo.

Gracias a todas las personas del laboratorio del Dr. Chilpa. Primero al Dr. Ricardo por aceptarme estar en su laboratorio.

A la Dra. Laura por aceptarme y siempre darme su tiempo y guía durante toda la maestría.

A mis compañeras de laboratorio Sofí, Dulce, Elia, Kari, Karla, Thalia, Yoselina hicieron más amena y divertida la estancia en el laboratorio y siempre estuvieron para ayudarme.

A mis amigos Nacho, Frida y Octi, que siempre estuvieron disponibles para ayudarnos y para divertirnos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO 1.....	69
ANEXO 2.....	72
ANEXO 3.....	81
ANEXO 4.....	90
ANEXO 5.....	95
ANEXO 6.....	96

RESUMEN

Zephyranthes fosteri pertenece a la familia Amaryllidaceae, la cual se caracteriza además de la belleza de sus flores, por biosintetizar alcaloides, de estos es conocida su actividad sobre el sistema nervioso central. Por otra parte, en el Códice de la Cruz-Badiano (1552), primer compendio de plantas medicinales en el continente americano, en el folio 38r, se ilustra a “*Huetzcanixochitl*”, la cual ha sido propuesta su identificación botánica como *Z. fosteri*. Debido a su localización en el códice y los alcaloides que posee, nuestro grupo de investigación ha interpretado que dicha planta pudo haber sido utilizada para el tratamiento de padecimientos relacionados con el sistema nervioso central, como la ansiedad o depresión. Por otra parte, los estudios químicos previamente realizados a *Z. fosteri* reportan la presencia de alcaloides con actividad inhibidora de la recaptación de serotonina.

Con base en los antecedentes anteriores, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto del extracto metanólico (EMZF) y el extracto alcaloideo (FO2) de *Zephyranthes fosteri* en el sistema nervioso central en ratones, mediante las pruebas conductuales, campo abierto (actividad motora espontánea), cilindro de exploración (actividad sedante), laberinto de cruz elevada (actividad ansiolítica) y nado forzado (actividad antidepresiva). También en ratones se evaluó la toxicidad aguda (p.o.) y mediante un análisis histológico se evaluaron los efectos del EMZF y la FO2 en hígado, riñón y bazo. Finalmente se realizó un análisis quimioinformático de los posibles blancos farmacológicos de la licorina y montanina usando SWISSTargetPrediction.

A partir de planta seca y molida se preparó EMFZ y posteriormente realizando un fraccionamiento ácido-base se obtuvo FO2. Mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se determinó que el alcaloide mayoritario de EMZF fue la licorina y de la FO2 fueron la licorina y la montanina.

Posteriormente se determinó en ratones que la dosis letal 50 (DL₅₀) del EMZF es superior a los 2000 mg/kg y para FO2 es de 300 mg/kg.

En cuanto a los resultados en las pruebas conductuales, se determinó que EMFZ tiene actividad antidepresiva a las dosis 300 mg/kg (p.o.), mientras que, FO2 presentó actividad a las dosis de 10 y 30 mg/kg (p.o.). Además, se determinó que la licorina es uno de los principios activos, que presentó efecto antidepresivo a 1 y 3 mg/kg. Tanto el EMZF como la FO2 no presentaron alteraciones en la actividad motora, ni presentaron efectos sedantes o ansiolíticos. Además, a las dosis administradas de EMZF y la FO2, no provocaron efectos tóxicos en hígado y bazo; solo la FO2 si presentó efectos leves en riñón a la dosis de 30 mg/Kg.

Finalmente, el análisis quimiinformático sobre los posibles blancos farmacológicos de la licorina y montanina indicó su interacción con la enzima acetilcolinesterasa, lo cual concuerda con lo ya reportado en la literatura.

ABSTRACT

Zephyranthes fosteri belongs to the Amaryllidace family, characterized by the biosynthesis of alkaloids, known by their activity on the central nervous system. On the other hand, the Cruz-Badiano codex (1552), the first compendium of medicinal plants in the American continent, illustrate in the folio 38r "*Huetzcanixochitl*", which have been identified as *Z. fosteri*. Due to its location on the codex, our group has interpreted that this plant could have been used to treat ailments related central nervous system like anxiety or depression. In addition, previous chemical studies of *Z. fosteri* report the presence of alkaloids with serotonin reuptake inhibition activity.

Based on the previous antecedents, the objective of this work was to characterize the effect of the methanolic extract (EMZF) and the alkaloid extract (FO2) of *Zephyranthes fosteri* on the central nervous system on mice, using the behavioral tests, open field (spontaneous motor activity), exploration cylinder (sedative activity), elevated plus maze (anxiolytic activity) and forced swim test (antidepressant activity). It was also evaluated the oral acute toxicity of EMZF and FO2 on mice, and the effects on liver, kidney and spleen were also evaluated by a histological analysis. Finally, a chemoinformatic analysis was performed to check possible pharmacological blanks of lycorine and montanine using SwissTargetPrediction.

Using dried and powdered plant the EMZF was prepared, later by an acid-base extraction the FO2 was obtained. By a gas chromatography coupled to mass spectrometry (GS-MS) analysis it was determined that lycorine was the main alkaloid in EMZF and in FO2 were lycorine and montanine.

After that the lethal dose 50 (LD₅₀) were determined on mice the EMZF were superior to 2000 mg/kg and the FO2 were 300 mg/kg (p.o.).

The behavioral tests shown that the EMZF have antidepressant like activity at 300 mg/ Kg (p.o.), the FO2 presented the same activity at 10 and 30 mg/Kg (p.o.). It was also demonstrated that lycorine was one of the possible active compounds, it

present antidepressant like activity at 1 and 3 mg/Kg (p.o.). The EMZF and FO2 didn't present alteration on the motor activity, sedative or anxiolytic effects. It is also worth mentioning that the doses of EMF and FO2 didn't cause toxic effect on the liver and spleen, while the FO2 at 30 mg/kg showed mild effects on the kidney.

Finally, the chemoinformatic analysis showed that the possible targets for lycorine and montanine were the acetyl cholinesterase enzyme, which is in agreement with previous reports.

INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae está constituida por 75 géneros y cerca de 1100 especies que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales (Wang *et al.*, 2018). Son plantas perenes o bienales, con bulbos y raíces contráctiles, sus hojas son simples, alternas, lineares. Sus flores son actinomorfas, epigíneas, con 6 tépalos, 6 estambres, fruto en forma de capsula, semillas planas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2014). Algunas especies tienen importancia por su uso ornamental y medicinal (Cuadro 1) (Wang *et al.*, 2018). En la medicina tradicional asiática y africana, algunas especies de esta familia se han utilizado para tratar la inflamación, problemas del sistema circulatorio y condiciones neurológicas (Ding *et al.*, 2017).

Esta familia presenta, casi de manera exclusiva, un tipo único de alcaloides con base de isoquinolina, llamados tipo amaryllidaceae. Estos alcaloides están clasificados en subtipos según su estructura química, siendo nueve los subtipos más comunes (figura 1), existen 42 subtipos más que incluyen protoalcaloides (Berkov *et al.*, 2020). Para estos alcaloides han sido reportadas algunas actividades sobre el sistema nervioso central como: ansiolítica, antidepresiva y antiepiléptica, además de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y butiril colinesterasa (BUhE), ambas relacionadas con la enfermedad del Alzheimer (Li *et al.*, 2021; Jin y Yao, 2019).

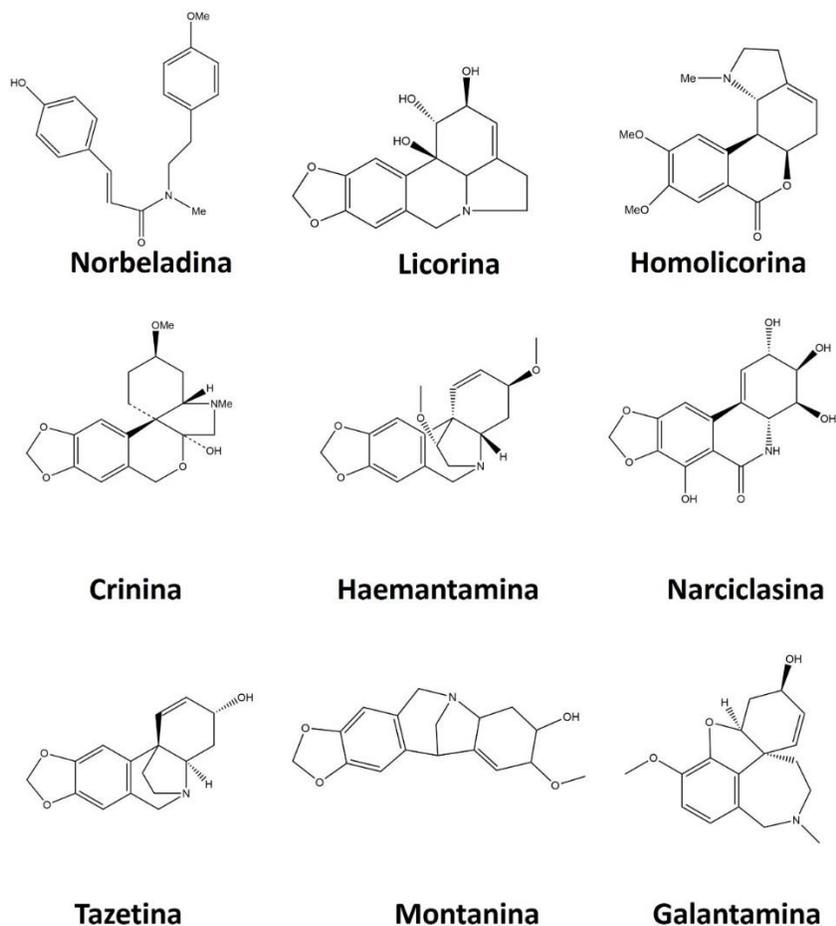


Figura 1. Subtipos de alcaloides tipo Amaryllidaceae. Estos nueve subtipos son los más comunes.

Cuadro 1. Especies de la familia Amaryllidaceae con actividad sobre el sistema nervioso central.

Especie	Actividad reportada	Cita
<i>Boophone distichia</i>	Extracto metanólico de bulbo	Actividad inhibitoria de la AChE (Nair y van Staden, 2022)
<i>Boophone haemanthoides</i>	Extracto metanólico de bulbo	Actividad inhibitoria de la AChE (Nair y van Staden, 2022)
<i>Nerine filifolia</i>	Extracto etanólico de bulbo	Actividad inhibitoria de la AChE (Nair y van Staden, 2022)

Especie	Actividad reportad		Cita
<i>Nerine humilis</i>	Extracto metanólico de bulbo	Actividad inhibitoria de la AChE	(Nair y van Staden, 2022)
<i>Boophone haemanthoides</i>	Extracto metanolico de bulbo y alcaloides seleccionados	Neuroprotección de contra MMP+ en células SH-SY5Y (Modelo de enfermedad de Parkinson)	(Ibrakaw <i>et al.</i> , 2020)
<i>Zephyranthes carinata</i>	Fracción estandarizada alcaloidea	Mejora de la memoria en el laberinto de agua de Morris, reducción de tauopatía y astrogliosis	(Cortes <i>et al.</i> , 2019)
<i>Boophone distichia</i>	Buphanadrina, buphanisina, distichamina	Inhibidor de la recaptación de serotonina	(Elgorashi, 2019)
<i>Crinum bubispermum</i>	Crinamina	Inhibidor de la recaptación de serotonina y actividad inhibitoria de la AChE	(Elgorashi, 2019)
<i>Crinum moorei</i>	Cherrilina, crinina, epibuphasina, epivitatina , 1-O-acetillicorina, powelina	Inhibidor de la recaptación de serotonina	(Elgorashi, 2019)
<i>Cyrtanthus falcatus</i>	Maritidina y O-metilmaritidina	Inhibidor de la recaptación de serotonina	(Elgorashi, 2019)
<i>Crinum glaucum</i>	Extracto acuoso bulbo	Actividad ansiolítica en el modelo de laberitno de cruz elevada y actividad anticonvulsiva en ratones albinos	(Ishola <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lycoris radiata</i>	Fracción de alcaloides	Neuroprotección en la línea SH-SY5Y frente a daño por H2O2 y COCL2	(Li <i>et al.</i> , 2013)
<i>Zephyranthes grandiflora</i>	Extracto de bulbo	Actividad inhibitoria de la AChE	(Cahlíková <i>et al.</i> , 2011)

***Zephyranthes fosteri* (Traub.)**

Zephyranthes fosteri es una planta nativa de México la cual es conocida de manera popular como *mayito*, *flor de mayo* o *quiebra platos*. En el cuadro 2 se presenta su resumen taxonómico. *Z. fosteri* se puede encontrar en zonas de pastizal, matorral o cerca de bosques de pino-encino (Heike., 2009). Su distribución se representa en la figura 2.

Es una hierba de 5 a 45 cm de altura con un bulbo ovoide de hasta 2.5 cm de diámetro. Posee tallos cilíndricos comprimidos de hasta 40 cm de longitud de superficie estriada. Sus hojas, agudas y ligeramente acanaladas, presentan láminas de hasta 35 cm de longitud y entre 0.5 a 5 mm de anchura. Las flores son de 2.2 a 6 cm de largo, sésiles o con pedúnculo, de tonos rosados principalmente en la parte media y apical de los segmentos. Los pétalos son oblanceolados u oblongo-elípticos de 1.5 a 3.5 cm de largo por 6 a 15 mm de ancho. Las semillas son de forma semicircular, finamente foveoladas con una superficie brillante, las cuales se almacenan en una capsula subglobosa de 4 a 12 mm de longitud, trilobadas (Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Cuadro 2. Resumen taxonómico de *Zephyranthes fosteri*, ejemplar completo y plantas en el sitio de colecta.

Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Liliopsida	
Orden	Liliales	
Género	<i>Zephyranthes</i>	
Especie	<i>Zephyranthes fosteri</i>	

En México, *Zephyranthes fosteri* se distribuye en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Colima, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Heike., 2009; eFloraMex.ib.UNAM, 2016).



Figura 2. Mapa de distribución de *Zephyranthes fosteri* en la República Mexicana (Modificado de eFloraMex.ib.UNAM., 2016).

Actualmente el género *Zephyranthes* cuenta con pocos registros de uso etnobotánico en México. En el cuadro 3 se mencionan algunos de ellos.

Cuadro 3. Antecedentes etnobotánicos del género *Zephyranthes* en México.

Especie	Parte usada	Uso	Cita
<i>Zephyranthes carinata</i>	Raíz	Salcochada en agua, se usa para tratar hechizos (una enfermedad de origen sociocultural, que es causada por una tercera persona con la intención de dañar al afectado).	(Del Carmen Rodríguez Castro, 2009)
<i>Zephyranthes fosteri</i>	Flor	Adornar la iglesia durante los rosarios.	(Cruz Martínez, 2015)
<i>Zephyranthes rosea</i>	Flor	Adorna altares religiosos.	(Ayala-Enríquez et al., 2019)

Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis y Zephyranthes fosteri

El *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, también conocido como *Códice de la Cruz-Badiano*, es el primer libro de plantas medicinales del continente americano. Fue escrito en 1552 por Martín de la Cruz y traducido del náhuatl al latín por Juan Badiano. El código está organizado en trece capítulos temáticos en los que se describen remedios medicinales que incluyen plantas (Reyes-Chilpa *et al.*, 2020).

Estos remedios eran utilizados para tratar dolencias en cada una de las partes del cuerpo. El código está organizado de tal manera que recorre desde la cabeza hasta los pies en los primeros ocho capítulos. De forma general, cada remedio medicinal se encuentra descrito en un folio donde se incluye el nombre de las plantas en náhuatl junto con su dibujo y la enfermedad a tratar (Reyes-Chilpa *et al.*, 2020).

Debido al valor histórico y etnobotánico del *Libellus*, diversos investigadores han buscado determinar, con la taxonomía y botánica actual, cuáles son las plantas que en él se representan al interpretar las ilustraciones y el nombre en náhuatl de cada folio. Ésta labor ha sido realizada, entre otros autores, por Bye y Linares (2013), quienes mencionan que el *Libellus* cuenta con 224 plantas de las cuales ellos han identificado a nivel de especie a 131 (cerca del 71% del total) (Reyes-Chilpa *et al.*, 2020).

En el octavo capítulo, en el folio 38r., se engloban a las “hierbas del estío bien olientes, empleadas contra la fatiga del que administra la república y desempeña un cargo público”. En este folio se encuentra la planta nombrada en náhuatl como “*Huetzcanixochtl*” que se puede traducir como “flor que ríe” o “que hace reír” la cual fue propuesta su identidad botánica como *Zephyranthes fosteri* (Bye y Linares., 2013).

Junto a “*Huetzcanixochitl*”, se mencionan otras diez plantas sin un uso específico en el código, sin embargo, algunas tienen reporte de su actual uso medicinal, en

específico sobre el sistema nervioso central como “*Totonquixochitl*” (*Penstemon roseus*) “flor caliente” que actualmente se usa para tratar el empacho y conciliar el sueño. “*Xiuhpatli*” (*Tigridia pavonia*) “medicina verde” que se emplea para el insomnio, afecciones bronquiales dolor de cabeza entre otras dolencias (Bye & Linares., 2013).

Se puede interpretar que *Z. fosteri* pudo haber sido utilizada, por sus posibles efectos sobre el sistema nervioso central, como ansiolítico o antidepresivo. Esto se puede deducir por medio de lo que sabemos acerca de la familia a la que pertenece, su composición química, el significado de su nombre en náhuatl y la localización del remedio del que es ingrediente dentro del *Libellus* (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021)

Estudios químicos y farmacológicos de *Zephyranthes fosteri*

En estudios previos de *Zephyranthes fosteri* se identificó, en el extracto metanólico, a compuestos mayoritarios como la licorina (I) y al 3'-demethoxi-6-epimesembranol (II) junto con 2-O-metipancracina (montanina) (III), 3-O-acetilvitatina (IV), 3-O-acetilpowelina (V), galantina (VI); mientras que en la fracción de alcaloides se han reportado principalmente la licorina (I) y el 3'-demethoxi-6-epimesembranol (II), junto con la norlicoramina (VII), 3-O-acetilpowelina (V), galantina (VI), powelina (VIII), vitatina (IX), 3-O-acetilvitatina (IV) y pancracina (XI) (ver figura 3) (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021). También se ha reportado la actividad citotóxica del extracto alcaloideo de *Z. fosteri* en las líneas tumorales HeLa y SKLU-1 (García-Cruz, 2017).

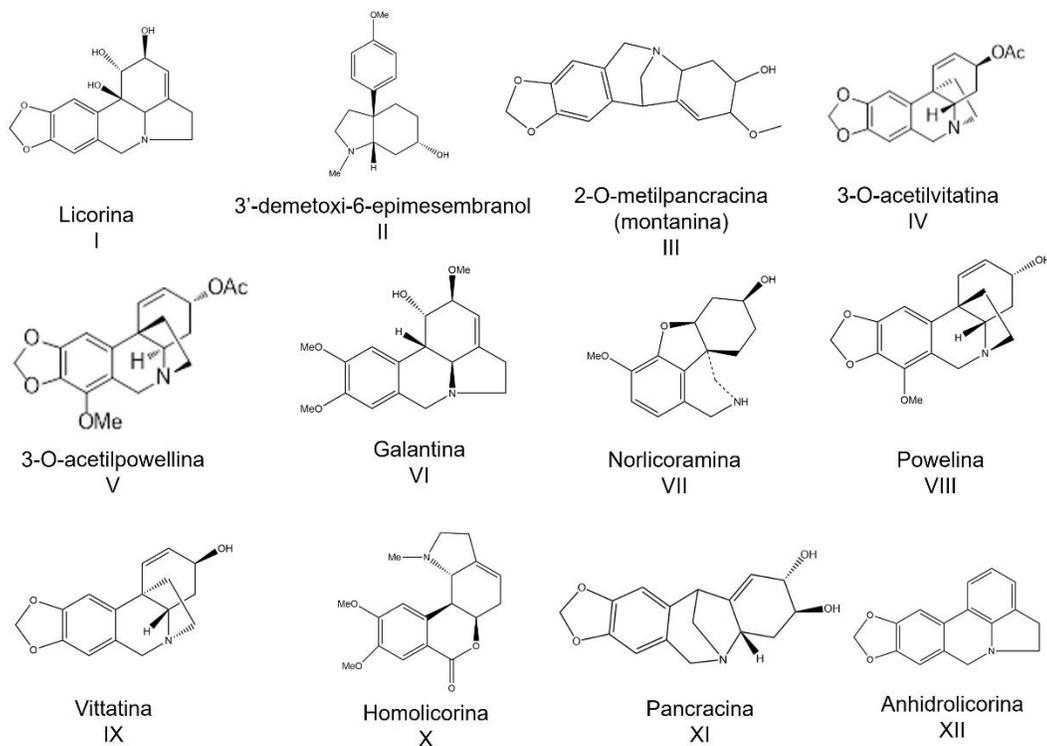


Figura 3. Estructuras base de los alcaloides presentes en *Zephyranthes fosteri* (Lucia Y. Centeno-Betanzos et al., 2021).

Los trastornos del estado del ánimo

El estado del ánimo es el tono emocional generalizado y sostenido que influye en el comportamiento de una persona y forma parte de su percepción del mundo. El estado del ánimo se puede describir, en buena parte, por las vivencias de la persona y por observaciones clínicas (Sadock *et al.*, 2015).

Los trastornos del estado del ánimo afectan el tono emocional de la persona que, al fluctuar, altera los niveles de actividad, las funciones cognitivas, el habla, el sueño, apetito y actividad sexual. Esto provoca un deterioro en el funcionamiento interpersonal, social y laboral (Sadock *et al.*, 2015).

Esta categoría de trastornos incluye a los trastornos depresivo, bipolar, la hipomanía, ciclotimia y distimia. Pese a que la ansiedad no se encuentra dentro de

los trastornos del estado del ánimo, la mayoría de los casos de depresión presentan ansiedad patológica como una comorbilidad (Sadock *et al.*, 2015).

Aproximadamente 970 millones de personas viven con alguna enfermedad mental, donde los más comunes son los trastornos depresivos y de ansiedad. Debido a la pandemia de COVID-19, en 2020 se incrementó la incidencia de depresión y ansiedad en un 26 y 28% respectivamente (WHO, 2022).

Trastornos depresivos

En el ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision) definen a los episodios depresivos (en cuanto a “leve”, “moderado” o “severo”) en pacientes que sufren alteraciones en el estado de ánimo, pérdida de energía, reducción de la actividad, incapacidad para disfrutar (anhedonia), baja autoestima y confianza; las personas también presentan ideas de culpa o poco valor hacia sí mismas. Este trastorno del estado del ánimo incluye también síntomas somáticos como el retardo en el sistema psicomotor, agitación, pérdida del apetito, pérdida de peso y de la libido (WHO, 2017).

En el año 2019 se estimó que 280 millones de personas padecían de depresión, incluyendo 23 millones de niños y adolescentes. En el peor de los casos, la persona que sufre de depresión puede llegar al suicidio. Anualmente, 700 000 personas mueren por suicidio, siendo la cuarta causa de muerte en personas entre los 15 y 29 años (WHO, 2021).

Existen varias hipótesis que buscan explicar la depresión; una de ellas es la participación de las monoaminas. En esta hipótesis se plantea que la deficiencia de monoaminas, como la norepinefrina, dopamina y serotonina las cuales son neurotransmisores, participan en el desarrollo de la depresión. La serotonina participa en el control del apetito, el hambre, la violencia, la impulsividad, la ansiedad, el miedo y la percepción. En varios estudios se ha reportado que pacientes con trastorno depresivo mayor presentan cambios y densidad baja de receptores de serotonina (5HT_{1A}). Algunos fármacos aumentan la disponibilidad de

monoaminas, lo cual promueve la actividad antidepresiva. Estos fármacos son los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o norepinefrina y los inhibidores de la monoamina oxidasa (Martins y Brijesh, 2018).

Trastornos de ansiedad

El miedo y la ansiedad son emociones y respuestas normales que tuvieron gran valor adaptativo durante el proceso de evolución humana. De estas emociones, el miedo presupone una respuesta a amenazas específicas y el comportamiento ansioso implica, por lo general, una respuesta a elementos indefinidos (Campos *et al.*, 2013).

La ansiedad se puede definir como la sensación de angustia difusa, desagradable y vaga la cual puede estar acompañada de síntomas físicos como el dolor de cabeza, taquicardia, opresión torácica, malestar gástrico e inquietud. Sin embargo, los síntomas pueden variar de persona a persona. La ansiedad es, en realidad, una respuesta ante una posible amenaza; no obstante, también existe la ansiedad patológica la cual se describe en los trastornos de ansiedad que son crónicos (Sadock *et al.*, 2015). Los trastornos de ansiedad incluyen al desorden de ansiedad generalizado, desorden de pánico, fobias, ansiedad social y el trastorno de estrés postraumático (Kenda *et al.*, 2022). Se estima que, en México, cerca del 3.6% de la población presenta algún trastorno de ansiedad (PAHO, 2015).

Tratamientos complementarios y/o alternativos para depresión y ansiedad

El tratamiento convencional para los desórdenes depresivos incluye cambios en el estilo de vida (por ejemplo, el ejercicio físico) además de tratamientos somáticos como la terapia electroconvulsiva, psicoterapia y farmacoterapia con antidepresivos y/o ansiolíticos (Asgharian *et al.*, 2022). Algunos de los fármacos utilizados para tratar la depresión son los inhibidores de la recaptación de serotonina, los antidepresivos tricíclicos (OMS, 2021), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina, antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la monoamina oxidasa (Asgharian *et al.*, 2022).

Sin embargo, las interrupciones en el tratamiento por parte de los pacientes son frecuentes, en buena medida debido a las reacciones adversas que les generan. Estas reacciones adversas pueden incluir dolor de cabeza, disfunción sexual, adicción, convulsiones y propensión al suicidio (Kenda *et al.*, 2022) y las cuales afectan hasta un 30% de los pacientes. La poca accesibilidad para obtener los posibles tratamientos y el porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento farmacológico (cerca del 40%) son obstáculos que impiden la buena progresión del tratamiento (Moragrega y Ríos, 2021). Por lo que, en varios casos, se buscan alternativas y complementos a la farmacoterapia tradicional como el uso de remedios naturales, los cuales llegan a ser percibidos como seguros (Yeung *et al.*, 2018).

ANTECEDENTES

El uso de plantas para tratar trastornos mentales

Actualmente, el uso de plantas medicinales es una parte de las terapias complementarias para tratar trastornos mentales que se realiza al mismo tiempo que los tratamientos con fármacos tradicionales. Algunas plantas presentan compuestos los cuales son efectivos para modificar el estado del ánimo y otras enfermedades neuropsiquiátricas.

Los compuestos como los alcaloides, polifenoles, glicósidos, saponinas y terpenos de plantas presentan algunas propiedades antidepresivas al regular los niveles de monoaminas, al inhibir de la actividad de la MAO, al aumentar la expresión de BDNF, en la neurogénesis, al favorecer la plasticidad sináptica y al reducir el estrés oxidativo y la neuroinflamación (Behl *et al.*, 2023).

Algunas plantas que se han probado para tratar depresión y/o ansiedad son las siguientes.

El extracto de hojas de *Ginkgo biloba* como suplemento alimenticio se usa para mejorar la memoria y promover el flujo sanguíneo. En estudios clínicos, el extracto

estandarizado de *G. biloba* mostró eficacia superior a la del placebo para aliviar síntomas de ansiedad y depresión (Yeung *et al.*, 2018).

La lavanda (*Lavandula angustifolia*) es una planta europea la cual es utilizada tradicionalmente para aliviar síntomas de estrés leve y agotamiento. Se ha probado en algunos estudios clínicos donde se observó mejoría en los síntomas de desorden de ansiedad generalizado, ansiedad y depresión al usarse como aceite esencial de lavanda el cual ya se ha aprobado su uso terapéutico (Kenda *et al.*, 2022). También se ha reportado que el té de lavanda aumenta la eficacia del citalopram; además, su extracto mejora los efectos de la imipramina (Yeung *et al.*, 2018).

La planta kava kava, *Piper methyscticum*, nativa de las Islas Vanuatu y las Islas Santa Cruz se ha probado en distintos estudios clínicos donde se ensayó su efectividad para tratar desordenes de ansiedad. Los distintos extractos de kava kava y algunos de sus compuestos aislados han demostrado que interactúan con receptores GABA_A y actúan como inhibidores de recaptura de monoaminas al inhibir la MOA-oxidasa y al modular los receptores de serotonina 5-HT_{1A} (Kenda *et al.*, 2022).

Antecedentes de plantas de la familia Amaryllidaceae con actividad antidepresiva y/ ansiolítica

El género *Narcissus* (Amaryllidaceae) es fuente del alcaloide galantamina el cual es usado para tratar la enfermedad de Alzheimer. De este mismo género se han aislado alcaloides del tipo mesembrano los cuales tienen propiedades antidepresivas al inducir la síntesis del mRNA del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual se encuentra en niveles bajos en personas con depresión (Asgharian *et al.*, 2022) y pueden actuar como inhibidores de la recaptación de serotonina (Stafford *et al.*, 2008).

Algunas plantas de Amaryllidaceae con actividad antidepresiva o ansiolítica reportada han sido:

Cuadro 4. Antecedentes de actividad antidepresiva o ansiolítica de plantas de la familia Amaryllidaceae.

Especie		Actividad reportada	Autor y año
<i>Hippeastrum vittatum</i>	Montanina	Actividad antidepresiva en el modelo de nado forzado; actividad ansiolítica en el modelo de laberinto de cruz elevado; y efecto sedante en ratones Swiss albinos de ambos sexos.	Flávia <i>et al.</i> , 2006
<i>Crinum jagus</i>	Extracto de acetato de etilo de hojas	Reduce el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado y suspensión de cola en ratón Swiss albino	Taiwe <i>et al.</i> , 2016
<i>Boophone distichia</i>	Extracto etanólico de bulbo	Actividad ansiolítica en test de Suok, campo abierto y laberinto de cruz elevada en ratones BALB/c.	Pote <i>et al.</i> , 2018
<i>Allium cepa</i>	Liofilizado en polvo de bulbo	Actividad ansiolítica y antidepresiva en laberinto de cruz elevada y nado forzado, mejora de la memoria en laberinto de agua de Morris en rata Wistar macho.	Samad y Saleem, 2018

Justificación

Zephyranthes fosteri pertenece a la familia Amaryllidaceae la cual tiene potencial actividad sobre el sistema nervioso central debido a la presencia de alcaloides. Por otra parte, el *Libellus Medicinalibus Indorum Herbis* incluye la planta *Huetzcanixochitl* que, por su nombre y ubicación en el códice, se interpreta que pudo haber sido utilizada en la medicina tradicional por su efecto sobre el sistema nervioso central. Esta planta ha sido identificada como *Z. fosteri* y los estudios químicos previos de esta especie reportan la presencia de compuestos con actividad inhibidora de la recaptación de serotonina. Por ello es porque *Z. fosteri* podría tener efecto antidepresivo. Con base en lo anterior, en este trabajo se propuso evaluar la actividad sobre el sistema nervioso central de *Z. fosteri*, al determinar su perfil neurofarmacológico mediante pruebas conductuales en ratón.

Hipótesis

Los extractos metanólico y alcaloideo de *Zephyranthes fosteri* tienen actividad antidepresiva y/o ansiolítica.

Objetivo general

- Evaluar el efecto de *Zephyranthes fosteri* sobre el sistema nervioso central de ratones.

Objetivos particulares

- Determinar la DL₅₀ del extracto metanólico y alcaloideo de *Zephyranthes fosteri* en ratones.
- Determinar la actividad sobre el sistema nervioso central de los extractos metanólico y alcaloideo de *Zephyranthes fosteri* en ratones mediante pruebas conductuales.
- Explorar los posibles efectos tóxicos de los extractos mediante un análisis histopatológico en distintos órganos de los ratones que pasaron por las pruebas conductuales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Colecta de material vegetal

El material vegetal que se utilizó fue colectado de la zona arqueológica de Cuicuilco, en la CDMX (Anexo 1).

Obtención del extracto metanólico de *Zephyranthes fosteri* (EMZF)

Para obtener el extracto metanólico de *Zephyranthes fosteri* se utilizaron las plantas completas. Primero, se lavaron para retirar completamente la tierra. Posteriormente, se cortaron en pequeños trozos que se secaron durante tres días en una estufa a 50°C. Finalmente, se trituraron en un molino mecánico hasta obtener fragmentos pequeños. El material vegetal triturado se maceró cinco veces en 1.7 L de metanol. El extracto obtenido (EMZF) se concentró a presión reducida por medio de rotavapor para eliminar el disolvente y se dejó secar completamente en una campana al vacío.

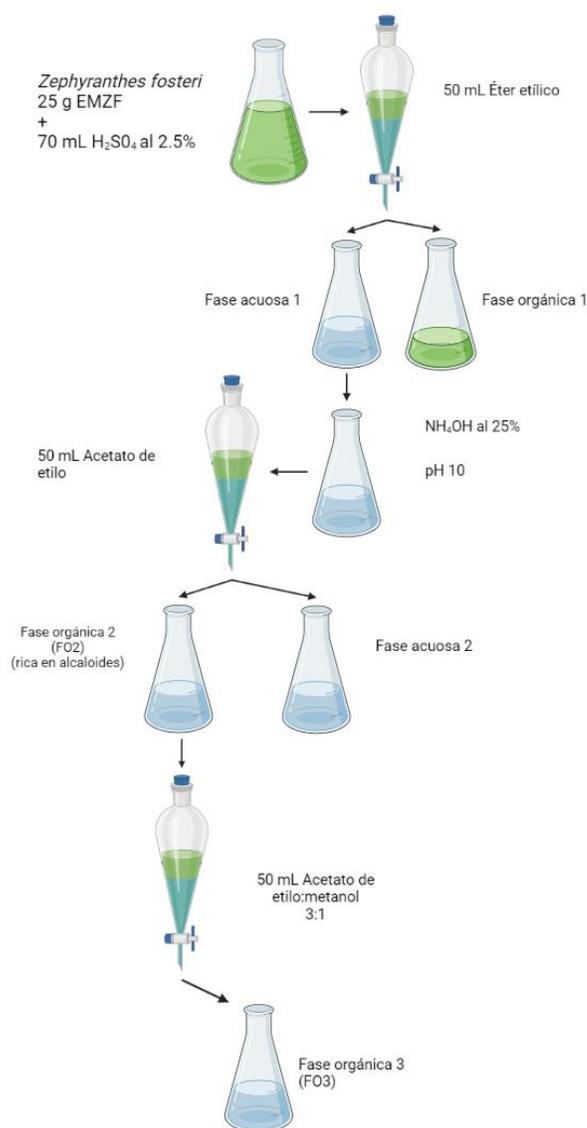
Obtención de extracto alcaloideo

A una parte del EMZF se le realizó una extracción ácido-base para obtener un extracto rico en alcaloides siguiendo el método reportado por Centeno-Betanzos (2014) con algunas modificaciones (Figura 4).

Para esto, se utilizaron 25 g del extracto y se disolvieron en 70 mL de ácido sulfúrico al 2.5%. El extracto disuelto se colocó en un embudo de separación junto con 50 mL de éter etílico. Se agitó y se separaron la fase acuosa 1 (FA1) y la fase orgánica 1 (FO1). A FA1 se le agregó nuevamente éter etílico, se agitó y se separó de FO1; este proceso se repitió hasta que la FO1 se observó transparente. Todas las extracciones con éter se reunieron en la FA1. A la FA1 se le agregó hidróxido de amonio al 2.5% hasta que alcanzó un pH de 10 y se le agregó acetato de etilo, se mezcló y se separó la fase acuosa 2 (FA2) y la fase orgánica 2 (FO2). Esta última, FO2, es donde se encuentra la mayor parte de los alcaloides y es la que se nombró como extracto alcaloideo. El proceso se repitió de forma

exhaustiva. Posteriormente, a la fase acuosa 3 se le agregaron 50 mL de una mezcla acetato de etilo: metanol (3:1), se agitó y se obtuvo la fase orgánica 3 (FO3). Este proceso se repitió de forma exhaustiva.

Todas las fases obtenidas se concentraron y se realizó un análisis general de su composición por cromatografía de capa fina revelada con reactivo de Dragendorff para comprobar la presencia de alcaloides.



Created in BioRender.com bio

Figura 4. Método para la extracción ácido base para obtener el extracto alcaloide (FO2). El cuál es la fase orgánica 2, rica en alcaloides. Imagen elaborada con BioRender.

Análisis químico

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis del EMZF, FO2, FO3 se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural en el Instituto de Química (LANCIC-IQ) por la M. en C. Mayra León Santiago. Este análisis fue realizado en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado al espectrómetro de masas 5977 A-MSD el cual operaba en el modo de impacto electrónico a 70 eV. Se usó la columna A DB-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 M) con 100°C como temperatura inicial por 1 min, una rampa de calentamiento de 15°C/ min hasta llegar a los 180°C por 1 min y se subió hasta llegar a los 300°C con una rampa de calentamiento de 5°C/min. La temperatura de inyección fue de 280°C. La fase móvil fue He con un flujo de 1 mL/min. La proporción de cada compuesto en la fracción de alcaloides se expresaron en porcentaje del total de alcaloides. Esto no expresa una cuantificación real, pero se puede usar para comparar cantidades relativas de cada componente (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021).

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software AMDIS 2.64 (NIST) para identificar los compuestos presentes. Los alcaloides se identificaron al comparar los espectros de CG-EM y el índice de Kovats. Se compararon los índices de retención (IR) y los tiempos de retención (RT) con una biblioteca de espectros de masas por impacto electrónico de alcaloides aislados de especies de la familia Amaryllidaceae. La biblioteca de alcaloides fue desarrollada por grupo de investigación del Dr. Jaime Bastida. Esta biblioteca contiene los alcaloides de amarilidáceas que han sido identificados por distintas técnicas espectroscópicas. La M. en C Lucia Yoscelina Centeno-Betanzos proporciono la biblioteca y el apoyo para el análisis con este software.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones CD-1 machos de 25 a 30 g de peso procedentes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala los cuales permanecieron en el cuarto de alojamiento de animales en el Instituto de Química a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con agua y alimento a libre acceso. El uso de animales de experimentación se llevó a cabo conforme la NOM-062-ZOO- 1999 . El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Química (CICUAL-IQ-001-19).

Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀)

Se realizó el experimento de toxicidad aguda por vía oral siguiendo los lineamientos de la OCDE para obtener los valores de DL₅₀ y poder aproximar una dosis efectiva del EMZF y FO2. Se seleccionó este ensayo ya que permite obtener rangos de letalidad utilizando el menor número de animales posibles (OECD, 2001). Se utilizaron grupos de 3 ratones cada uno. Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

- Grupo control al que se le administró el vehículo el cual consistió en solución salina (S.S.) 0.9% con Tween 80 al 1%.
- Grupo EMZF 2000 al cual se le administró la dosis de 2000 mg/kg del extracto.
- Grupo FO2 al que se le administró una dosis de 300 mg/kg.
- Grupo FO2 al que se le administró una dosis con una dosis de 1000 mg/kg.

Los tratamientos fueron administrados a los ratones, previo ayuno de cuatro horas, en un volumen de 0.1 mL/10 g de peso por medio de cánulas de calibre 20G con una longitud de 1.5" y esfera terminal de 2.5 mm.

Los animales estuvieron bajo observación por 30 minutos, de manera continua, después de la administración de los extractos. Luego, de forma periódica, se

revisó a los animales durante las siguientes horas. Se observaron y pesaron diariamente durante 14 días después del experimento (OCDE, 2001). Al terminar los 14 días los animales se sometieron a eutanasia.

Estudio histopatológico

Para evaluar las posibles alteraciones ocasionadas por la administración del EMZF y FO2, se realizó el análisis histopatológico de los tejidos obtenidos de los ratones al terminar el experimento de toxicidad aguda y las pruebas conductuales. El procesamiento y el análisis histológico se realizó en el laboratorio de histología de la FES Iztacala, con la colaboración del Biol. José del Carmen Flores Benítez y la M. en C. María del Rosario González Valle.

El análisis histológico consistió en la disección del hígado, el riñón y el bazo, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4%. Posteriormente, los tejidos se lavaron, deshidrataron y aclararon (Ross *et al.*, 2015). Se infiltró en parafina, se incluyó en bloque y se cortó con micrótomo a 5 μ m de grosor. Los cortes se extendieron y colocaron en un portaobjetos. Luego se tiñeron con hematoxilina-eosina. Esta tinción permite distinguir los elementos celulares; la hematoxilina tiñe de color azul-morado los componentes nucleares mientras que la eosina tiñe de color rosa-rojo el citoplasma y las fibras de tejido conectivo (Suvarna y Layton, 2013).

Se realizó, entonces, un análisis general del estado del tejido de los cortes con la tinción de hematoxilina-eosina. Los daños se clasificaron según su gravedad en “leve”, “moderado” o “severo”; además de evaluar su extensión al dividirlos en “focal” con menos del 25% de la extensión del corte, “multifocal” del 25-50% del corte y “difuso” con más del 50% del corte (Espinosa-González, 2016).

Pruebas conductuales

Para evaluar los posibles efectos de *Zephyranthes fosteri* en el sistema nervioso central de los ratones CD-1 machos se realizaron cuatro pruebas conductuales: cilindro de exploración, campo abierto, laberinto de cruz elevada y nado forzado. El campo abierto permite evaluar la actividad motora espontánea además de que funcionó como control de nado forzado; el cilindro de exploración permite observar el efecto sedante; la prueba de laberinto de cruz elevada permite determinar actividad ansiolítica y, por último, el nado forzado se emplea para evaluar actividad antidepresiva.

Para realizar las pruebas conductuales se utilizaron grupos de 10 ratones cada uno y los distintos tratamientos se administraron vía esofágica (p.o.). Se evaluaron las siguientes dosis: 100 y 300 mg/kg de EMZF, 10 y 30 mg/kg de FO2. Al grupo control se administró el vehículo (S.S. 0.9% con Tween 80 al 1%); como control positivo para la actividad antidepresiva se usó la imipramina a 30 mg/kg y como control para la actividad ansiolítica se utilizó el diazepam a 1 mg/kg (González-Diego, 2019).

A cada grupo se les administraron sus correspondientes tratamientos 24, 18, 8 horas y 30 minutos antes de que se realizaran las pruebas conductuales (Martínez-Hernández *et al.*, 2021).

Campo abierto

Este modelo se realiza en una caja de acrílico de 21 x 28 cm la cual está dividida en 12 cuadrantes iguales. Cada animal se coloca al centro de la caja, siempre en la misma dirección. Posteriormente, se contabiliza el número de cuadros recorridos con las cuatro extremidades durante un periodo de 2 minutos. Se graba a cada individuo con una cámara de vídeo para analizar la grabación después del experimento. Dependiendo del número de cuadrantes recorridos respecto al control se interpretan los posibles cambios en la actividad motora espontánea (Archer, 1973; González-Diego., 2019).

Cilindro de exploración

Para realizar la prueba se utiliza un cilindro de vidrio transparente de 30 cm de altura y 11 cm de diámetro. Se coloca al ratón en el centro del cilindro sobre un papel blanco y se contabilizan el número de levantamientos que realiza sobre sus extremidades posteriores durante un periodo de 5 minutos. Entre cada ratón se limpia el interior del cilindro con una solución etanólica al 30% y se cambia el papel blanco del fondo del cilindro. Un menor número de levantamientos en un ambiente no familiar a comparación del grupo control indican un efecto sedante (Ugalde *et al.*, 2010; González-Diego, 2019).

Laberinto en cruz elevada

El laberinto de cruz elevada consiste en dos brazos abiertos de 30 cm largo por 5 cm de ancho, y dos brazos cerrados de las mismas dimensiones el cual está elevado a 50 cm del suelo. Cada ratón se coloca al centro del laberinto, siempre en la misma dirección. El ratón permanece en el aparato durante 5 minutos. Cada individuo es grabado con una cámara de vídeo para su análisis posterior. Un aumento en el tiempo transcurrido en los brazos abiertos del grupo de prueba a comparación del grupo control negativo se interpreta como un posible efecto ansiolítico (Pellow *et al.*, 1985; González-Diego., 2019).

Nado forzado

El aparato consiste en un cilindro de vidrio de 27 cm de alto x 10 cm de diámetro el cual tiene agua a 25°C hasta los 15 cm de altura. Cada ratón se coloca en el agua por seis minutos después de la tercera administración de la sustancia de prueba y se graba su actividad con una videocámara. Posteriormente, se analizan los videos y se registra el tiempo de inmovilidad del ratón a partir de dos minutos de que se le ingresó al agua. Entre cada individuo se debe cambiar el agua. La reducción del tiempo de inmovilidad del grupo de prueba con respecto al control indica un posible efecto antidepresivo (Porsolt *et al.*, 1977; González-Diego., 2019).

Análisis de posibles blancos farmacológicos por SwissTargetPrediction

Para identificar posibles blancos con los que podrían interactuar los compuestos presentes en el EMZF y la FO2 se utilizó SwissTargetPrediction la cual es una herramienta web que permite predecir la probabilidad de interacción de moléculas pequeñas con proteínas de humano, ratón o rata. (Daina *et al.*, 2019).

Para este caso, se realizó la búsqueda usando los SMILES canónicos de los compuestos presentes en el EMZF y FO2 presentes en PubChem.

RESULTADOS

Obtención del extracto metanólico y extracto alcaloideo

Se preparó un ejemplar de herbario, el cual se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el número 178505 (Figura 5).

Se utilizaron 1885 g de material vegetal fresco los cuales se procesaron y secaron lo que resultó en 302 g de material seco. Este material se utilizó para obtener el EMZF del cual se obtuvieron 32.5 g. Se utilizaron 25 g del EMZF para obtener la FO2. Los rendimientos de los extractos se muestran en el Cuadro 4.



Figura 5. Ejemplar de herbario de *Z. fosteri*. Depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Cuadro 4. Rendimiento del EMZF y las fracciones de alcaloides.

Muestra	Peso fresco <i>Z. fosteri</i> (g)	Peso seco <i>Z. fosteri</i> (g)	Peso del EMZF (g)	Peso (g)	Rendimiento
EMZF	1885	302		32.51	10.83%
FO2			25	0.33	1.35%
FO3				2.80	11.2%

Análisis químico

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El EMZF fue analizado por CG-EM (Figura 6) donde se identificaron tres compuestos: la sacarosa como el compuesto de mayor abundancia, y dos alcaloides, la licorina (I) (Figura 7) y la 2-hidroxihomolicorina (X) (Figura 8), donde

el más abundante fue la licorina (I) (Cuadro 5). La composición completa del EMZF se encuentra en el anexo 2. En el caso de la licorina también se realizó por comparación de su espectro de masas con el de una muestra auténtica.

Cuadro 5. Composición del EMZF obtenida por CG-EM. El compuesto más abundante se marca en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	Abundancia (%)	RT
Sacarosa	41.93	6.51
Licorina	6.23	25.24
2-Hidroxihomolicorina	0.13	23.43

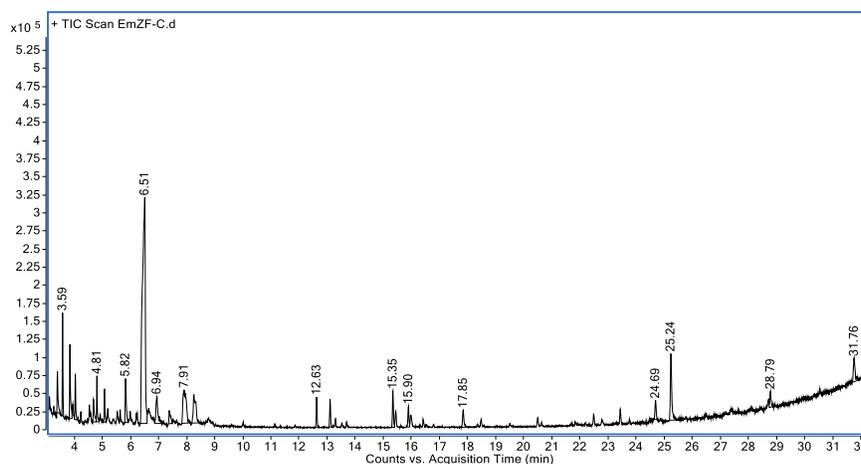


Figura 6. Cromatograma del EMZF obtenido por CG-EM. Los picos mayoritarios están en 6.51 y 25.24.

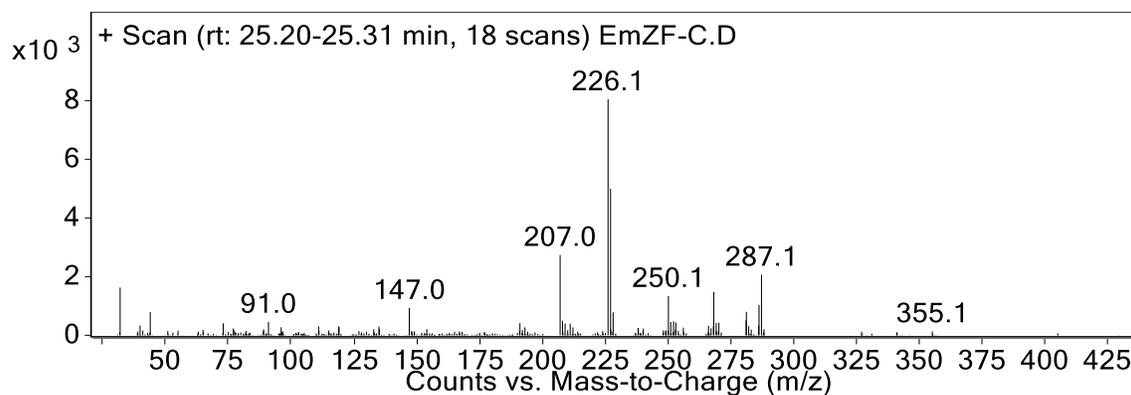


Figura 7. Espectro de masas del compuesto presente en el tiempo de retención de 25.53 del EMZF.

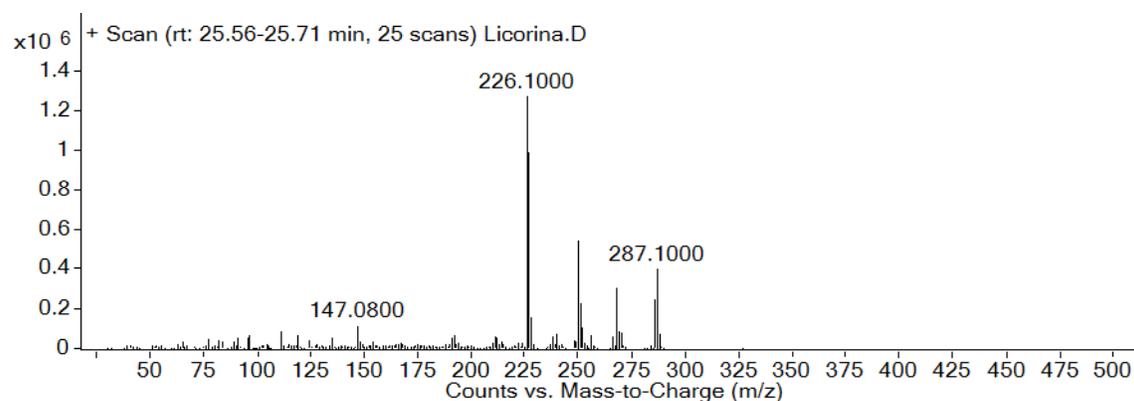


Figura 8. Espectro de masas del análisis por CG-EM del estándar autentico de licorina.

Los alcaloides más abundantes de la FO2 con base en el análisis de CG-EM (Figura 9) fueron la licorina (I) (Figura 10), O2-metilpancracina (III) (también reconocido como montanina) y licoramina (Cuadro 6). En el anexo 3 se encuentran los compuestos y espectros detectados en la FO2.

Cuadro 6. Alcaloides detectados por CG-EM de la FO2. El compuesto más abundante se muestra en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	Abundancia relativa (%)	RT
Licorina	66.48	25.60
Montanina	8.42	23.74
Licoramina	4.08	20.80
Licorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10- [metilenebis(oxi)]	1.31	22.51
Licorina,2-O-metil(eter) (Hippamina)	2.59	24.54
Galantamina1,2,3,12,15,16-hexadehidro-9-10- [metilenebis(oxi)]	1.03	22.00

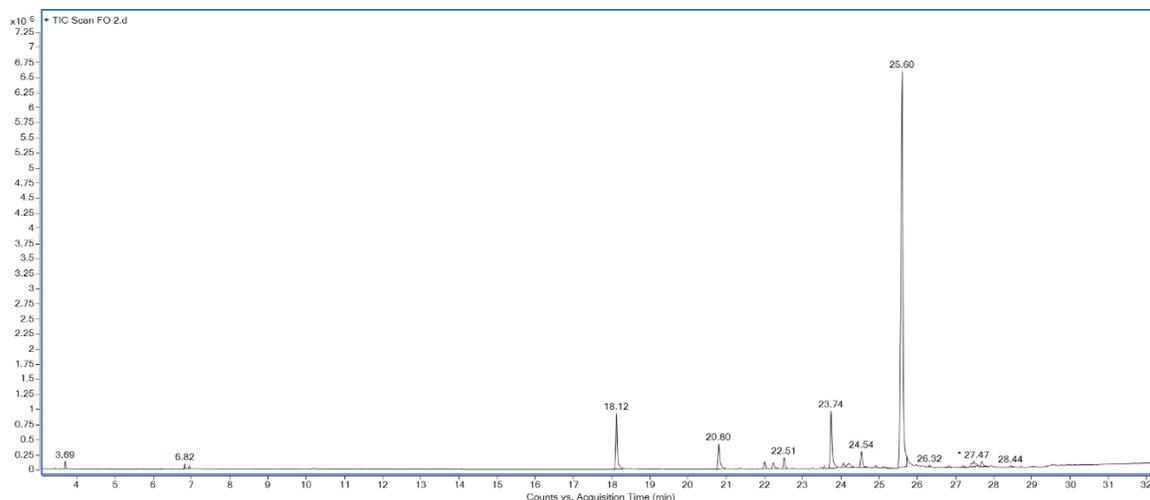


Figura 9. Cromatograma de la FO2 de *Zephyranthes fosteri* obtenido por CG-EM. Los picos mayoritarios identificados están en 25.60 y 23.74.

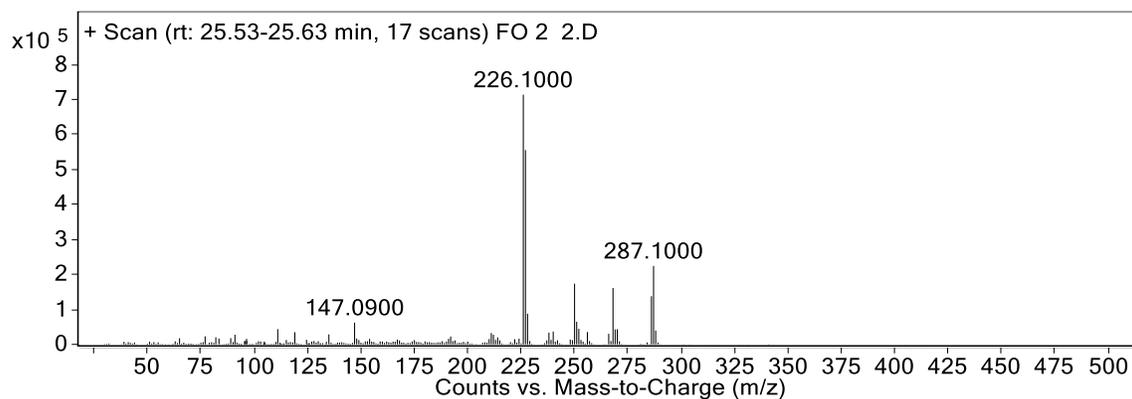


Figura 10. Espectro de masas del compuesto presente en el tiempo de retención de 25.60 de la FO2.

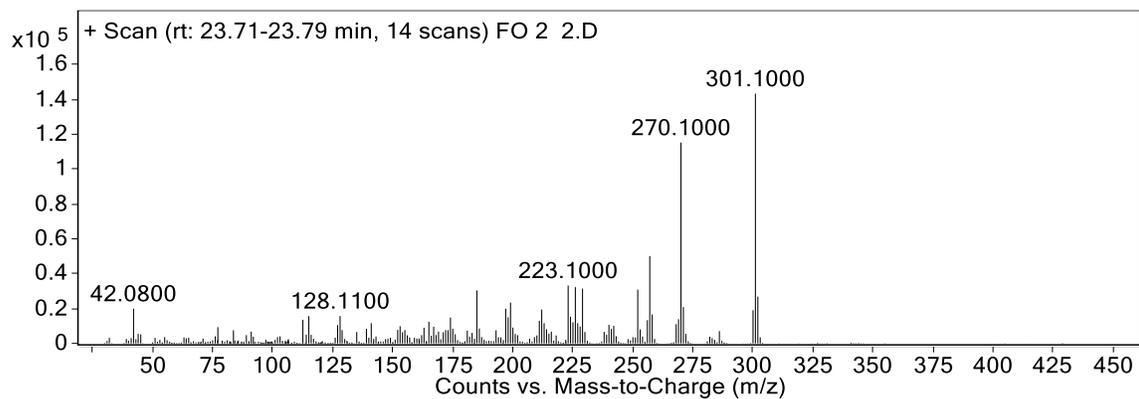


Figura 11. Espectro de masas presente en el tiempo de retención 23.74 de la FO2.

En el caso de la FO3 de *Zephyranthes fosteri* tuvo mayor rendimiento que la FO2. Se compone principalmente por sacarosa y licorina (I) (Cuadro 7). En el anexo 4 se encuentran los compuestos y espectros detectados en la FO3.

Cuadro 7. Composición de la FO3 de *Zephyranthes fosteri* obtenida por análisis de CG-EM. El compuesto más abundante se muestra en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	Abundancia relativa (%)	RT
Sacarosa	35.19	6.82
Licorina	23.11	25.54
Licorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10-[metilenebis(oxi)]	9.23	29.09

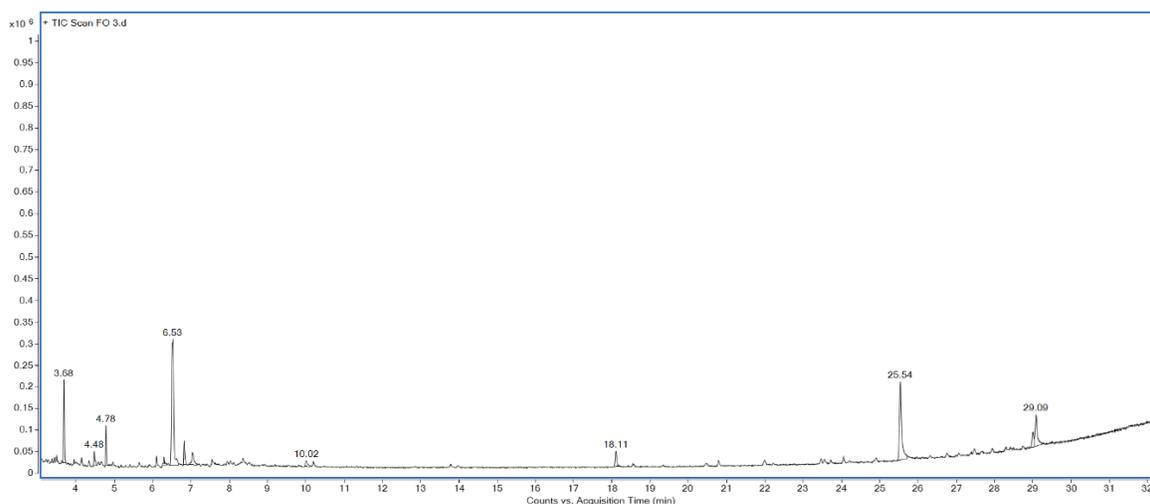


Figura 12. Cromatograma de la FO3 de *Zephyranthes fosteri* obtenido por CG-EM. Los picos mayoritarios están en 6.53 y 25.54.

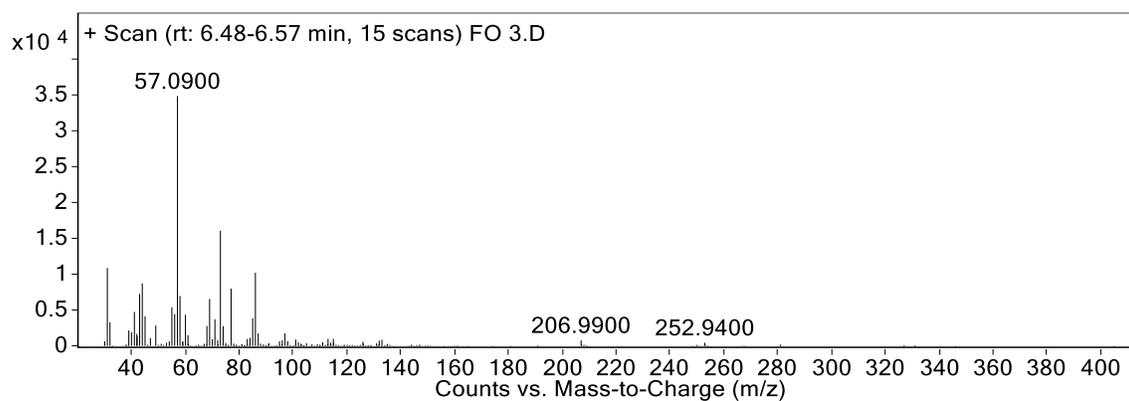


Figura 13. Espectro de masas correspondiente al poco en el tiempo de retención 6.53 de la FO3.

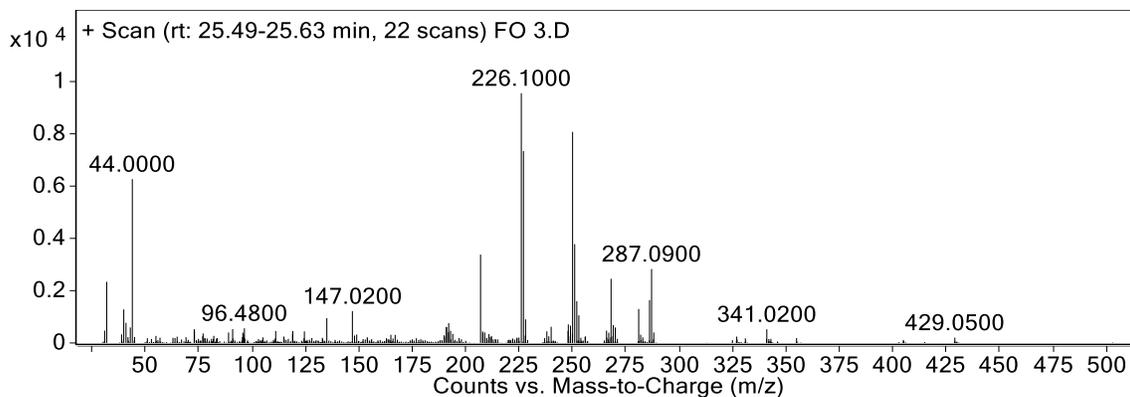


Figura 14. Espectro de masas correspondiente al poco en el tiempo de retención 25.54 de la FO3.

Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

Durante los primeros 30 minutos posteriores a la administración de los ratones no se observaron cambios en el grupo control, EMZF 2000 y FO2 a 300 mg/kg. Después de la primera hora, se observó el mismo comportamiento y aspecto en los ratones por lo que se procedió a probar la dosis de 1000 mg/kg de FO2. Se monitoreó a los animales las siguientes horas: los grupos control y EMZF no mostraron signos de toxicidad; únicamente el grupo administrado con la dosis de 2000 mg/kg de EMZF presentó heces blandas.

Con respecto a los ratones del grupo FO2 300, durante las 6 horas posteriores a la administración, presentaron heces blandas. A las 4 horas de la administración, dos de los ratones presentaron movilidad lenta y respiración agitada. Uno de los ratones de este grupo fue encontrado muerto posterior a las primeras 8 horas de observación.

Los ratones del grupo FO2 administrado con la dosis de 1000 mg/Kg presentaron diarrea posterior a la administración. A partir de las 3 horas, presentaron respiración agitada y las 6 horas movilidad lenta, pero continua. Posteriormente, los ratones murieron.

Para todos los grupos se registró diariamente el peso de los ratones para determinar si existía una pérdida de peso significativa lo cual podría indicar efectos tóxicos por parte del extracto metanólico o de la fracción de alcaloides

administrada a los ratones. Los grupos control y EMZF 2000 mg/Kg no presentaron diferencias de peso significativas entre ellos durante la duración del experimento (Figura 15).

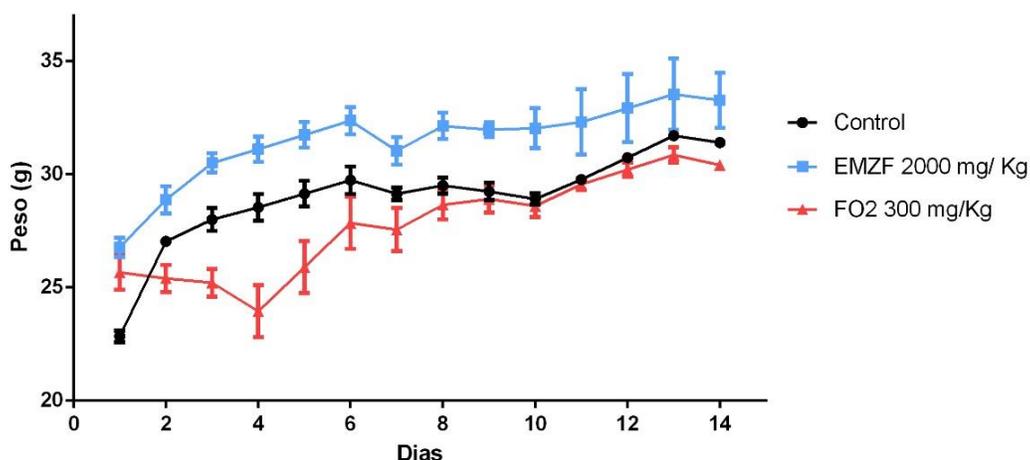


Figura 15. Los grupos a los que se les administro el EMZF y FO2 no presentaron variaciones de peso respecto al control. Peso de los ratones durante el experimento de toxicidad oral aguda. Cada punto representa el peso promedio \pm EMM (n=3) durante los 14 días de duración del experimento.

Siguiendo la guía del protocolo de toxicidad aguda de la OCDE, se determinó que la DL_{50} del extracto metanólico de *Zephyranthes fosteri* es superior a 2000 mg/kg ya que ningún ratón mostró signos de toxicidad o la muerte. Mientras que la DL_{50} de la FO2 es de 300mg/kg.

Las disecciones de hígado de los ratones utilizados en la DL_{50} fueron procesadas y analizadas, se muestran en el Anexo 5.

Estudio histopatológico

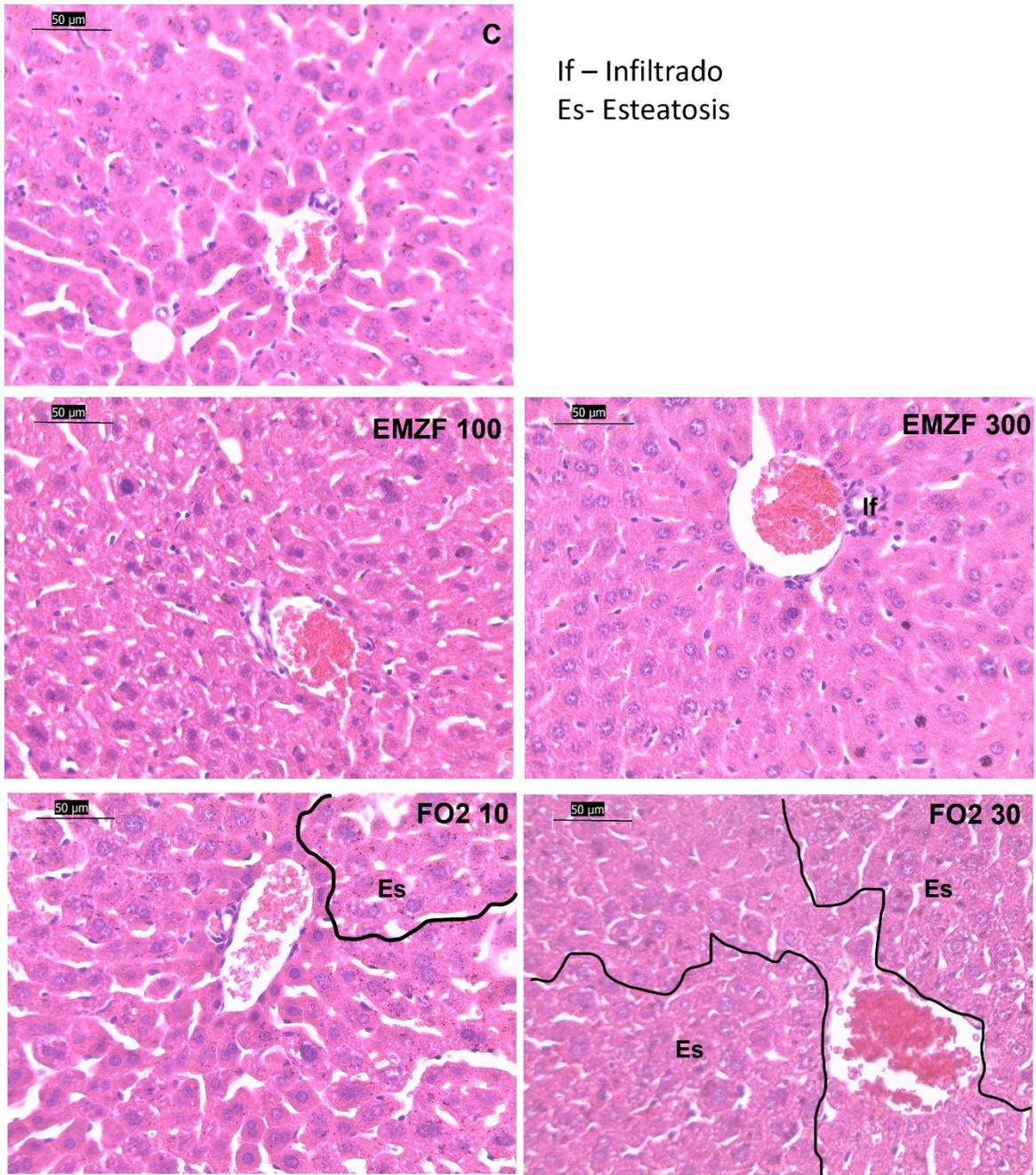
A fin de evaluar los posibles efectos del EMZF y la FO2 en los ratones a las dosis evaluadas en las pruebas conductuales, se realizó un análisis histopatológico de los tejidos provenientes del hígado, riñón y bazo.

Hígado

Se buscó la presencia de daños como cambios en el aspecto los hepatocitos, la presencia de células inflamatorias, hemorragia, congestión o necrosis para evaluar el posible daño en hígado debido a que este tipo de alteraciones se asocian con daño hepático inducido por fármacos (Kumar *et al.*, 2013).

En las muestras de hígado del grupo EMZF 100 y 300 mg/kg (p.o.) se observó la presencia de hepatocitos con aspecto moteado, que puede recordar al de la esteatosis, de forma leve y focal principalmente al centro de los lobulillos y se reportó la presencia de neutrófilos al centro del lobulillo de forma focal (Figura 16).

En los cortes histológicos provenientes de los ratones a los que se les administró la FO2 en las dosis de 10 y 30 mg/kg (p.o.) se observó congestión y dilatación de venas de forma leve y focal; también se observó dilatación de las sinusoides. El principal signo de cambio alteraciones en los hepatocitos fue la presencia de células con aspecto moteado, similares a la esteatosis, esta alteración se presentó de forma leve y focal en el grupo al que se le administró la dosis de 10 mg/kg. Y 30 mg/kg (Figura 16).



If – Infiltrado
Es- Esteatosis

Figura 16. El EMZF (100 y 300 mg/kg) y FO2 (10 y 30 mg/kg) (p.o.) no dañan el tejido hepático. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígado obtenidas de los ratones empleados para las pruebas conductuales. C, grupo control, muestra la zona del centro del lobulillo del grupo administrado con vehículo. EMZF 100, grupo administrado con 100 mg/kg del EMZF, muestra congestión leve de la vena central y posibles gotas de lípidos de forma leve. EMZF 300 presenta congestión leve de la vena central e infiltrado inflamatorio (If) de forma leve. FO2 10 presenta congestión leve de la vena central, así como hepatocitos con aspecto similar al de la esteatosis (Es) de forma leve. FO2 30 la vena central muestra congestión y dilatación; alrededor se muestran hepatocitos con posible esteatosis (Es). Secciones teñidas con hematoxilina eosina.

Riñón

De igual manera, se examinaron muestras de riñón de los cuatro grupos experimentales donde se buscó la presencia de cambios en el corpúsculo renal, la presencia de infiltrado inflamatorio, alteraciones en la capsula de Bowman, necrosis de los túbulos, los cuales son cambios asociados a toxicidad de fármacos o xenobióticos en el riñón (Greaves, 2012).

En los grupos a los que se les administró el EMZF en dosis de 100 y 300 mg/kg (p.o.) se buscaron cambios en la capsula de Bowman y, además, se observó de forma focal y leve hiper celularidad en el glomérulo al compararse con el control al que se le administró el vehículo (Figura 17).

En el grupo de ratones al que se le administraron 10 mg/kg (p.o.) de la FO2 se observó edema intersticial de forma leve y focal, la presencia de depósitos de proteínas en la luz de los tubos contorneado o el espacio de la cámara de Bowman. También se observó necrosis de forma focal en los túbulos contorneados, la congestión de vasos de forma multifocal. En el glomérulo, se observó hiper celularidad leve de forma y multifocal. En los ratones a los que se les administraron 30 mg/kg (p.o.) de FO2 se presentaron depósitos de proteínas de forma multifocal, edema leve y multifocal, hemorragia de forma focal. Mientras que el glomérulo presentó hiper celularidad de forma moderada (Figura 17). También se observó necrosis en los túbulos contorneados de forma multifocal, aunque únicamente se presentó en uno de los tres ratones examinados.

Ed- Edema
Hp-Hipercelularidad
Nx-Necrosis

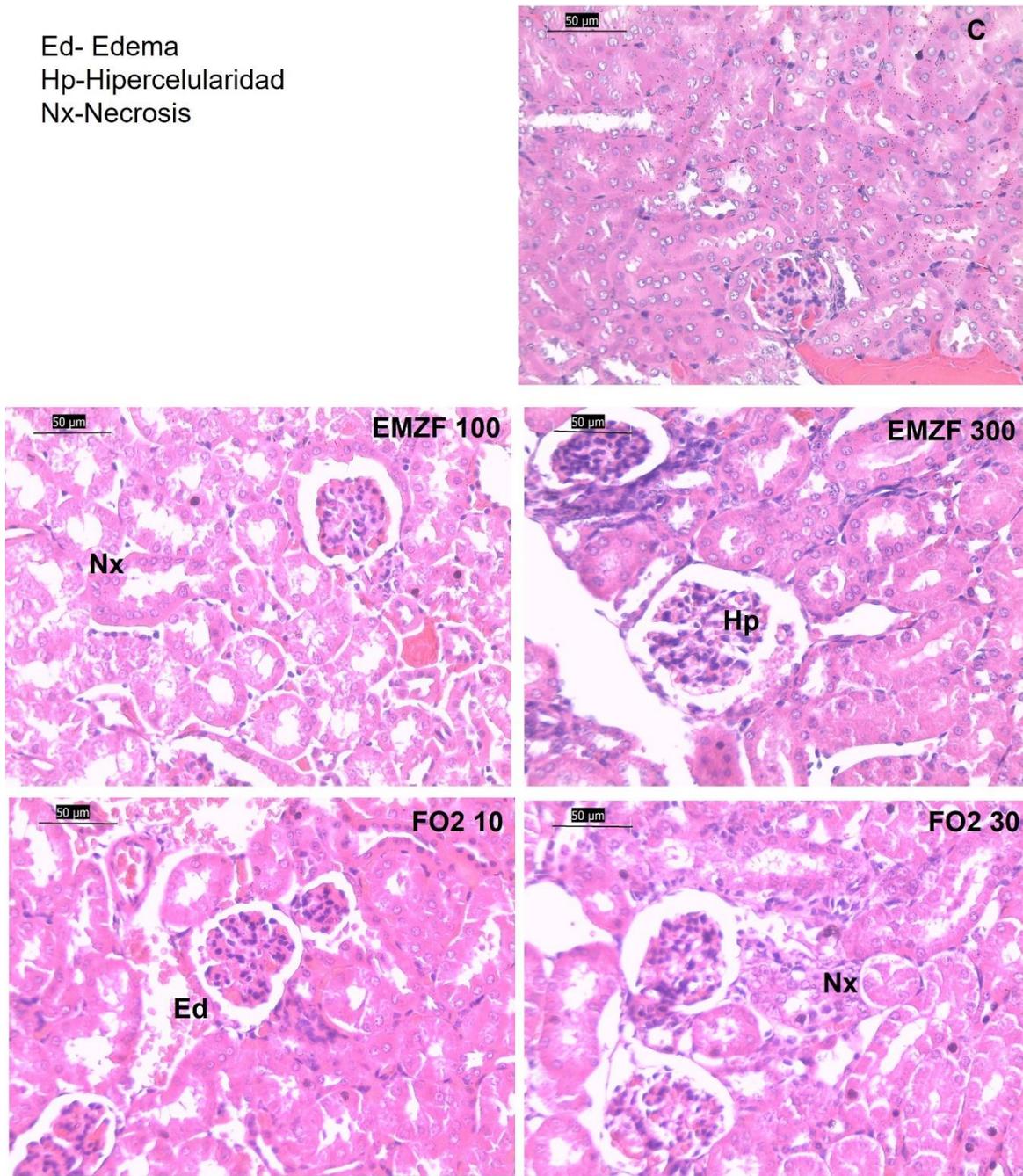


Figura 17. El EMZF no provoca daños significativos en el riñón, la FO2 si provoca cambios en la dosis de 30 mg/kg. Fotomicrografías de secciones histológicas de riñón obtenidas de los ratones empleados para las pruebas conductuales. C, grupo control, corresponde a un corte de zona cortical del riñón donde se observa un glomérulo y túbulo contorneado distales y proximales de aspecto normal. En EMZF 100 y EMZF 300 se observa hiper celularidad leve en el glomérulo. En FO2 10 se observa edema al centro del campo. En el grupo al que se le administraron 30 mg/kg de FO2 se observa necrosis de algunos túbulo contorneado y aumento en el número de células del glomérulo. Secciones teñidas con hematoxilina eosina. 40x.

Bazo

El bazo en los humanos cumple dos funciones principales: la filtración de la sangre y la mediación de la respuesta inmune. El bazo en los ratones, además de realizar estas funciones, también actúa como órgano hematopoyético. Tanto los fármacos como otras sustancias pueden tener efecto en el tejido linfoide al mostrar alteraciones en el tejido como pueden ser la congestión, hemorragia, pigmentación, cambio graso y atrofia del tejido del bazo (Linden *et al.*, 2012). Por lo que se buscaron estos cambios en las muestras de tejido obtenidas.

Se observó en el grupo control la apariencia normal tanto de la pulpa blanca (Figura 18) como de la pulpa roja (Figura 19). No se observaron cambios respecto al control en ninguno de los cuatro grupos experimentales. Por lo que se consideró que el EMZF y el extracto alcaloideo, en este esquema de dosificación, no tuvieron efectos en el bazo.

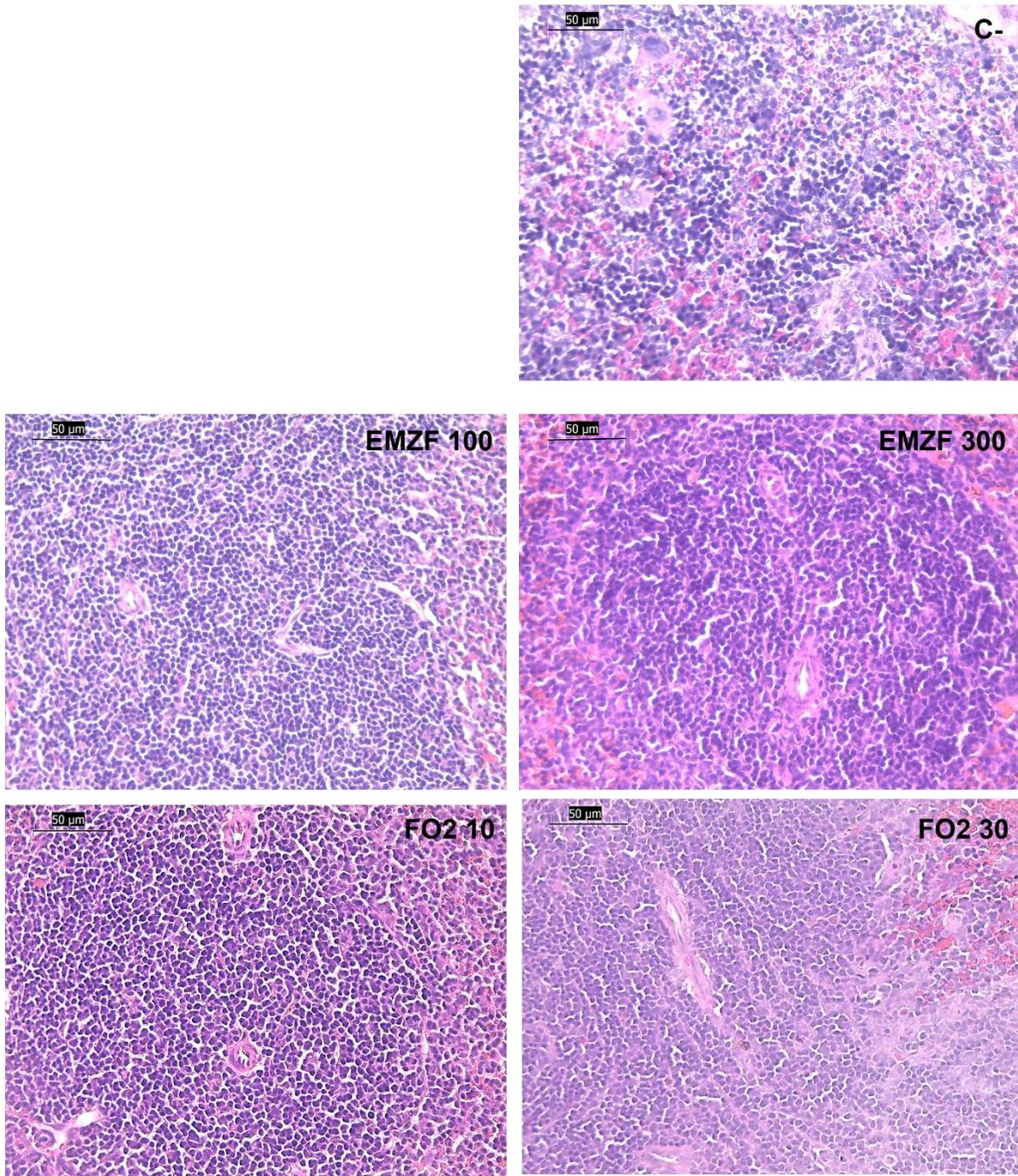


Figura 18. El EMZF y la FO2 no provocaron cambios en la pulpa blanca del bazo de ratón. Fotomicrografías de secciones histológicas de la pulpa blanca del bazo obtenidas de los ratones empleados para las pruebas conductuales (40x). C, grupo control, se observa la pulpa blanca. El tejido linfoide es de aspecto normal. En EMZF 100 y 300 mg/kg y FO2 10 y 30 mg/kg se muestran imágenes de la pulpa blanca sin cambios patológicos aparentes. Secciones teñidas con hematoxilina eosina. 40x.

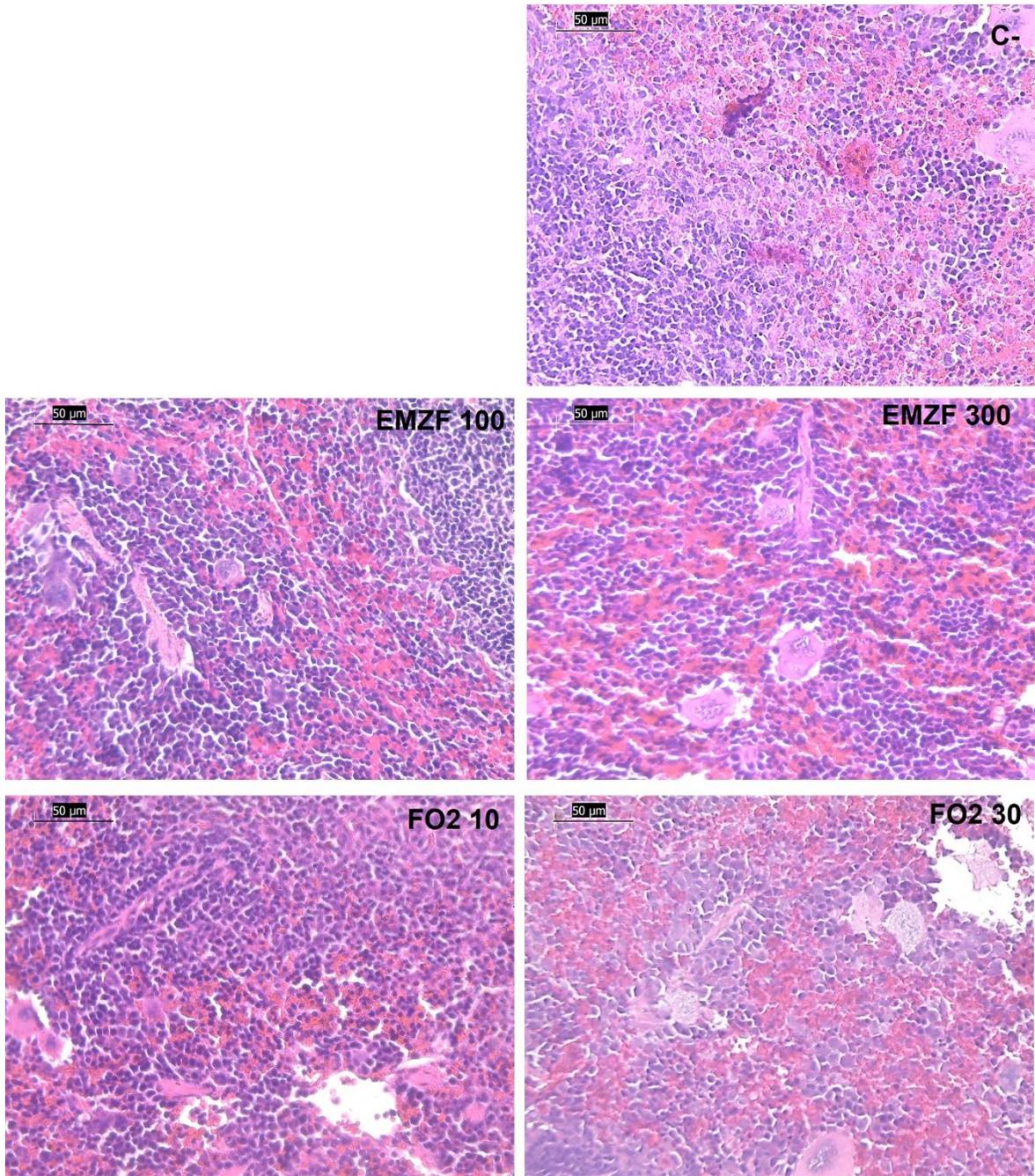


Figura 19. El EMZF y la FO2 no provocaron cambios en la pulpa roja del bazo de ratón. Fotomicrografías de secciones histológicas de la pulpa roja del bazo, obtenidas de los ratones empleados para las pruebas conductuales (40x). C, grupo control, se observa la pulpa roja. El tejido es de aspecto normal. En EMZF 100 y 300 mg/kg y FO2 10 y 30 mg/kg se muestran imágenes de la pulpa roja. Secciones teñidas con hematoxilina eosina. 40x.

Pruebas conductuales

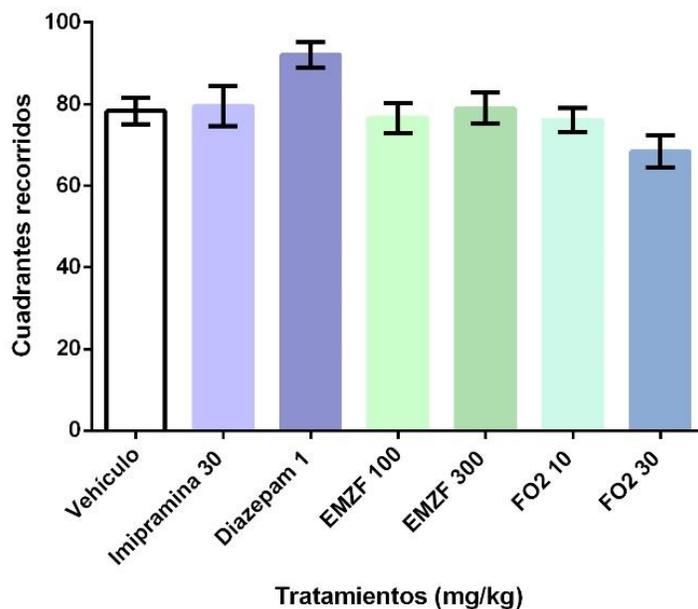


Figura 20. Ninguno de los tratamientos provocó en los ratones sometidos a la prueba de campo abierto alteraciones en la actividad motora espontánea. Los tratamientos fueron administrados por vía oral (p.o.) en ratones CD-1. Imipramina (30 mg/Kg), diazepam (1/mg/kg), EMZF 100 mg/kg, EMZF 300 mg/kg, FO2 10 mg/kg y FO2 30 mg/kg. Cada barra representa la $\bar{x} \pm$ EMM (n=10).

La prueba de campo abierto evalúa la actividad motora espontánea, lo cual permite saber si el tratamiento administrado afecta este parámetro (Shi *et al.*, 2021). También permite evaluar si la sustancia a probar tiene efecto ansiolítico o ansiógeno (Chen *et al.*, 2020). En este trabajo, ninguno de los tratamientos administrados modificó la actividad motora espontánea (Figura 20).

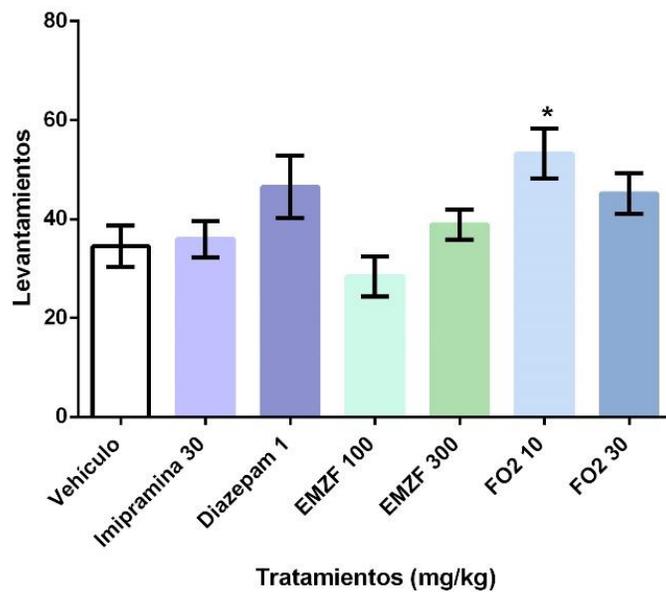


Figura 21. Efecto del EMZF y FO2 en ratones sometidos a la prueba de cilindro de exploración, ningún tratamiento presentó efecto sedante. Los tratamientos se administraron por vía oral (p.o.) El control positivo fue el diazepam (1 mg/Kg), EMZF 100 mg/kg, EMZF 300 mg/kg, FO2 10 mg/kg y FO2 30 mg/kg. Cada barra representa la $\bar{x} \pm EMM$ (n=10). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba de ANOVA de un factor seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

La prueba de cilindro de exploración permite determinar tanto la actividad motora (Shi *et al.*, 2021) así como evaluar el posible efecto sedante de una sustancia si disminuye el número de levantamientos respecto al vehículo (Ugalde *et al.*, 2010).

Los grupos a los que se les administró el EMZF no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control, aunque sí presentaron un mayor número de levantamientos (Figura 21). Mientras que en los ratones a los que se les administro FO2 sí se observó un aumento en el número de levantamientos respecto al control el cual fue estadísticamente significativo únicamente en el grupo con la dosis de 10 mg/kg (Figura 21).

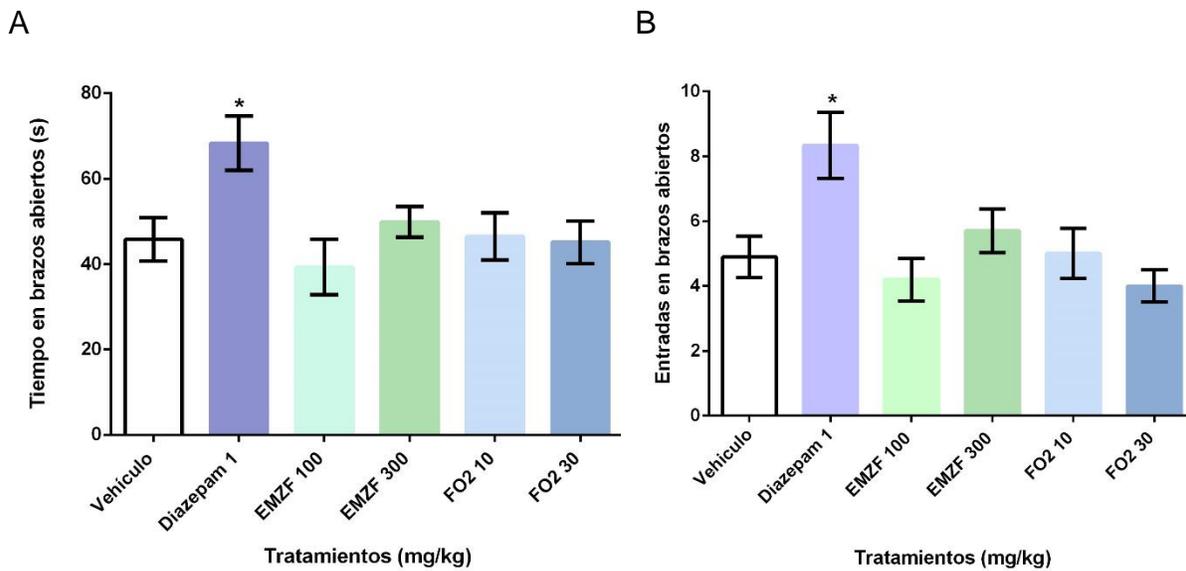


Figura 22. En la prueba de laberinto de cruz elevada únicamente el diazepam mostró actividad ansiolítica. Los tratamientos se administraron por vía oral (p.o.). El control positivo fue el ansiolítico diazepam 1 mg/kg, EMZF 100 mg/kg, EMZF 300 mg/kg, FO2 10 mg/kg y FO2 30 mg/kg. A) muestra el tiempo (s) y B) muestra el número de entradas a los brazos abiertos. Cada barra representa la $\bar{x} \pm EMM$ (n=10). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba de ANOVA de un factor seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

La prueba de laberinto de cruz elevado permite evaluar el comportamiento similar a la ansiedad en roedores y la búsqueda de compuestos con actividad ansiolítica. Este modelo se basa en el conflicto aversión de los roedores a los espacios abiertos y las alturas junto a su instinto por explorar un ambiente nuevo lo cual crea conflicto entre la exploración y la aversión (Bourin, 2015).

El único grupo que mostró diferencias significativas respecto al control lo cual aumentó el número de entradas y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos fue al que se le administró diazepam (Figura 22), el fármaco control positivo. La administración de ansiolíticos como el diazepam aumenta el tiempo y la exploración en los brazos abiertos (Campos *et al.*, 2013). El EMZF y el extracto alcaloideo no presentaron actividad ansiolítica.

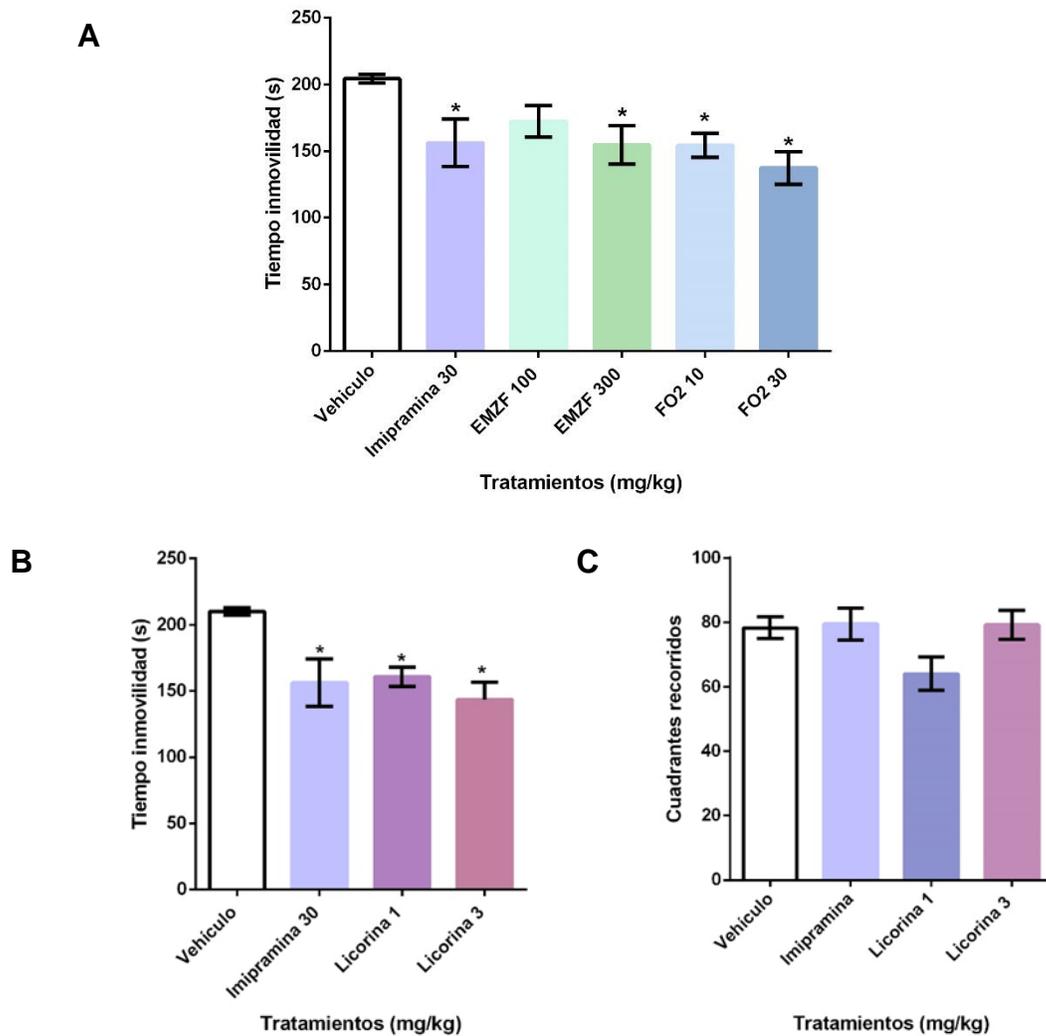


Figura 23. Efecto antidepresivo del EMZF a 300 mg/Kg, FO2 a dosis de 100 y 300 mg/kg y Licorina a 1 y 3 mg/kg (p.o.) en ratones sometidos a la prueba de nada forzado.

A) Efecto del EMZF y FO2 administrado por vía oral (p.o.) en ratones sometidos a la prueba de nada forzado. Cada barra representa la $\bar{x} \pm EMM$ (n=10). B) Efecto de la licorina administrada por vía oral (p.o.) sometidos a la prueba de nada forzado. El control positivo fue imipramina 30 mg/kg, EMZF 100 mg/kg, EMZF 300 mg/kg, FO2 10 mg/kg y FO2 30 mg/kg. C) Efecto de la licorina administrada por vía oral (p.o.) en ratones sometidos a la prueba de campo abierto. * La diferencia significativa fue determinada por una prueba de ANOVA de un factor seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

El nado forzado es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la posible actividad antidepresiva de distintas sustancias. Esto se observa cuando se reduce el tiempo de inmovilidad respecto al control negativo (Shi *et al.* 2021). Las dosis de EMZF de 100 y 300 mg/kg (p.o.) mostraron un menor tiempo de inmovilidad respecto al del control. El grupo administrado con la dosis de 300 mg/kg fue el que presentó una diferencia estadísticamente significativa (figura 23 A).

Los grupos tratados con FO2 mostraron diferencias significativas respecto al control y se observó un menor tiempo de inmovilidad. Esto resultó en un comportamiento similar al del grupo administrado con imipramina, el control positivo. Esta cuestión podría indicar una posible actividad antidepresiva por parte del extracto alcaloideo (figura 23 A).

La licorina es el alcaloide mayoritario presente en el EMZF y en FO2. Por lo que se decidió probar el efecto de la licorina (I) en el modelo de nado forzado y campo abierto a dosis de 1 y 3 mg/kg (p.o.) (figura 23). La licorina utilizada para estas pruebas fue donada por la M. en C. Lucia Centeno Betanzos quién la aisló previamente de *Zephyranthes fosteri*.

Ambas dosis de licorina (I) disminuyeron el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado de forma significativa (Figura 23 B) y no mostraron cambios en la actividad motora en la prueba de campo abierto respecto al control negativo (Figura 23 C).

Análisis de posibles blancos farmacológicos por SWISSTargetPrediction

La licorina (I), el alcaloide mayoritario del extracto metanólico y alcaloideo de *Z. fosteri*, tiene reporte de las siguientes actividades farmacológicas: actividad citotóxica, antiangiogénica, inhibidora de la topoisomerasa 1, antiparasitaria en *Tricomona vaginalis*, *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolítica*, inhibidor leve de la acetil colinesterasa, antioxidante, antiinflamatoria (Khalifa *et al.*, 2018), antinociceptivo a dosis de 1 mg/kg (Saltan *et al.*, 2012), regulador del ciclo circadiano (Onishi *et al.*, 2012) y promueve la degradación de α -sinucleína al regular el proteasoma de ubiquitina (Zhu *et al.*, 2021). Este es, desde mi conocimiento, el primer reporte de su posible actividad efecto antidepresivo en ratones en el modelo de nado forzado.

Debido a esto, se decidió realizar un análisis utilizando SWISSTargetPrediction, para poder predecir la posible interacción de los alcaloides mayoritarios en el EMZF y FO2 con distintas proteínas blanco del sistema nervioso central.

Como resultado de este análisis, se determinó que, tanto la licorina como la montanina, presentan posible interacción con la acetil colinesterasa (Cuadros 8, 9 y 10). Ya se ha reportado la actividad *in vitro* de la montanina como un inhibidor de la acetil colinesterasa a concentraciones de 1mM, 500 μ M y 100 μ M (Pagliosa *et al.*, 2010) se considera un inhibidor débil comparado con el estándar, galantamina 1.7 μ M, (Koutová *et al.*, 2020).

Cuadro 8. Posibles blancos de interacción de la licorina obtenidos usando SWISS Target Prediction.

Blanco	Probabilidad (%)	Uniprot ID
Acetilcolinesterasa	19.66	P211836
Alfa L fructosidasa I	9.78	P04066
Receptor Betaadrenérgico 2	9.78	P18762
Nucleósido purín fosfatasa	9.78	P04066
Beta-glucocerebrosidasa	9.78	P17439
Receptor opioide Mu	9.78	P42866
Receptor opioide Delta	9.78	P32300
Glicógeno fosforilasa del hígado	9.78	P06737
Proteína kinasa C	9.78	P41743
Alfa lisosomal mannosidasa	9.78	O00754
Beta glucosidada	9.78	Q9HCG7
Glutación reductasa	9.78	P00390
Receptor neuronal de acetilcolina subunidad alfa 4	9.78	P43681
Receptor Betaadrenérgico 3	9.78	P25962
Beta galactosidasa	9.78	P16278

Cuadro 9. Posibles blancos de interacción de montanina, obtenidos usando SWISS Target Prediction.

Blanco	Probabilidad (%)	Uniprot ID
Acetilcolinesterasa	11.94	P21836
Receptor muscarínico M2	11.11	Q9ERZ4
Receptor muscarínico M1	11.11	P12657
Receptor Beta adrenérgico 2	11.11	P18762
Receptor neuronal de acetilcolina subunidad alfa 4	11.11	O70174
Receptor opioide Delta	11.11	P32300

DISCUSIÓN

Análisis químico del extracto metanólico y extracto alcaloideo

Tanto Centeno y colaboradores (2021) como García Cruz (2017) han reportado el rendimiento del extracto metanólico de *Zephyranthes fosteri*, proveniente de la REPSA ubicada en el campus de Ciudad Universitaria, con rendimiento del 9.77 y 12.9%, respectivamente. Con las plantas de *Z. fosteri* en la zona arqueológica de Cuicuilco se obtuvo un rendimiento similar (10.83%, Cuadro 4) al utilizar la planta completa.

Por el contrario, el rendimiento de FO2 (1.5%, Cuadro 4) fue menor respecto al rendimiento obtenido de FO3 (11.2%, Cuadro 4). Esto contrasta con lo reportado previamente para *Zephyranthes fosteri* ya que tanto García-Cruz (2017) como Centeno-Betanzos (2014) mencionan que la fase orgánica con mayor rendimiento corresponde a la FO2 con rendimientos de 2.4% y 3.67% respectivamente.

Los alcaloides más abundantes de FO2 fueron la licorina y la montanina. La mayoría de los alcaloides presentes en la FO2 son del tipo licorina (I), con excepción de la montanina (III) (Ding *et al.*, 2017).

Para *Zephyranthes fosteri*, la licorina (I) está reportada como el alcaloide mayoritario en el bulbo y raíces, mientras que el 3-demetoxi-6-epimesembranol (II) en las partes aéreas y bulbo junto con un 65.45 % de sacarosa (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021; Centeno-Betanzos, 2014). La licorina (I) de los alcaloides comunes presentes en las Amaryllidaceae, encontrándose en varios géneros, incluido *Zephyranthes* (Khalifa *et al.*, 2018).

La composición de la FO3 fue principalmente de sacarosa y licorina (I) (Anexo 3). Se tiene reporte que, en la FO3 del bulbo de *Zephyranthes fosteri*, existe presencia de sacarosa junto con otros azúcares como el maltol (Centeno-Betanzos, 2014).

García-Cruz (2019) menciona que en la FO3 se encuentra una menor cantidad de alcaloides y no reacciona con el reactivo de Dragendorff por lo que no se continuó con su análisis. Mientras que Centeno-Betanzos (2014) no reporta la presencia de licorina (I) en FO3 y los alcaloides encontrados en esta fase orgánica en las distintas partes de *Z. fosteri* se encuentran en porcentajes menores al 2%.

La ausencia de alcaloides tipo mesembrano, previamente reportados para esta especie tanto en el extracto metanólico como en el extracto alcaloideo (FO2) (García-Cruz., 2019; Centeno-Betanzos *et al.*, 2021), y la variación de la composición química de *Zephyranthes fosteri* se puede explicar en parte por la plasticidad fenotípica que presenta esta especie. Lo que además provoca variación morfológica y de la composición de alcaloides en distintas localidades de distribución donde además existen distintas variables bióticas y abióticas (Centeno-Betanzos *et al.*, 2022)

En ese sentido uno de los factores bióticos que afecta la producción de alcaloides en las Amaryllidaceas es la presencia de hongos endófitos los cuales, dependiendo de la especie, afectan la cantidad y diversidad de alcaloides producidos en distintas partes de la planta (Zhou *et al.*, 2020)

La presencia de vegetación también es otro factor a considerar. Se ha reportado en el caso de *Narcissus pseudonarcissus* (Amaryllidaceae) que al cultivarse junto con herbáceas, aumenta la producción de galantamina lo cual plantea un método de cultivo para poder obtener galantamina y otros alcaloides presentes en la planta (Fraser *et al.*, 2021; Jin y Yao, 2019).

Esto indica que la competencia con otras plantas y hongos endófitos también podría afectar la composición química de *Zephyranthes fosteri*.

Determinación de la dosis letal 50

Por otro lado, determinamos que la DL_{50} del EMZF es superior a los 2000 mg/kg la cual es la dosis máxima contemplada en el protocolo de toxicidad aguda de la OCDE (2001) y la DL_{50} de FO2 es de 300 mg/kg. Esto indica que el EMZF tiene una toxicidad relativamente baja (OCDE, 2001).

La presencia de heces blandas y diarrea se puede deber al contenido en licorina tanto en el EMZF como de la FO2. Este alcaloide se ha reportado que tiene efecto emético y puede causar diarrea en dosis de 3 mg/kg (Khalifa *et al.*, 2018). Sin embargo, no se vieron cambios significativos en el peso de los ratones durante el experimento (Figura 15).

La OCDE clasifica la toxicidad de sustancias químicas en cinco categorías en el sistema armonizado global de etiquetados. En este sistema, los compuestos más tóxicos se encuentran en la “Categoría Uno” con valores de DL_{50} bajos (5 mg/kg o menores), mientras que la “Categoría Cinco” tienen una toxicidad baja y únicamente son tóxicos para poblaciones sensibles ya que poseen valores de DL_{50} de 2000-5000 mg/kg (OCDE, 2002).

La DL_{50} del extracto alcaloideo corresponde a compuestos o mezclas de la “Categoría Tres” del sistema armonizado global de etiquetados, por lo que su toxicidad es relativamente baja.

El EMZF tiene una DL₅₀ superior a los 2000 mg/kg y este grupo presentó diarrea durante el experimento. Uno de los criterios para que una mezcla se encuentre en la “Categoría Cinco” incluyen que no se haya observado ningún deceso al momento de probar con la dosis indicada para la “Categoría Cuatro” (2000 mg/kg) además de que no se presenten signos de toxicidad como diarrea y piloerección. El EMZF estaría dentro de la categoría 4 (OECD, 2002).

El alcaloide mayoritario del EMZF y FO2 es la licorina, la cual se encuentra dentro del sistema armonizado de etiquetados dentro de la categoría 3, como toxico si se ingiere en ciertas dosis y tiene una DL50 reportada de 10700 mg/kg en ratones (NCBI., 2023).

Toxicidad de los extractos

Con respecto al análisis histopatológico, los cambios observados en el hígado fueron cambios de tipo vascular como la dilatación y congestión clasificados como leves y focales. En el caso de la congestión de las sinusoides, se puede deber posiblemente al método de eutanasia: dislocación cervical, en donde no se exaguinea al animal, por lo que ésta no se consideró como signo de daño (Thoolen *et al.*, 2010).

La presencia de un aspecto moteado en los hepatocitos en roedores puede asociarse con la alimentación y el momento de la eutanasia. Las ratas y ratones en periodo posprandial presentan acumulación de glicógeno y agua en los hepatocitos de forma leve, lo cual se considera normal (Rogers y Dintzis, 2018).

Está reportado que la licorina tiene un efecto hepatoprotector a una dosis de 2 mg/kg en ratas tratadas con tetracloruro de carbono, lo cual reduce la esteatosis y necrosis (Saltan Çitoğlu *et al.*, 2012)

Con respecto al riñón, se consideró que ambos grupos que fueron tratados con el extracto alcaloideo presentaron cambios relacionados con la inflamación como el edema y dilatación de vasos sanguíneos. Los depósitos de proteína en los túbulos proximales pueden llegar a causar obstrucción, edema y daño en los túbulos, lo

cual predispone a la necrosis en los mismos (Greaves, 2012). La presencia de necrosis de forma focal en los túbulos contorneados y la presencia de depósitos de proteínas en los grupos tratados con EMZF y FO2 son señal de daño en el riñón.

No se tienen registros previos de los posibles efectos de *Zephyranthes fosteri* en riñón, pero sí se tienen de los efectos de la licorina, uno de los componentes mayoritarios en ambos extractos. Schimmel *et al.*, (2020) mencionan que evaluaron el estado del riñón de los ratones y ratas empleados para evaluar el efecto cardioprotector de la licorina a una dosis de 4.5 mg/kg en ratones bajo un tratamiento de angiotensina II y ratas con dietas ricas en sodio. Ellos reportan que no encontraron signos de daño atribuidos a la licorina, ni algún efecto protector frente a la dieta alta en sodio. También midieron indicadores de daño renal como la creatinina y la urea en sangre donde no se encontraron signos de daño, pero si la urea ligeramente alta en el grupo al que se le administró licorina.

Con respecto al bazo de los ratones, en los cuatro grupos experimentales no presentaron daños patológicos aparentes en la pulpa blanca y la pulpa roja por lo que se consideró que el EMZF y FO2 no ocasionan cambios en el bazo. Previamente se ha reportado que la licorina es capaz de detectarse en el bazo (Ren *et al.*, 2014). No se tienen antecedentes de su posible efecto sobre este órgano pero si existen reportes de su actividad antiinflamatoria (Xiao *et al.*, 2022).

Con base en las observaciones en las muestras de hígado, riñón y bazo mediante el modelo de administración utilizado, el EMZF y la FO2 no presentan toxicidad, pero si generan cambios vasculares que están probablemente relacionados por su alto contenido en licorina. Y sí puede tener efectos leves en el riñón.

Pruebas conductuales

El EMZF y FO2 no presentaron un efecto sedante (figura 21). Sustancias con efecto sedante disminuyen el número de levantamientos respecto al control (Ugalde *et al.*, 2010). Ninguno de los grupos presento un menor número de

levantamientos. Previamente Ugalde y colaboradores (2010) determinaron que esta dosis sedante efectiva 50 es de 1.21 mg/kg. En este modelo de administración el grupo administrado con diazepam no mostro cambios significativos en el número de levantamientos. Con estos resultados se puede concluir que el EMZF y FO2 no tienen un efecto sedante. Esto coincide con la prueba de campo abierto donde los grupos experimentales no mostraron alteraciones en la actividad motora.

Respecto a los resultados de la prueba de laberinto de cruz elevado, el único grupo que aumentó el tiempo y el número de entradas en brazos abiertos (Figura 22) fue el control positivo, diazepam. El diazepam es una benzodiazepina con actividad ansiolítica, sedante, hipnótica y anticonvulsiva. Actúa potenciando la actividad inhibitoria del ácido gamma aminobutírico (GABA) al unirse a los receptores GABA en sistema límbico y el hipotálamo (NCBI, 2023). Se emplea para el tratamiento de ansiedad severa, desordenes de pánico y convulsiones (DrugBank, 2023).

El EMZF y FO2 no presentaron efecto ansiolítico (figura 22). Uno de los alcaloides presente en el extracto alcaloideo, la montanina (III), se ha reportado que tiene actividad ansiolítica (Flávia *et al.*, 2006) cuyo mecanismo de acción aún no se ha descrito completamente. Sin embargo, su abundancia relativa es baja en FO2 a comparación de la licorina.

Otros alcaloides encontrados en esta familia que se han asociado con actividad ansiolítica han sido los alcaloides tipo mesembrano (Berkov *et al.*, 2021). Este tipo de alcaloides se ha reportado en *Zephyranthes fosteri*; sin embargo, no está presente en las plantas colectadas en la zona arqueológica de Cuicuilco.

Para evaluar la posible actividad antidepresiva del EMZF y FO2 se utilizó la prueba de nado forzado (figura 23), este es un modelo para evaluar posible actividad antidepresiva de alguna sustancia, como el modelo de suspensión de cola. Ambos modelos permiten evaluar la posible actividad de una sustancia

antidepresiva al inducir comportamiento similar a la desesperanza o resignación (Castagné *et al.*, 2009)

Para la prueba de nado forzado se utilizó la imipramina como fármaco control positivo la cual es un antidepresivo tricíclico que actúa inhibiendo la recaptación de serotonina y norepinefrina que compite con los transportadores dependientes de sodio de noradrenalina (SLC6A2) y el transportador de serotonina dependiente de sodio (SLC6A4). Esto aumenta la concentración de ambos neurotransmisores, los cuales se ven disminuidos durante la depresión con lo cual se observa una mayor afinidad por la serotonina. También se ha visto que el aumento en la concentración de serotonina y noradrenalina a largo plazo tiene efectos neuromoduladores lo cual activa Camp y CREB-1 (NCBI., 2023).

Se han reportado que existen algunas plantas de la familia Amaryllidaceae con actividad antidepresiva, principalmente por la acción de alcaloides tipo amaryllidacea como la montanina (III) (Flávia *et al.*, 2006), o la presencia de alcaloides tipo mesembrano, los cuales actúan como inhibidores de la recaptación de serotonina (Behl *et al.*, 2023).

En este trabajo evaluamos la posible actividad antidepresiva de la licorina a dos dosis 1 y 3 mg/kg (p.o.) las cuales disminuyeron el tiempo de inmovilidad. Hasta la fecha, no se ha reportado actividad antidepresiva de la licorina (I), pero sí otras actividades sobre el sistema nervioso central. La licorina presenta una débil actividad como inhibidor de la acetil colinesterasa (Cao *et al.*, 2013) y se propuso como un neuroprotector frente a la enfermedad de Parkinson ya que promueve la degradación de α -sinucleína (Zhu *et al.*, 2021) y tiene efecto antioxidante (Khalifa *et al.*, 2018).

En algunos casos, se prefiere eliminar la presencia de licorina por su citotoxicidad, o sus efectos sobre la presión cardíaca que se han reportado en ratas (Berkov *et al.*, 2021). También se ha mencionado que puede tener efectos sobre el sistema parasimpático como bradicardia, hipotensión, hipermovilidad del tracto intestinal. Este tipo de efectos secundarios se han asociado principalmente a su actividad

como inhibidores de la acetil colinesterasa y hasta cierto grado con su capacidad de unión a receptores 5-HT₃ (Berkov *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha planteado la posibilidad de que los inhibidores de la actividad de la acetil colinesterasa también tengan propiedades antidepresivas (Fitzgerald *et al.*, 2021).

Fitzgerald y colaboradores (2021) probaron varios inhibidores de la acetil colinesterasa en la prueba de nado forzado y reportaron que la galantamina, fisostigmina y rivastigmina tienen actividad antidepresiva. El donepezil, un inhibidor de la acetil colinesterasa el cual es utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, disminuyó el tiempo de inmovilidad en ratones Swiss en un tratamiento agudo. La huperizina A presentó actividad antidepresiva en un modelo crónico de estrés en ratas y ratones. Este tipo de reportes sugieren que inhibidores reversibles de la acetil colinesterasa pueden regular el estado de ánimo (Fitzgerald *et al.*, 2021b)

Por otro lado, la montanina que se detectó por CG-EM en FO2 si tiene antecedentes de actividad antidepresiva por el modelo de nado forzado y ansiolítica en modelo de laberinto de cruz elevada (Flávia *et al.*, 2006). Además, la montanina tiene reporte de su afinidad por el receptor de la recaptura de serotonina. Sin embargo, su afinidad es relativamente baja, presentado una IC₅₀ de 36.56 µg/ml (Stafford *et al.*, 2013). Se ha planteado que su efecto ansiolítico y antiepiléptico se relacione más con su actividad sobre los receptores de GABA (Mathew *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que los extractos de metanólico y alcaloideo (FO2) de *Zephyranthes fosteri*, tienen un posible efecto antidepresivo debido a que redujeron el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado.

La licorina, el alcaloide mayoritario del EMZF y FO2, también redujo el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado lo que sugiere un posible efecto antidepresivo.

La DL₅₀ del EMZF es superior a los 2000 mg/kg y la DL₅₀ de FO2 es de 300 mg/kg por lo que se consideran no tóxico y poco tóxico, respectivamente.

Con estas dosis y este esquema de dosificación no se observaron efectos tóxicos del EMZF y FO2 en hígado y bazo. Pero sí leves efectos en el riñón en el grupo tratado con FO2.

PERSPECTIVAS

El estudio de los factores que afectan la producción de alcaloides en *Zephyranthes fosteri*.

Explorar el posible mecanismo de acción del efecto antidepresivo de la licorina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, 21(2), 205–235. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X)
- Asgharian, P., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sabernavaei, M., Hosseini, K., Forouhandeh, H., Ebrahimi, T., Sharafi-Badr, P., Tarhriz, V., Soofiyan, S. R., Helon, P., Rajkovic, J., Durna Daştan, S., Docea, A. O., Sharifi-Rad, J., Calina, D., Koch, W., y Cho, W. C. (2022). Pharmacological effects and therapeutic potential of natural compounds in neuropsychiatric disorders: An update. *Frontiers in Pharmacology*, 13(September), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.926607>
- Ayala-Enríquez, M. I., Román-Montes De Oca, E., & García-Lara, F. (2019). Caracterización del sistema milpa en Santa Catarina, Tepoztlán, Morelos, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 5(E0051003), 11–23. <https://doi.org/10.30973/aap/2019.5.0051003>
- Behl, T., Rana, T., Sehgal, A., Sharma, N., Albarrati, A., Albratty, M., Makeen, H. A., Najmi, A., Verma, R., y Bungau, S. G. (2023). Exploring the multifocal role of phytoconstituents as antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 123(June 2022), 110693. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110693>
- Berkov, S., Osorio, E., Viladomat, F., y Bastida, J. (2020). Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. In *Alkaloids: Chemistry and Biology* (1st ed., Vol. 83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002>
- Berkov, S., Pechlivanova, D., Denev, R., Nikolova, M., Georgieva, L., Sidjimova, B., Bakalov, D., Tafradijska, R., Stoynev, A., Momekov, G., y Bastida, J. (2021). GC-MS analysis of Amaryllidaceae and Scelletium-type alkaloids in bioactive fractions from *Narcissus cv. Hawera*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(14), 1–11. <https://doi.org/10.1002/rcm.9116>

- BioRender. (2023). Método para la extracción ácido base para obtener el extracto alcaloideo (FO2). Imagen elaborada con BioRender.
<https://app.biorender.com/>
- Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 295–303.
<https://doi.org/10.31887/dcns.2015.17.3/mbourin>
- Bye, R., Linares, E. (2013). 'Códice De la Cruz-Badiano', *Arqueol. Mex.* 51, 22-23.
- Cahlíková, L., Valterová, I., Macáková, K., y Opletal, L. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 575–580.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000089>
- Calderón de Rzedowski, Graciela; Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. <https://doi.org/10.1201/b22282-12>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., y Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 101–111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Castagné V, Moser P, Porsolt RD. (2009). Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. En: Buccafusco JJ (ed). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Cao, Z., Yang, P., y Zhou, Q. (2013). Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, 56(10), 1382–1391. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4967-9>
- Centeno-Betanzos, Lucia Y., López-Caamal, A., Cortés Rendon, N., León Santiago, M., Osorio, E., Bastida Armengol, J., Cano-Santana, Z., Reyes-Chilpa, R., y Tovar-Sánchez, E. (2022). Microsatellites, morphological, and alkaloids characterization of *Zephyranthes fosteri* and *Z. alba*

(Amaryllidaceae): Allopatric populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 101(March), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104398>

Centeno-Betanzos, Lucia Y., Reyes-Chilpa, R., Pigni, N. B., Jankowski, C. K., Torras-Claveria, L., y Bastida, J. (2021). Plants of the 'Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis' from Mexico, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) Alkaloids. *Chemistry and Biodiversity*, 18(3). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000834>

Centeno-Betanzos, Lucía Yoscelina. (2014). ESTUDIO ANATÓMICO, QUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* Y *Habranthus* aff. *concolor*.

Chen, D., Wang, J., Xing, Y., Jia, P., Zhang, Y., Wang, J., Ren, H., Le, A., Chen, X., y Wang, J. (2020). Behavioral assessment of post-stroke depression and anxiety in rodents. *Brain Hemorrhages*, 1(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.hest.2020.02.004>

Cortes, N., Sabogal-Guaqueta, A. M., Cardona-Gomez, G. P., y Osorio, E. (2019). Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110(December 2018), 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.013>

Cruz Martinez, M. (2015). Listado Etnoflorístico de dos localidades del Municipio de Tepexi de Rodríguez, Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Daina, A., Michielin, O., y Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W357–W3664. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>

Del Carmen Rodriguez Castro, E. (2009). Las plantas medicinales mayas: Un

estudio de los factores de riesgo ambientales y sociales en Maxcanú, Yucatán. Instituto Politecnico Nacional.

Ding, Y., Qu, D., Zhang, K. M., Cang, X. X., Kou, Z. N., Xiao, W., & Zhu, J. B. (2017). Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19(1), 53–100. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332>

DrugBank. (2023). Diazepam. Consultado en 19/09/2023
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00829>

eFloraMex. Plantas vasculares de México. *Zephyranthes fosteri*. Consultado en: https://efloramex.ib.unam.mx/cdm_dataportal/taxon/51e32585-c5ee-475a-b6df-6d1bcfbcc760

Elgorashi, E. E. (2019). Phytochemistry and Pharmacology of the Family Amaryllidaceae: An Overview of Research at RCPGD. *Natural Product Communications*, 14(9). <https://doi.org/10.1177/1934578X19872929>

Espinosa González, A. M. (2016). Evaluación del efecto fotoquimioprotector del verbascósido en ratones skh-1 irradiados con luz ultravioleta. Tesis para obtener el grado de Doctor. UNAM.

Fitzgerald, P. J., Hale, P. J., Ghimire, A., y Watson, B. O. (2021a). Multiple cholinesterase inhibitors have antidepressant-like properties in the mouse forced swim test. *Behavioural Brain Research*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113323>

Fitzgerald, P. J., Hale, P. J., Ghimire, A., y Watson, B. O. (2021b). Repurposing Cholinesterase Inhibitors as Antidepressants? Dose and Stress-Sensitivity May Be Critical to Opening Possibilities. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14(January). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.620119>

Flávia, A., Paulo, J., Andrade, D., Bevilaqua, L. R. M., Maria, M., Souza, D., Izquierdo, I., Teresinha, A., Ângelo, J., y Zuanazzi, S. (2006). Anxiolytic-

antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. 85, 148–154.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.027>

Fraser, M. D., Vallin, H. E., Davies, J. R. T., Rowlands, G. E., y Chang, X. (2021). Integrating Narcissus-derived galanthamine production into traditional upland farming systems. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81042-9>

García Cruz, K. P. (2017). Analisis químico y efecto citotóxico de extractos metanólicos y fracciones alcaloides de *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) sobre las líneas tumorales humanas HELA y SKLU-1 (p. 71).

González Diego, L. R. (2019). Actividad antiinflamatoria y perfil neurofarmacológico del *huitzquilitl* (*Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip., Asteraceae), una planta del Códice de la Cruz-Badiano. Tesis para obtener el grado de Bióloga. UNAM.

Greaves, P. (2012). Chapter 10 - Urinary Tract (P. B. T.-H. of P. T. S. (Fourth E. Greaves (ed.); pp. 537–614). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53856-7.00010-5>

Heike, V. (ed.). (2009). Malezas de México, *Zephyranthes fosteri*. Consultado en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amaryllidaceae/zephyranthes-fosteri/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>

Ibrakaw, A. S., Omoruyi, S. I., Ekpo, O. E., y Hussein, A. A. (2020). Neuroprotective Activities of *Boophone haemanthoides* (Amaryllidaceae) Extract and Its Chemical Constituents. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(22).
<https://doi.org/10.3390/molecules25225376>

Ishola, I. O., Olayemi, S. O., y Idowu, A. R. (2013). Anticonvulsant, anxiolytic and hypnotic of aqueous bulb extract of *crinum glaucum* A. Chev (Amaryllidaceae): Role of GABAergic and nitrenergic systems. *Pakistan Journal of Biological*

- Sciences, 16(15), 701–710. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.701.710>
- Jin, Z., y Yao, G. (2019). Amaryllidaceae and: Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 36(10), 1462–1488. <https://doi.org/10.1039/c8np00055g>
- Kenda, M., Kočevar Glavač, N., Nagy, M., y Sollner Dolenc, M. (2022). Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(18), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules27186021>
- Khalifa, M., Attia, E., Fahim, J., y Kamel, M. (2018). An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 41–49. <https://doi.org/10.21608/jabps.2018.4088.1016>
- Koutová, D., Maafi, N., Havelek, R., Opletal, L., Blunden, G., Řezáčová, M., y Cahlíková, L. (2020). Chemical and biological aspects of montanine-type alkaloids isolated from plants of the Amaryllidaceae family. *Molecules*, 25(10), 7–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25102337>
- Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (2013). *Robbins patología humana*. (Novena edi). Elsevier Health Science. <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001670886&lang=es&site=eds-live>
- Li, R. W., Palit, P., Smith, P. N., y Lin, G. D. (2021). Amaryllidaceae Alkaloids as Anti-inflammatory Agents Targeting Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: Mechanisms and Prospects. In S. C. Mandal, R. Chakraborty, & S. Sen (Eds.), *Evidence Based Validation of Traditional Medicines: A comprehensive Approach* (pp. 97–116). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8127-4_4
- Li, X., Yu, H. Y., Wang, Z. Y., Pi, H. F., Zhang, P., y Ruan, H. L. (2013). Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Fitoterapia*, 88,

82–90. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.006>

Linden, M., Ward, J. M., y Cherian, S. (2012). 19 - Hematopoietic and Lymphoid Tissues. In P. M. Treuting & S. M. B. T.-C. A. and H. Dintzis (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas* (pp. 309–338). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00019-6>

Martínez-Gordillo, M., Fragozo-Matínez, I., Valencia-Avalos, S., Cruz-Duran, R., Cristinas-Nizawa, S., Elías-González, M., Gines.Vázquez, L., Jiménez-Ramírez, J. (2014). *Atlas de las Familas de Angioespermas de México*. La prensa de Ciencias. México. pp. 64.

Martínez-Hernández, G. B., Jiménez-Ferrer, E., Román-Ramos, R., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., León-Rivera, I., Vargas-Villa, G., y Herrera-Ruiz, M. (2021). A mixture of quercetin 4'-O-rhamnoside and isoquercitrin from *Tilia americana* var. *mexicana* and its biotransformation products with antidepressant activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 267(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113619>

Martins, J., y Brijesh, S. (2018). Phytochemistry and pharmacology of antidepressant medicinal plants: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 104(May), 343–365. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.044>

Mathew, S., Faheem, M., Al-Malki, A., Kumosani, T. A., y Qadri, I. (2015). In silico inhibition of GABARAP activity using antiepileptic medicinal derived compounds. *Bioinformation*, 11(4), 189–195. <https://doi.org/10.6026/97320630011189>

Moragrega, I. S., y Ríos, J. L. (2021). Medicinal Plants in the Treatment of Depression: Evidence from Preclinical Studies. *Planta Medica*, 87(9), 656–685. <https://doi.org/10.1055/a-1338-1011>

Nair, J. J., y van Staden, J. (2022). Boophone, Nerine, Brunsvigia, Strumaria and

Crossyne in biological studies of the South African Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany*, 146, 695–702.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.030>

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023). PubChem Compound Summary for CID 72378, Lycorine. Consultado en 20/09/2023
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lycorine>.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)- (2023). PubChem Compound Summary for CID 3016, Diazepam. Consultado en 20/09/2023
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diazepam>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3696, Imipramine. Consultado en 19/09/2023
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imipramine>.

NOM. (1999). Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In *Diario Oficial de la Federación*.

OECD. (2002). Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures.
<https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264078475-en>

OECD. (2001). Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. In *Oecd Guideline for Testing of Chemicals (Issue December)*.

Onishi, Y., Kawano, Y., y Yamazaki, Y. (2012). Lycorine, a candidate for the control of period length in mammalian cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29(3–4), 407–416. <https://doi.org/10.1159/000338495>

Pagliosa, L. B., Monteiro, S. C., Silva, K. B., de Andrade, J. P., Dutilh, J., Bastida, J., Cammarota, M., y Zuanazzi, J. A. S. (2010). Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, 17(8–9), 698–701.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003>

- Pan American Health Organisation (PAHO). (2015). Anxiety disorders. Anxiety Disorders. <https://www.paho.org/en/noncommunicable-diseases-and-mental-health/noncommunicable-diseases-and-mental-health-data-portal-2>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Porsolt, R. D., Bertin, A., y Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 229(2), 327–336.
- Pote, W., Musarira, S., Chuma, D., Gadaga, L. L., Mwandiringana, E., y Tagwireyi, D. (2018). Effects of a hydroethanolic extract of *Boophone disticha* bulb on anxiety-related behaviour in naive BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 214, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.001>
- Ren, L., Zhao, H., & Chen, Z. (2014). Study on pharmacokinetic and tissue distribution of lycorine in mice plasma and tissues by liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 119, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.014>
- Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Campos-Lara, M., Bejar, E., Osuna-Fernández, H. R., y Hernández-Pasteur, G. (2020). On the first book of medicinal plants written in the american continent: The libellus medicinalibus indorum herbis from mexico, 1552. a review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 20(1), 1–27. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.1.1>
- Rogers, A. B., y Dintzis, R. Z. (2018). 13 - Hepatobiliary System (P. M. Treuting, S. M. Dintzis, & K. S. B. T.-C. A. and H. (Second E. Montine (eds.); pp. 229–

239). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00013-0>

Ross, M. H., Pawlina, W., Alday, A., y Ross, M. H. (2015). *Histología : texto y atlas correlación con biología molecular y celular*. (7.a edición). Wolters Kluwer. <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001002106879&lang=es&site=eds-live>

Sadock, Benjamin, James; Sadock, Virginia, Alcott; Ruiz, P. (2015). *Sinopsis de psiquiatría* (11th ed.). Wolters Kluwer.

Saltan Çitoğlu, G., Bahadır Acikara, O., Sever Yilmaz, B., y Özbek, H. (2012). Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia*, 83(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.09.008>

Samad, N., y Saleem, A. (2018). Administration of *Allium cepa* L. bulb attenuates stress-produced anxiety and depression and improves memory in male mice. *Metabolic Brain Disease*, 33(1), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0159-1>

Schimmel, K., Jung, M., Foinquinos, A., José, G. S., Beaumont, J., Bock, K., Grote-Levi, L., Xiao, K., Bär, C., Pfanne, A., Just, A., Zimmer, K., Ngoy, S., López, B., Ravassa, S., Samolovac, S., Janssen-Peters, H., Remke, J., Scherf, K., Thum, T. (2020). Natural compound library screening identifies new molecules for the treatment of cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Circulation*, 751–767. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042559>

Shi, X., Bai, H., Wang, J., Wang, J., Huang, L., He, M., Zheng, X., Duan, Z., Chen, D., Zhang, J., Chen, X., y Wang, J. (2021). Behavioral Assessment of Sensory, Motor, Emotion, and Cognition in Rodent Models of Intracerebral Hemorrhage. *Frontiers in Neurology*, 12(June). <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.667511>

- Stafford, G. I., Birer, C., Brodin, B., Christensen, S. B., Eriksson, A. H., Jäger, A. K., y Rønsted, N. (2013). Serotonin transporter protein (SERT) and P-glycoprotein (P-gp) binding activity of montanine and coccinine from three species of *Haemanthus* L. (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany*, 88, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.002>
- Stafford, Gary I., Pedersen, M. E., van Staden, J., y Jäger, A. K. (2008). Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 513–537. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.010>
- Suvarna, K. S., y Layton, C. (2013). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. (Seventh ed). Churchill Livingstone. <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001002027774&lang=es&site=eds-live>
- Taiwe, G. S., Tchoya, T. B., Menanga, J. R., Dabole, B., y De Waard, M. (2016). Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.023>
- Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M. P., Brix, A. E., Singh, B., Belpoggi, F., y Ward, J. M. (2010). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicologic Pathology*, 38(7 SUPPL.), 5–81. <https://doi.org/10.1177/0192623310386499>
- Ugalde, M., Reza, V., González-Trujano, M. E., Avula, B., Khan, I. A., y Navarrete, A. (2010). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic

extract in mice* . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(5), 631–639.
<https://doi.org/10.1211/0022357056000>

Wang, H. Y., Qu, S. M., Wang, Y., & Wang, H. T. (2018). Cytotoxic and anti-inflammatory active plicamine alkaloids from *Zephyranthes grandiflora*. *Fitoterapia*, 130(September), 163–168.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.08.029>

World Health Organization. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates*. World Health Organization.

World Health Organization. (2021). Depresión. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>

World Health Organization. (2022). Mental disorders. Fact Sheets.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>

Xiao, H., Xu, X., Du, L., Li, X., Zhao, H., Wang, Z., Zhao, L., Yang, Z., Zhang, S., Yang, Y., y Wang, C. (2022). Lycorine and organ protection: Review of its potential effects and molecular mechanisms. *Phytomedicine*, 104(February), 154266. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154266>

Yeung, K. S., Hernandez, M., Mao, J. J., Haviland, I., y Jyothirmai, G. (2018). Herbal Medicine for Depression and Anxiety: A Systematic Review with Assesment of Potential Psycho-Onchologic Relevance. *Phytotherapy Research*, 32(5), 865–891. <https://doi.org/10.1002/ptr.6033>.Herbal

Zhou, J., Liu, Z., Wang, S., Li, J., Li, Y., Chen, W. K., y Wang, R. (2020). Fungal endophytes promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids in *Lycoris radiata*. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1421–1434.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14958>

Zhu, Q., Zhuang, X. Xu, Chen, J. Yue, Yuan, N. Ning, Chen, Y., Cai, C. Zan, Tan, J. Qiong, Su, H. Xing, y Lu, J. Hong. (2021). Lycorine, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein via PKA-mediated UPS

activation in transgenic Parkinson's disease models. *Phytomedicine*,
87(March), 153578. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153578>

ANEXO 1

Zona y permiso de Colecta

Los ejemplaros utilizados para elaborar el EMZF y el extracto alcaloideo fueron colectados en la zona arqueológica de Cuicuilco en la CDMX, la cual se encuentra cerca del Pedregal de San Ángel y presenta condiciones similares.

A continuación, se anexan los documentos de solicitud de permiso de colecta.

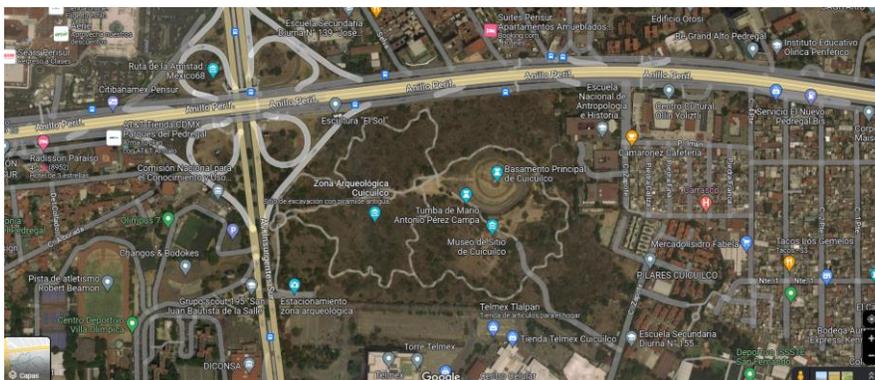


Figura 24. Zona arqueológica de Cuicuilco.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
CÓDIGO POSTAL 04510
CIUDAD UNIVERSITARIA
CIUDAD DE MÉXICO

México DF a 6 de Mayo de 2021

Arqueólogo Ramón López Valenzuela
Responsable Administrativo
Zona Arqueológica Cuicuilco

PRESENTE

Por este conducto me dirijo a usted para solicitar autorización para entrar a la Zona Arqueológica Cuicuilco que se encuentra a su cargo, con el fin de explorar y coleccionar ejemplares de las plantas *Zephyranthes fosteri* y *Habranthus concolor*, conocidas popularmente como mayitos. Estas especies se encuentran distribuidas en la vegetación típica del pedregal que se encuentra en el camino que lleva a la pirámide y sobre la pirámide. Estas plantas florecen en Mayo con las primeras lluvias, sin embargo, la floración sólo dura 3 días en promedio por individuo. El objetivo de la colecta es estudiar química y farmacológicamente a estas plantas, todo esto como parte del proyecto de maestría de la alumna Rebeca García Hernández (Anexo un resumen) del Posgrado de Ciencias de Biológicas de la UNAM. Además se coleccionarán ejemplares para estudiar su morfología, lo que forma parte del proyecto de tesis de licenciatura de la alumna Ana Keren Alva Sandoval (Anexo un resumen) de la Facultad de Ciencias, también de la UNAM.

El día propuesto para la colecta es el miércoles 12 de Mayo en un horario de 10:00 14:00 h. El permiso de entrada es para las siguientes personas y una servidora:

M .en C. Lucia Yoscelina Centeno Betanzos (Experta en las especies)
Rebeca García Hernández
Ana Keren Alva Sandoval

Sin otro particular le agradezco su atención prestada a esta solicitud, quedando a su disposición.

Atentamente

Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez
Catedrática CONACyT-Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM
Tel. 5529156943

Figura 25. Solicitud de permiso de colecta.



Rebeca García Hernández <becagh97@gmail.com>

Fwd: Solicitud de autorización de entrada al área arqueológica

Dra. S. Laura Guzmán Gutiérrez <laura.guzman@iibiomedicas.unam.mx>

28 de agosto de 2023, 11:11

Para: Rebeca García Hernández <becagh97@gmail.com>

----- Forwarded message -----

De: Cuicuilco INAH <cuicuilco1985@gmail.com>

Date: jue, 6 may 2021 a las 14:44

Subject: Re: Solicitud de autorización de entrada al área arqueológica

To: Dra. S. Laura Guzmán Gutiérrez <laura.guzman@iibiomedicas.unam.mx>

Estimada Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez

Le comento qué no hay inconveniente en que se realice dicho muestreo. Solo le pediría de favor, que portarán algún distintivo, ya que temporalmente y derivado de la pandemia, la zona arqueológica solo está operando de miércoles a viernes a la visita pública y con áreas restringidas. Para que así, el personal de seguridad los identifique y se puedan mover, si así lo requieren, por las áreas restringidas que normalmente están en operación.

El día que nos visiten, le comentan al oficial del acceso a lo que vienen para que se les permita el acceso.

No está por demás mencionar, que en el ingreso hay que cumplir con un filtro sanitario y portar cubrebocas todo el tiempo que duré su visita.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

Arqueólogo Ramón López Valenzuela

Responsable administrativo de la zona arqueológica y museo de sitio Cuicuilco-INAH

Insurgentes Sur s/n esq. Periférico, Col. Isidro Fabela, Alcaldía Tlalpan, CP. 14030.

Ciudad de México Tels. 55 5606 9758 - 55 5171 5003

"De acuerdo con los Lineamientos emitidos por la Secretaría de la Función Pública y publicados en el DOF el 17 de abril de 2020, relativos al uso del correo institucional como medio de notificación, agradeceré se sirva acusar de recibido y en su caso confirmar la correcta recepción del archivo(s) adjunto(s).

[El texto citado está oculto]

Figura 26. Permiso de Colecta.

ANEXO 2

Compuestos detectados por CG-EM en el EMZF

Cuadro 10. Composición del EMZF obtenida por CG-EM. El compuesto más abundante se marca en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	RT	Abundancia relativa (%)
Alanina, n-propargiloxicarbonil-hexil ester	3.40	2.35
1-Butanol, 2-metil acetato	3.59	4.04
Glicerina	3.84	4.07
4H-piran-4,1,2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil	4.04	2.06
5-hidroximetilfuran	4.68	2.06
1,2,3-Propanetril,1-acetato	4.81	1.93
	5.08	1.65
	5.82	3.03
Sacarosa	6.51	41.93
	6.94	3.51
	7.38	1.39
	7.91	7.27
	8.26	4.83
Ácido hexadecanoico, metil ester	12.63	1.65
Ácido hexadecanoico	13.11	1.61
9,15-ácido octadecanoico, metil ester	15.35	1.43
2-metilbiciclo [3,2,1]octano	15.90	1.43
	17.85	1.55
	24.69	1.48
Licorina	25.24	6.23
2-Hidroxihomolicorina	28.79	1.36
	31.76	2.65

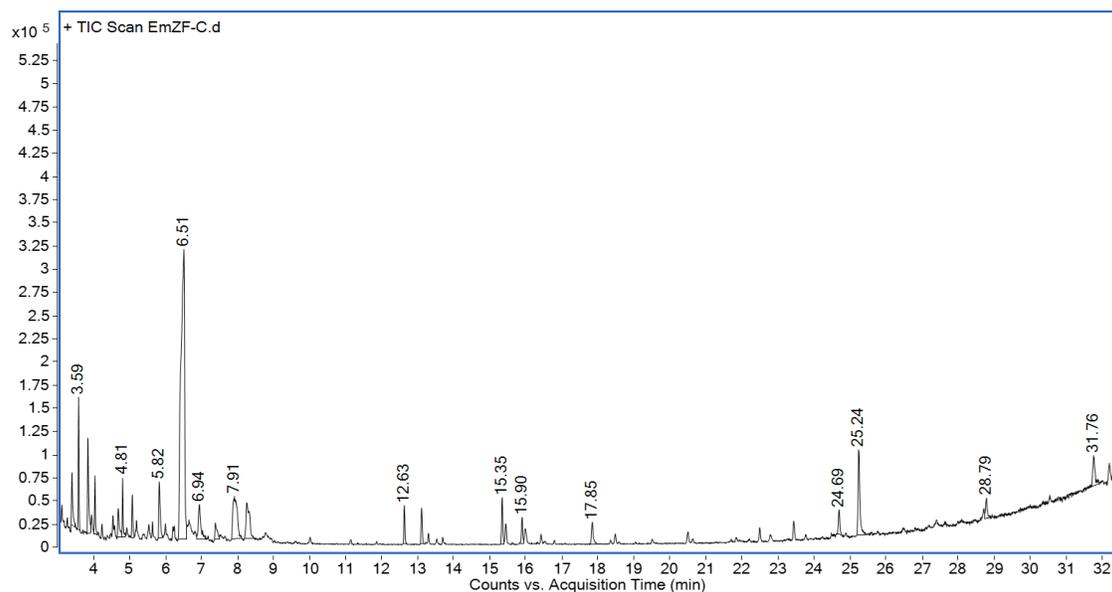


Figura 27. Cromatograma del EMZF obtenido por CG-EM.

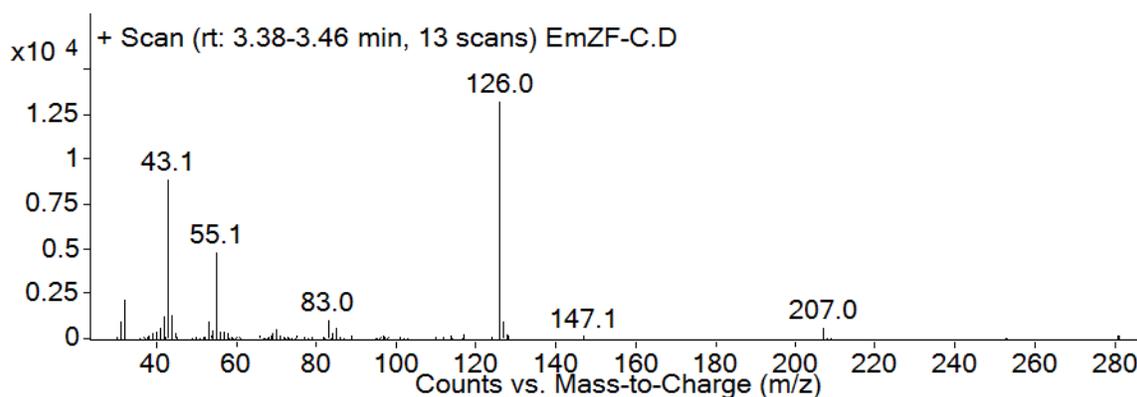


Figura 28. Espectro de masas correspondiente a Alanina, n-propargiloxycarbonil-hexil ester en el tiempo de retención 3.40 del EMZF.

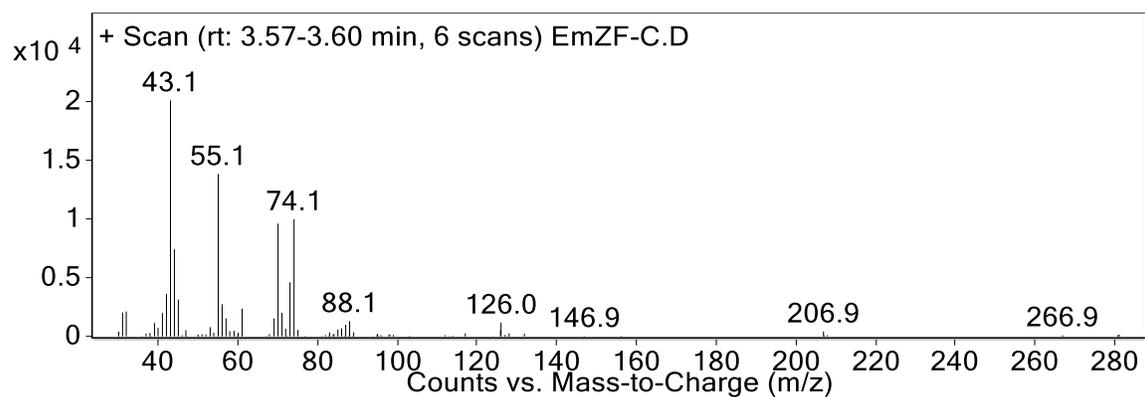


Figura 29. Espectro de masas correspondiente a 1-butanol, 2-metil acetato en el tiempo de retención 3.59 del EMZF.

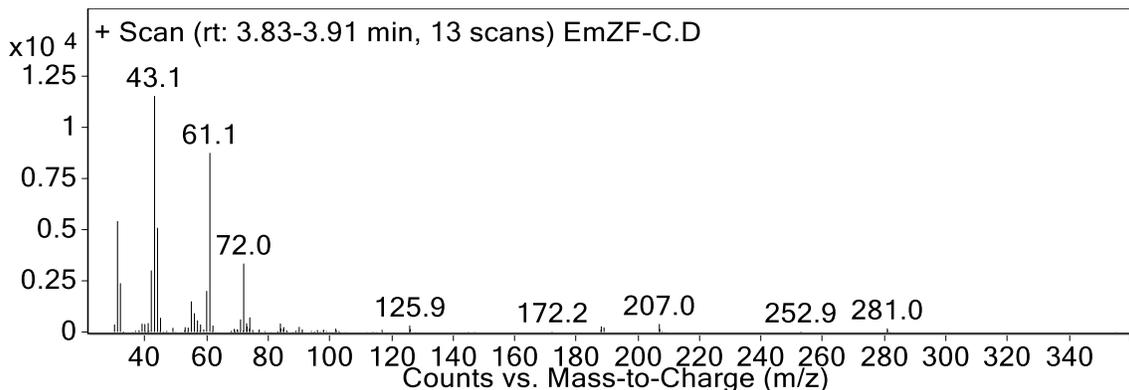


Figura 30. Espectro de masas correspondiente a glicerina en el tiempo de retención 3.84 del EMZF.

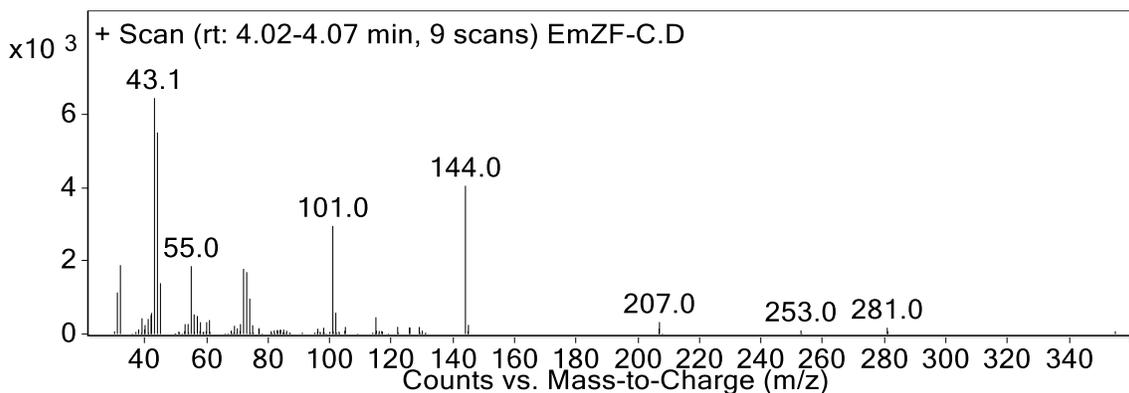


Figura 31. Espectro de masas correspondiente a 4H-piran-4,1,2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil en el tiempo de retención 4.04 del EMZF.

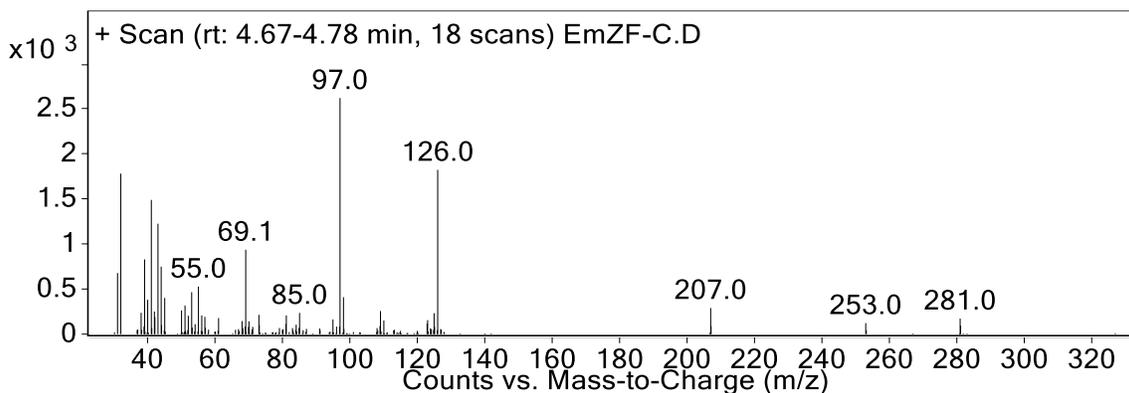


Figura 32. Espectro de masas correspondiente a 5-hidroximetilfurfural en el tiempo de retención 4.68 del EMZF.

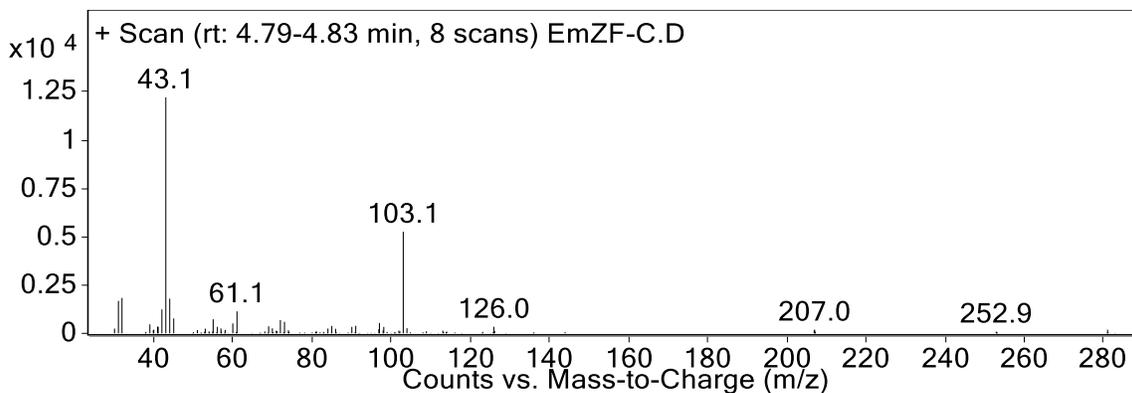


Figura 33. Espectro de masas correspondiente a 1,2,3-propanetрил,1-acetato pico en el tiempo de retención 4.81 del EMZF.

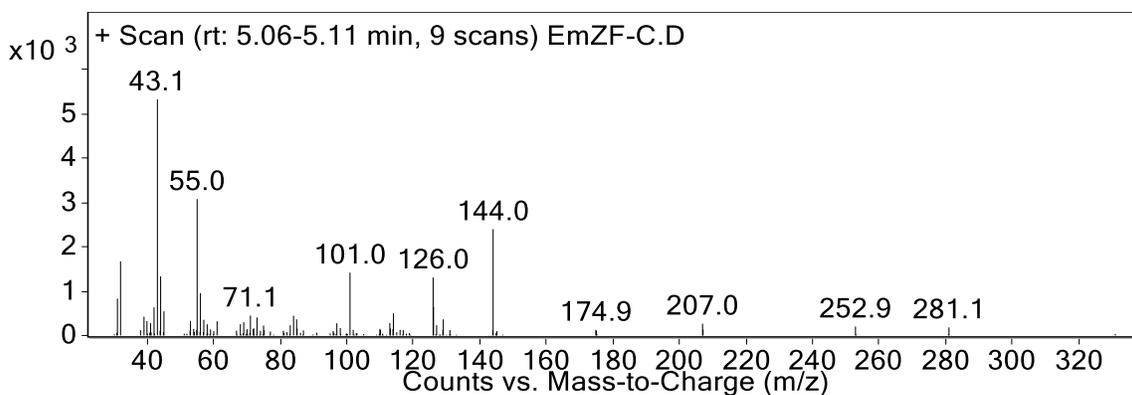


Figura 34. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 5.08 del EMZF.

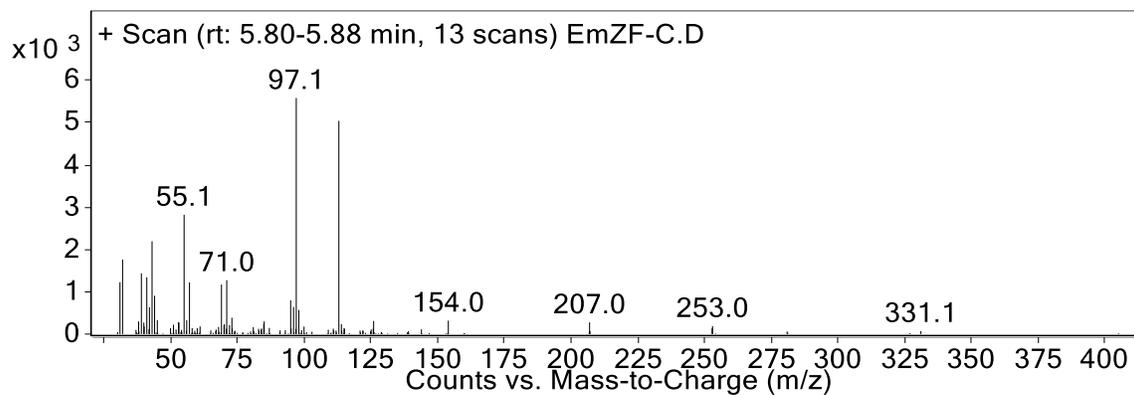


Figura 35. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 5.82 del EMZF.

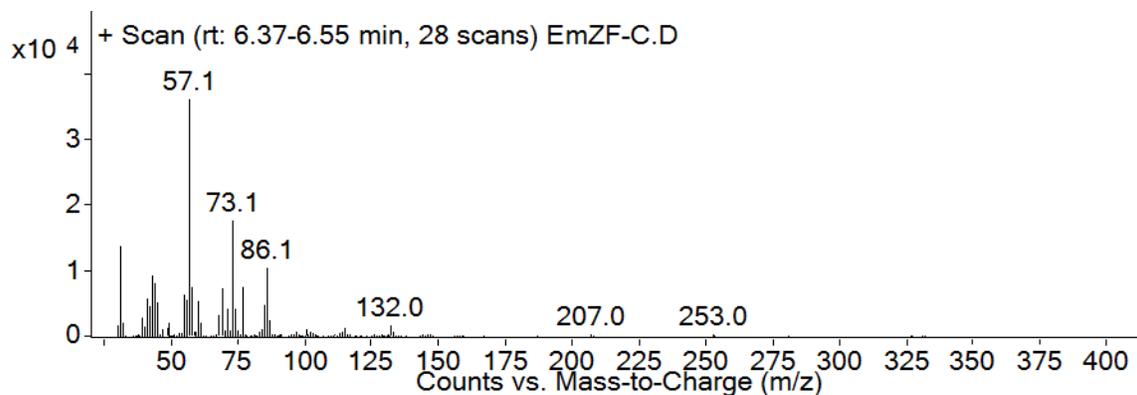


Figura 36. Espectro de masas correspondiente a sacarosa en el tiempo de retención 6.51 del EMZF.

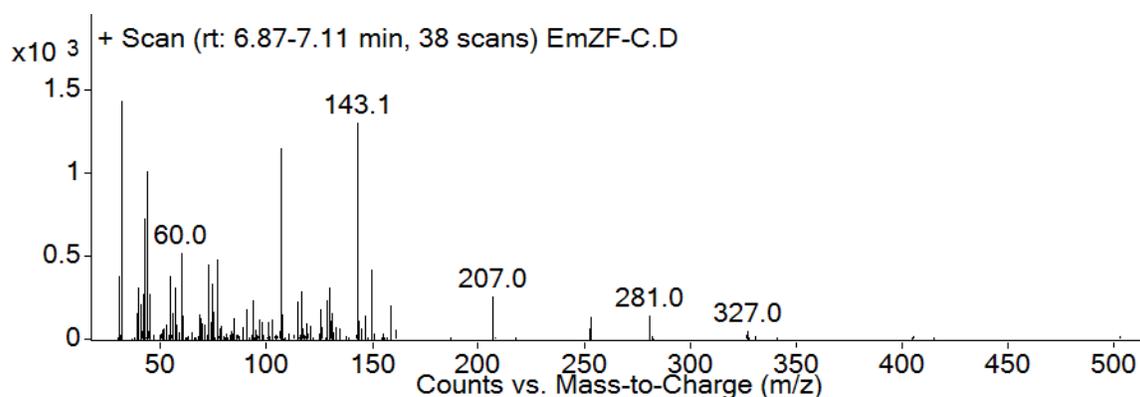


Figura 37. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 6.94 del EMZF.

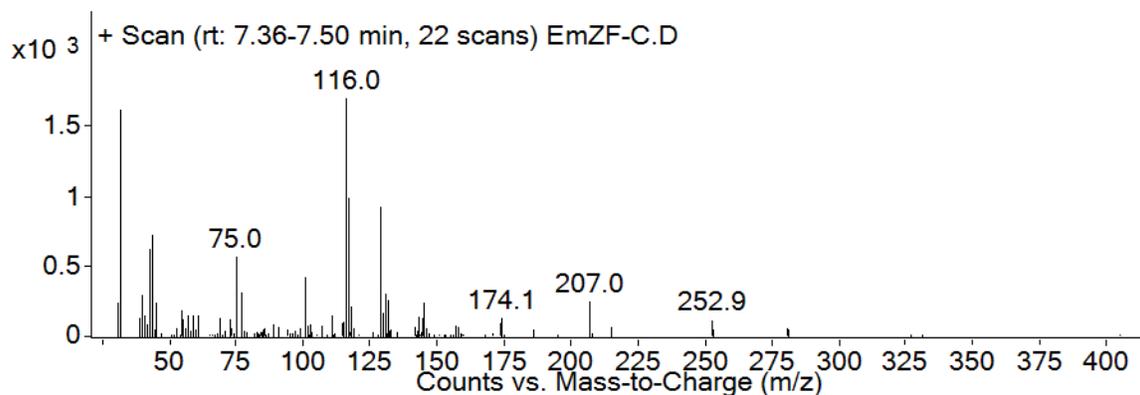


Figura 38. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 7.38 del EMZF.

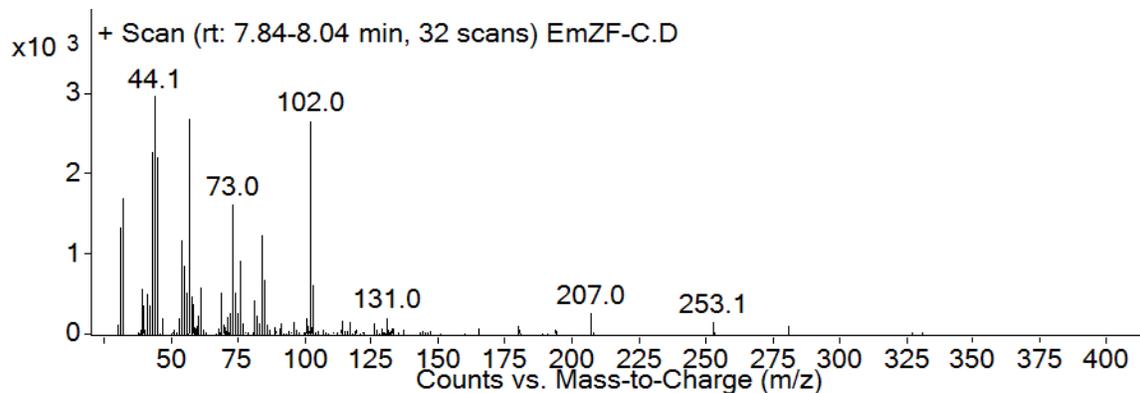


Figura 39. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 7.91 del EMZF.

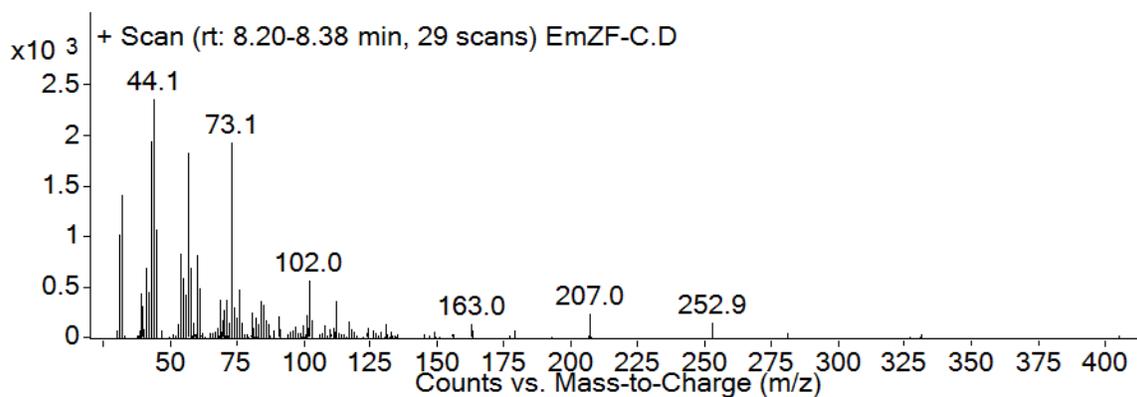


Figura 40. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 8.26 del EMZF.

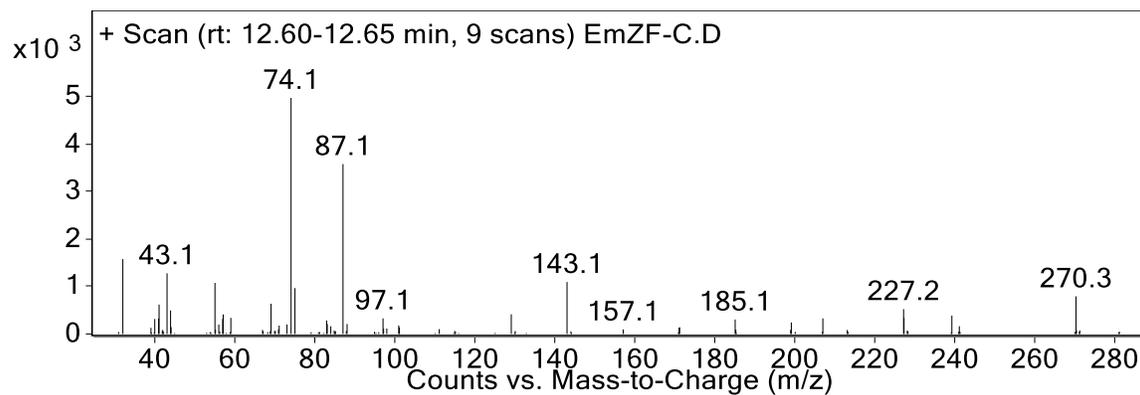


Figura 41. Espectro de masas correspondiente al ácido hexadecanoico, metil ester en el tiempo de retención 12.63 del EMZF.

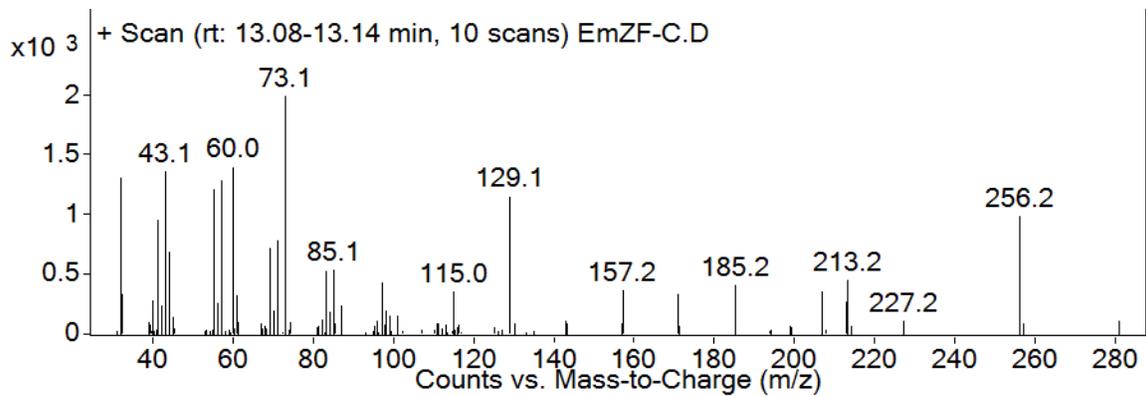


Figura 42. Espectro de masas correspondiente al ácido hexadecanoico en el tiempo de retención 13.11 del EMZF.

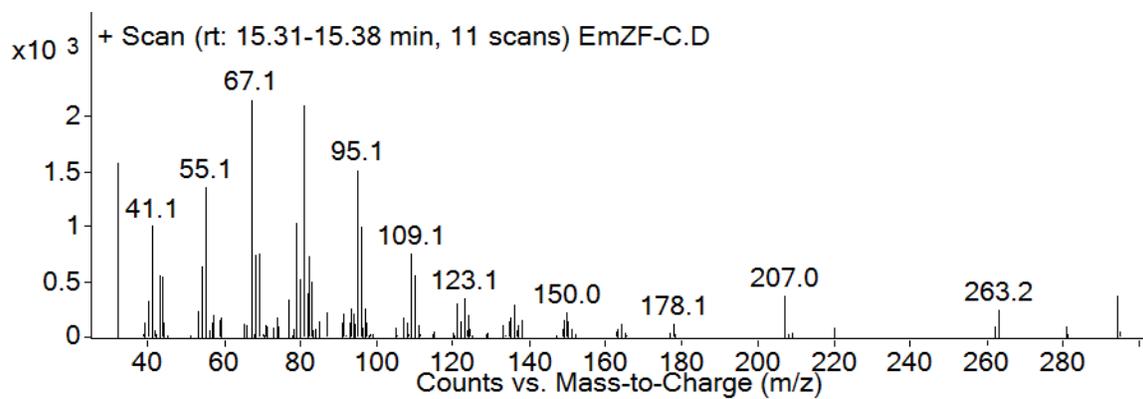


Figura 43. Espectro de masas correspondiente al 9,15-ácido octadecanoico, metil ester en el tiempo de retención 15.35 del EMZF.

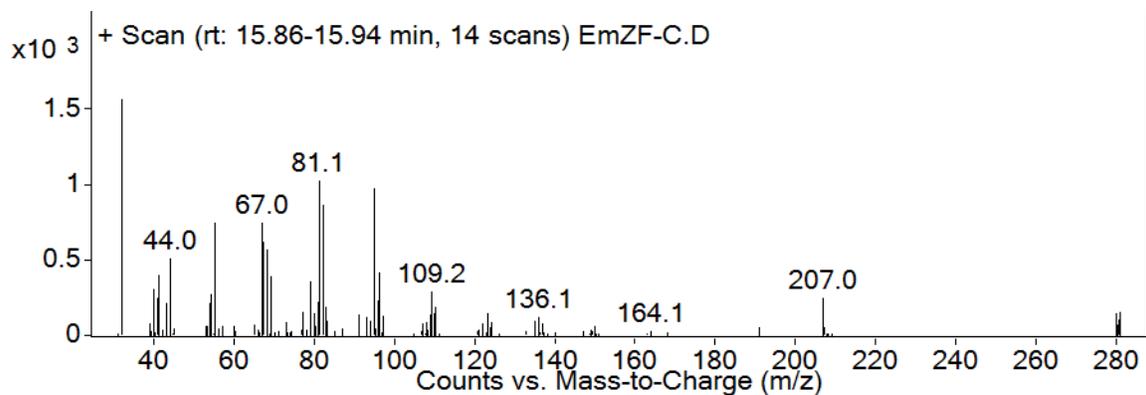


Figura 44. Espectro de masas correspondiente al 2-metilbicyclo [3,2,1]octano en el tiempo de retención 15.90 del EMZF.

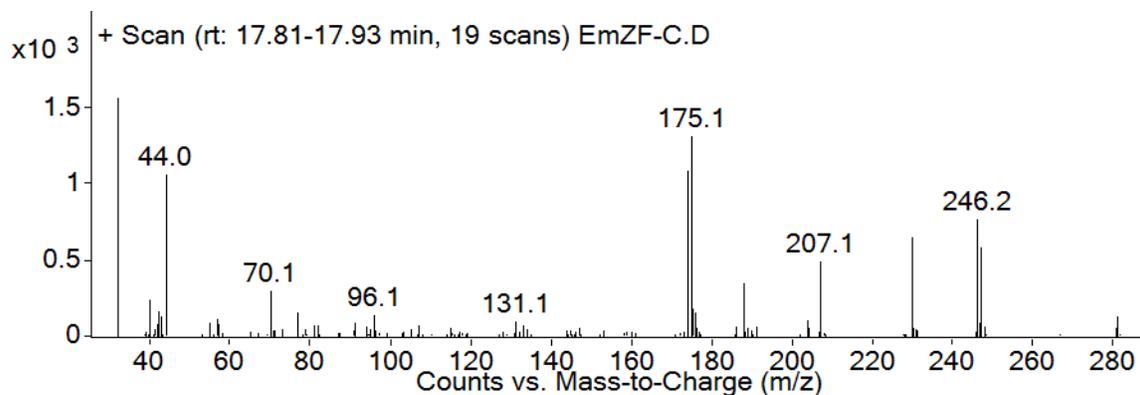


Figura 45. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 17.85 del EMZF.

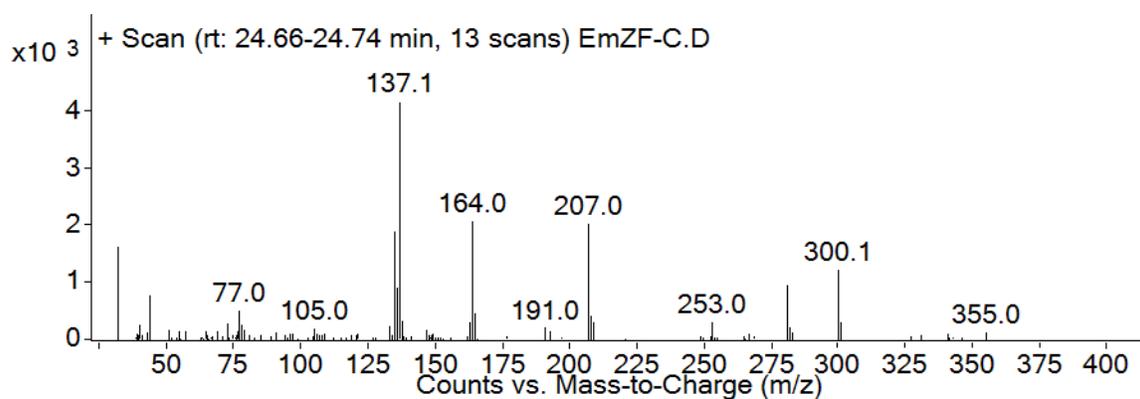


Figura 46. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 24.69 del EMZF.

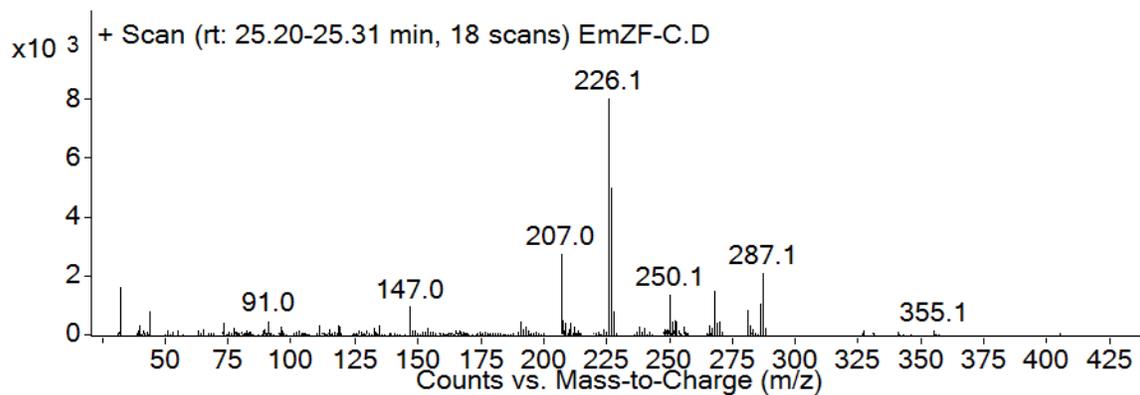


Figura 47. Espectro de masas correspondiente a la licorina en el tiempo de retención 25.24 del EMZF.

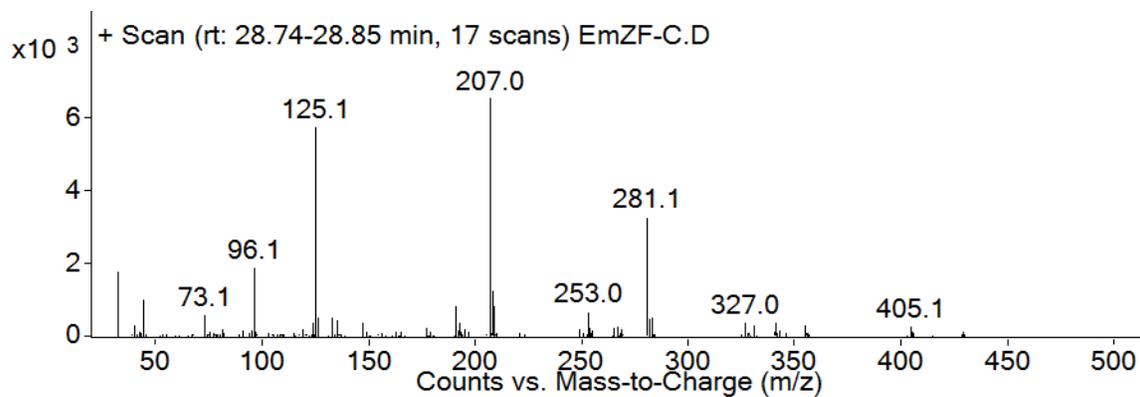


Figura 48. Espectro de masas correspondiente a la 2-hidroxiomolicorina en el tiempo de retención 28.79 del EMZF.

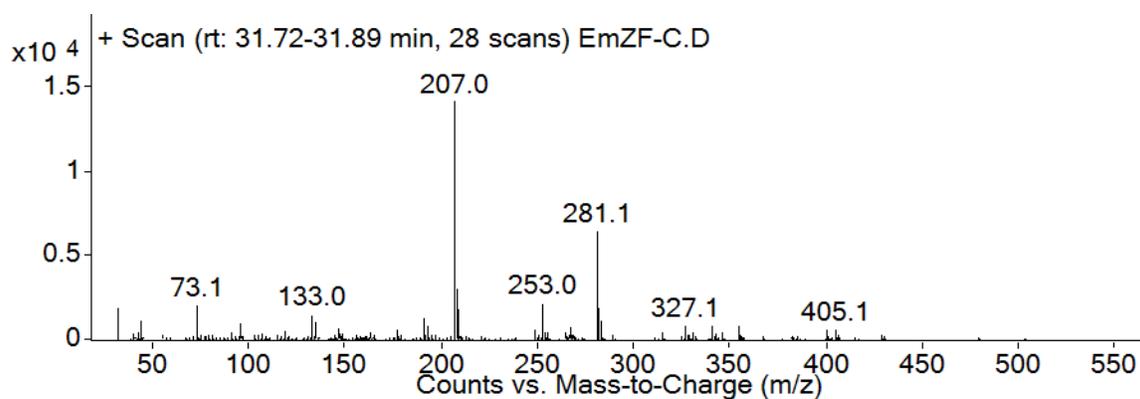


Figura 49. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 31.76 del EMZF.

ANEXO 3

Compuestos detectados por CG-EM en la FO2

Cuadro 11. Composición de la FO2 obtenida por CG-EM. El compuesto más abundante se marca en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	RT	Abundancia relativa (%)
1-Butanol,2-metil-acetato	3.69	0.66
Paradrina	6.82	0.39
	6.94	0.19
	18.12	7.28
Licoramina	20.80	4.08
1,2,3,12,15,16-hexadehidro-9,10-metoxi-galatan	22.00	1.03
	22.23	0.94
7,1-metil-9,10-metoxi-licorenano	22.51	1.31
	23.56	0.34
O-2-metilpancracina (montanina)	23.74	8.42
	24.06	0.63
	24.21	1.13
O-2-metil licorina (Hippamina)	24.54	2.59
Heptacosano	24.91	0.32
	25.11	0.24
Licorina	25.60	66.48
	26.32	0.19
	26.82	0.33
Hippeastrina	27.20	0.33
Licorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10-[metilenebis(oxi)]	27.47	1.59
	27.69	1.21
	28.44	0.34

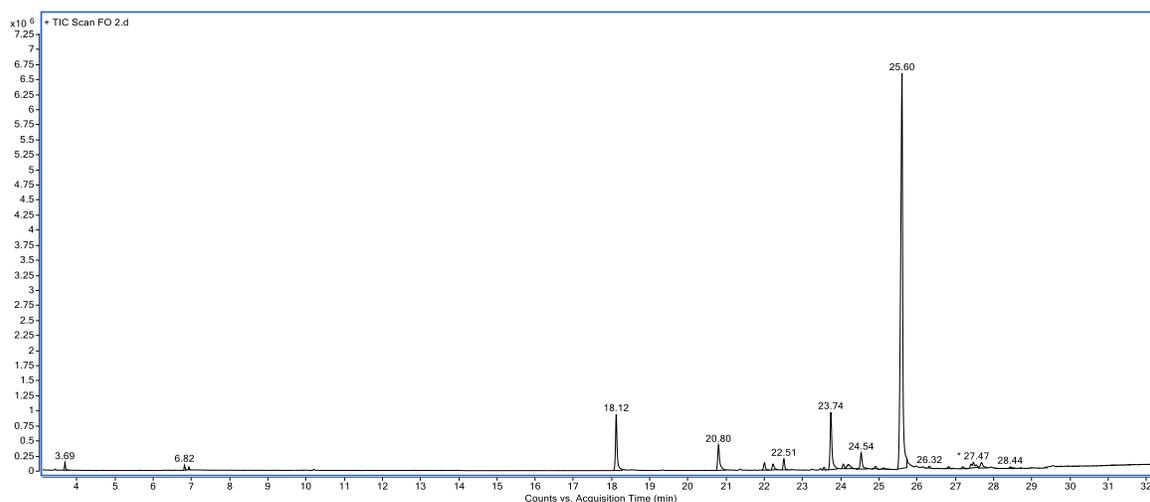


Figura 50. Cromatograma de la FO2 de *Zephyranthes fosteri* obtenido por CG-EM.

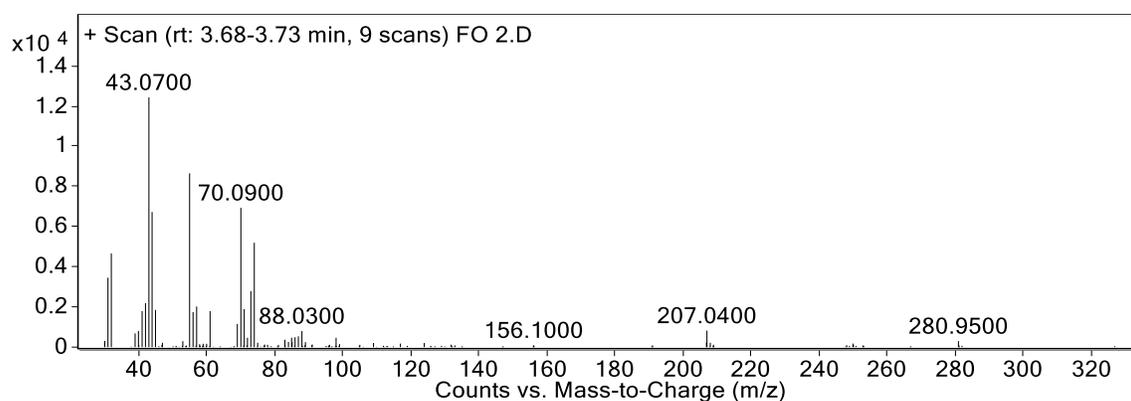


Figura 51. Espectro de masas correspondiente a 1-butanol, 2-metil-acetato en el tiempo de retención 3.69 de la FO2.

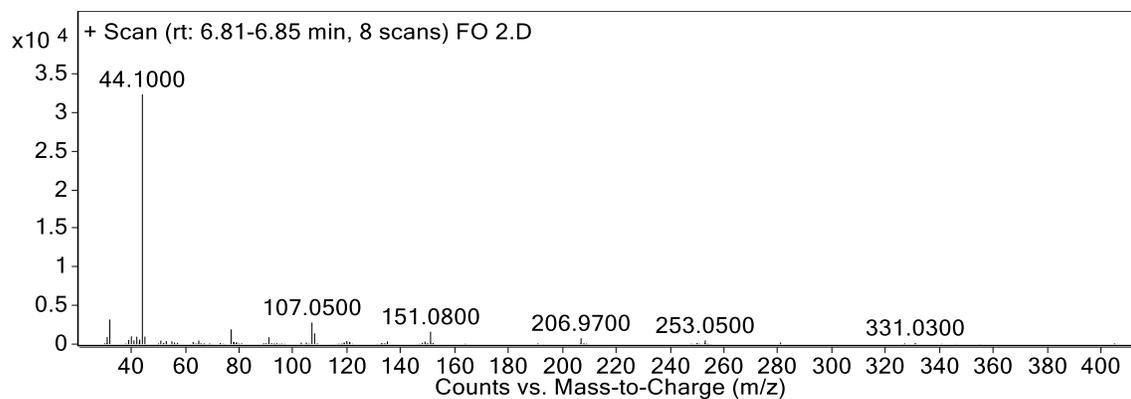


Figura 52. Espectro de masas correspondiente a paradrine en el tiempo de retención 6.82 de la FO2.

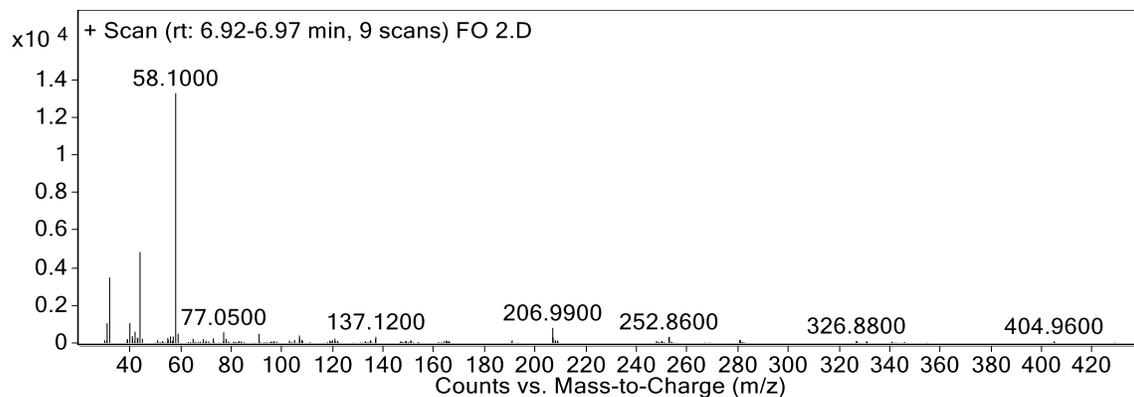


Figura 53. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 6.94 de la FO2.

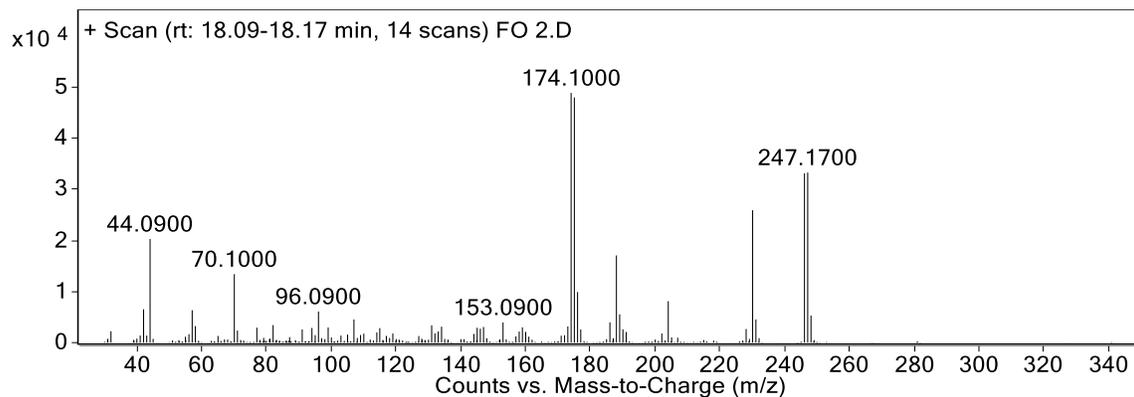


Figura 54. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 18.12 de la FO2.

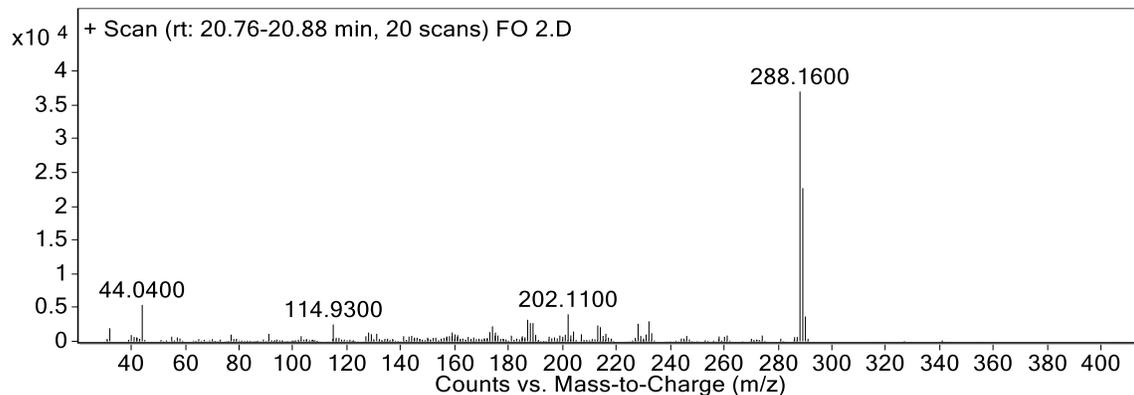


Figura 55. Espectro de masas correspondiente a licoramina en el tiempo de retención 20.80 de la FO2.

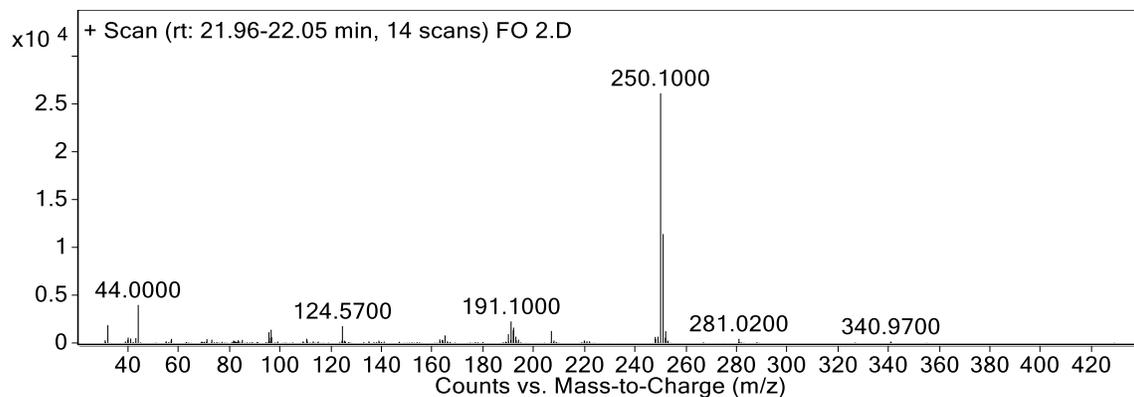


Figura 56. Espectro de masas correspondiente 1,2,3,12,15,16-hexadecahidro-9,10-metoxi-galatan en el tiempo de retención 22.00 de la FO2.

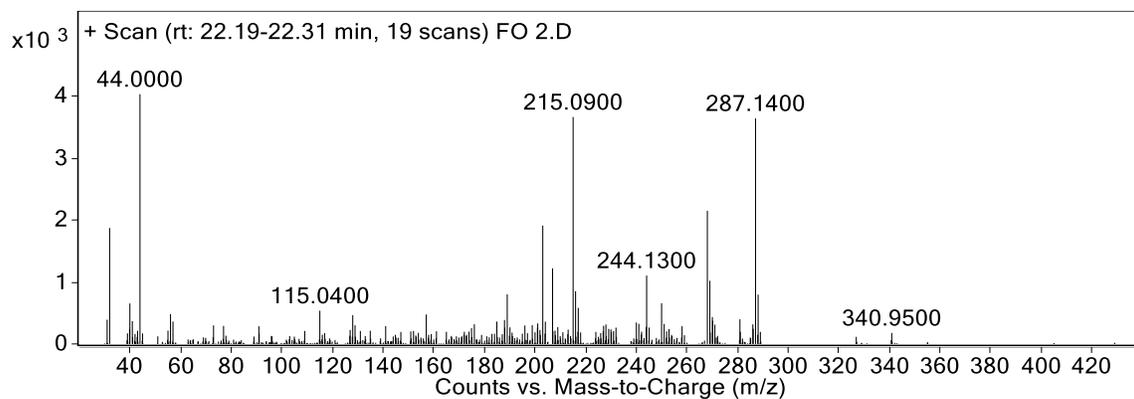


Figura 57. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 22.23 de la FO2.

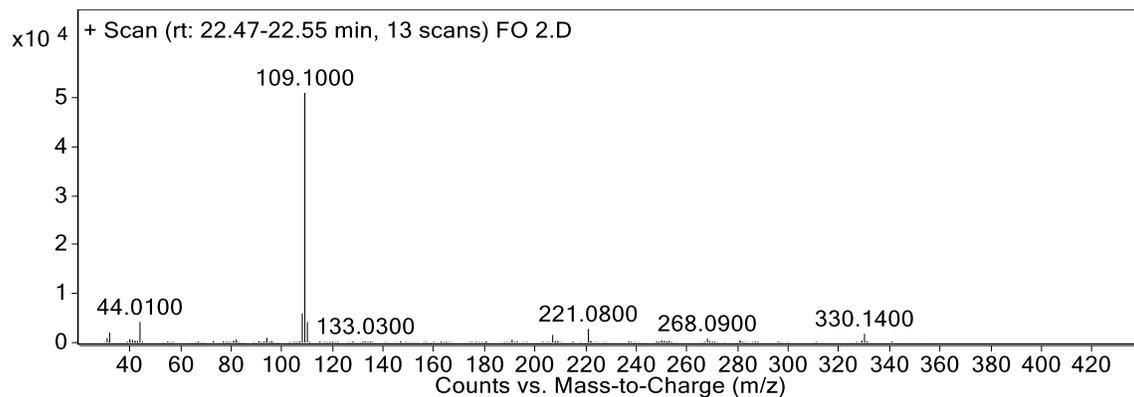


Figura 58. Espectro de masas correspondiente a 7,1-metil-9,10-metoxi-licorenano en el tiempo de retención 22.51 de la FO2.

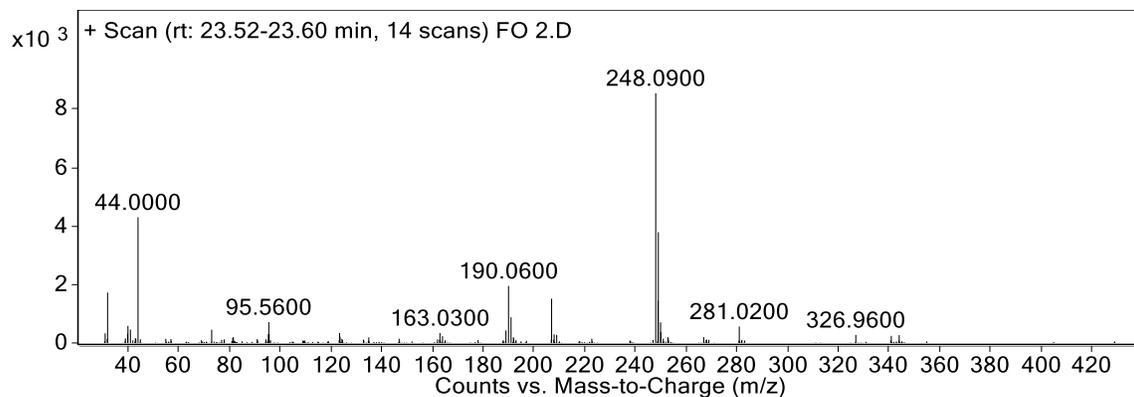


Figura 59. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 23.56 de la FO2.

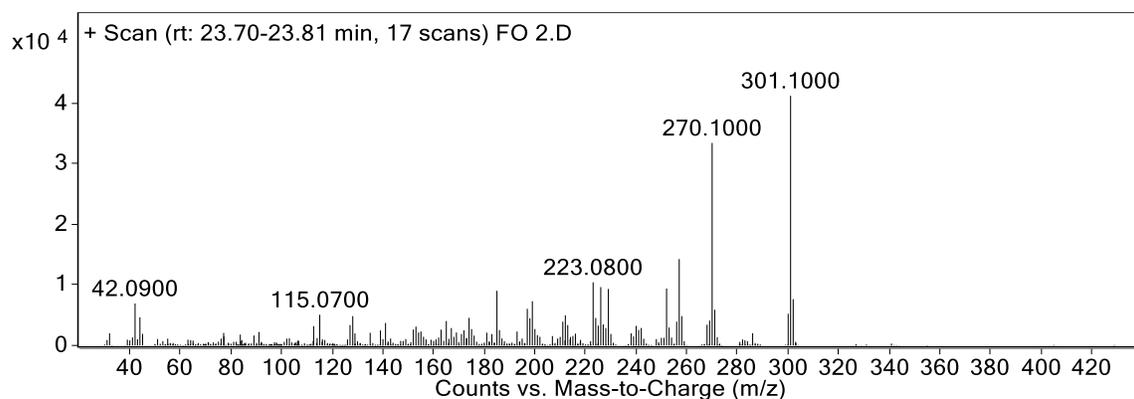


Figura 60. Espectro de masas correspondiente a O-2-metilpancracina (montanina) en el tiempo de retención 23.74 de la FO2.

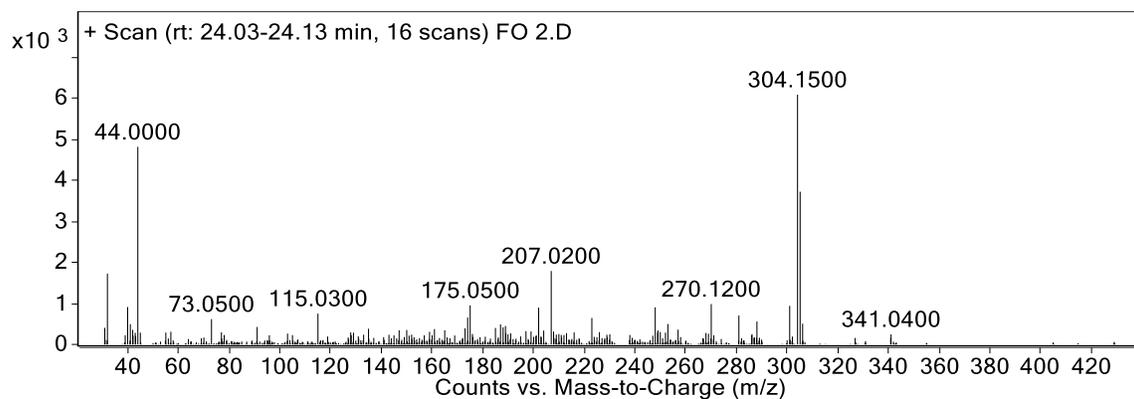


Figura 61. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 24.06 de la FO2.

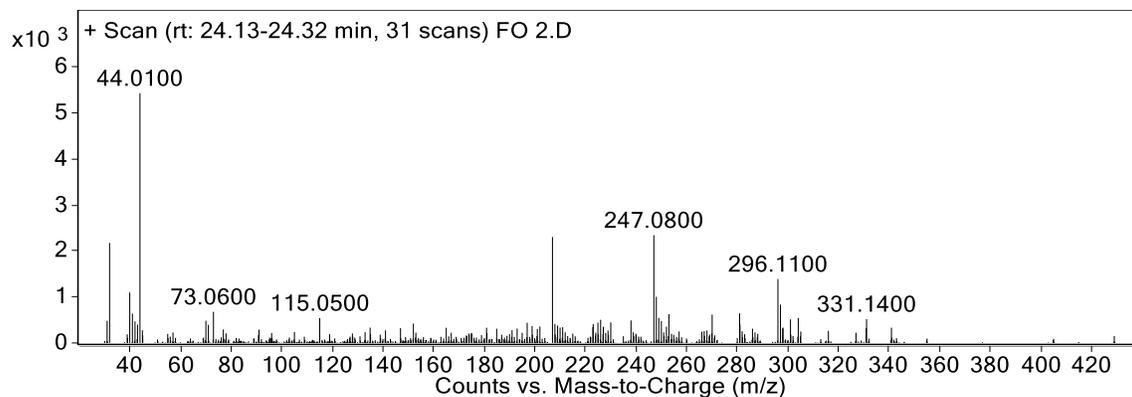


Figura 62. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 24.21 de la FO2.

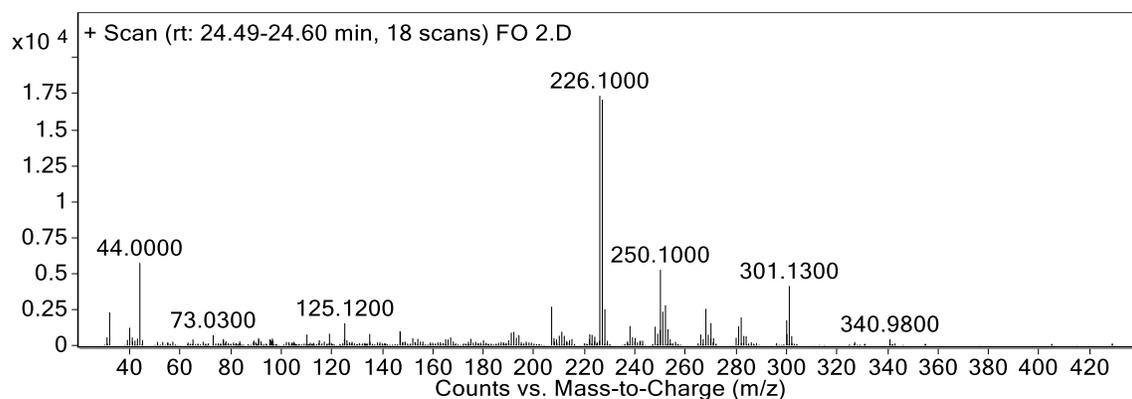


Figura 63. Espectro de masas correspondiente a O-2metil-licorina (hippamina) en el tiempo de retención 24.54 de la FO2.

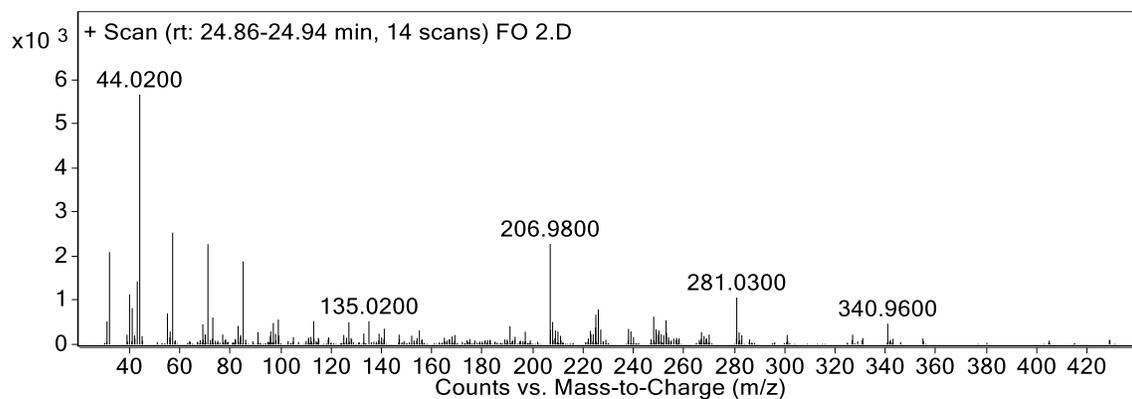


Figura 64. Espectro de masas correspondiente a heptacosano en el tiempo de retención 24.91 de la FO2.

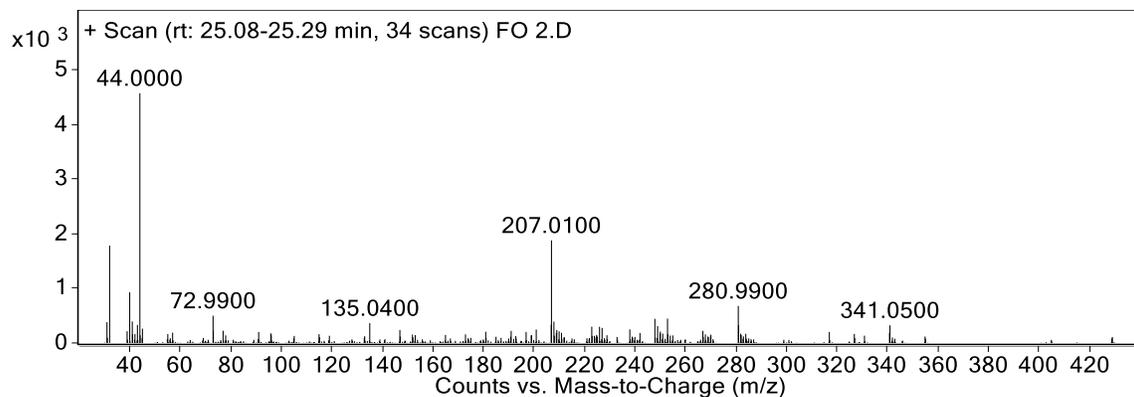


Figura 65. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 25.11 de la FO2.

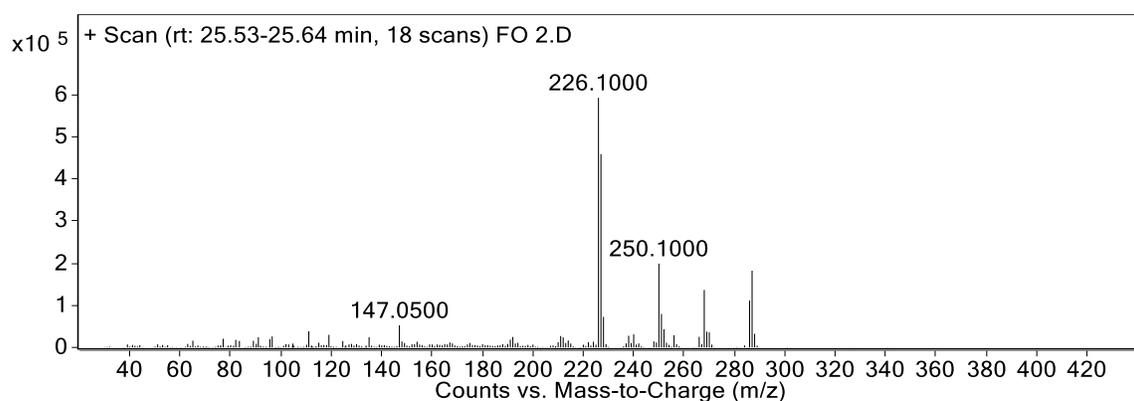


Figura 66. Espectro de masas correspondiente a la licorina en el tiempo de retención 25.60 de la FO2.

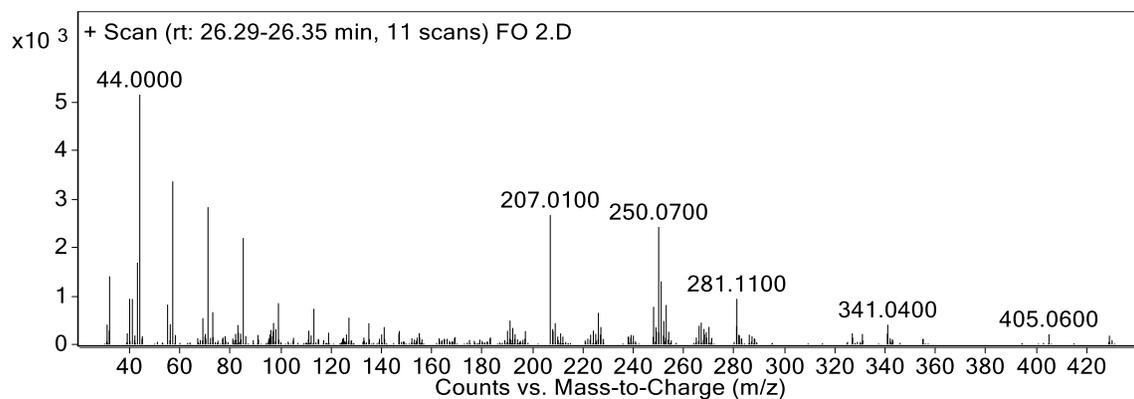


Figura 67. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 26.32 de la FO2.

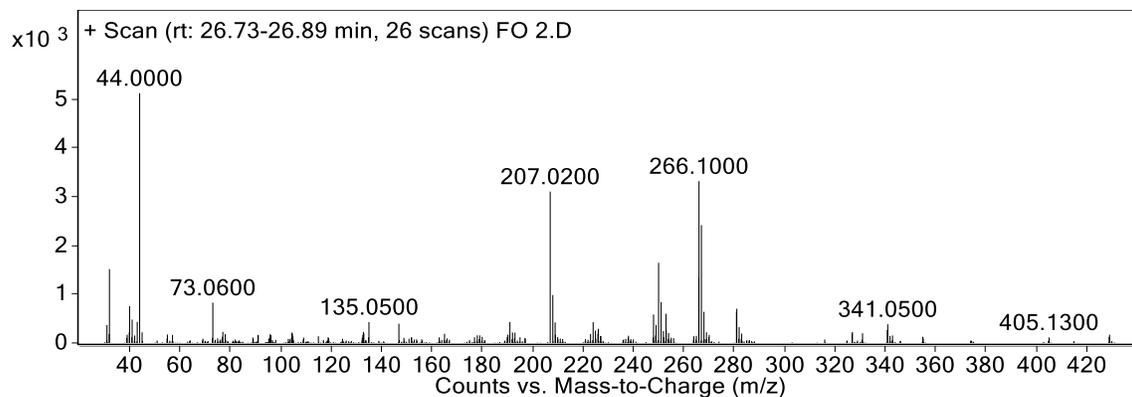


Figura 68. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 26.82 de la FO2.

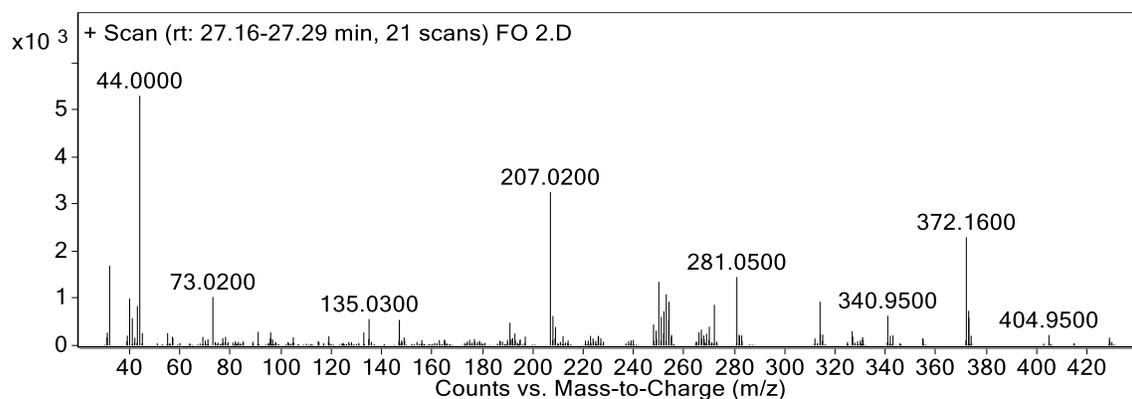


Figura 69. Espectro de masas correspondiente a hippeastrina en el tiempo de retención 27.20 de la FO2.

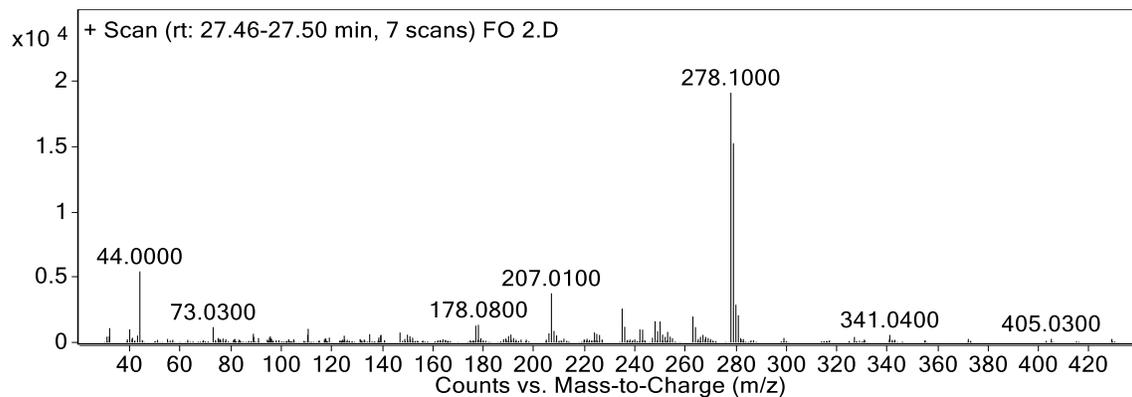


Figura 70. Espectro de masas correspondiente al icorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10-[metilenebis(oxi)] en el tiempo de retención 27.47 de la FO2.

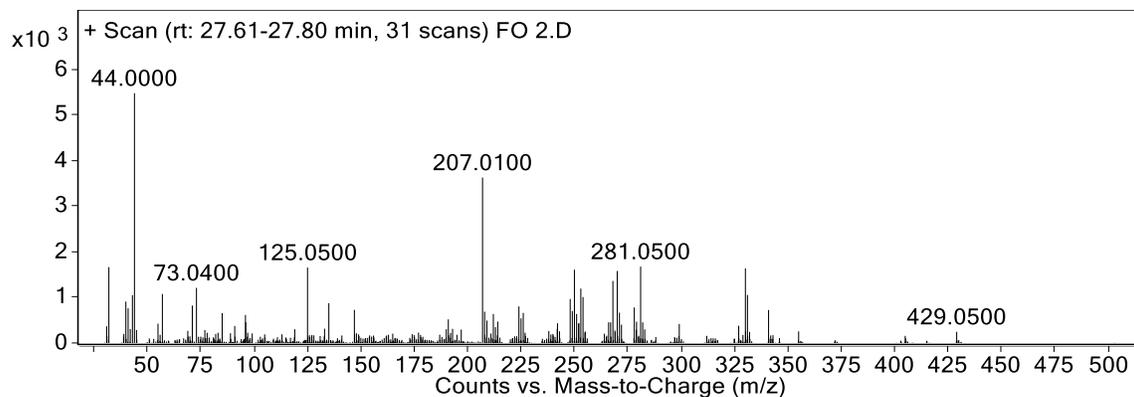


Figura 71. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 27.69 de la FO2.

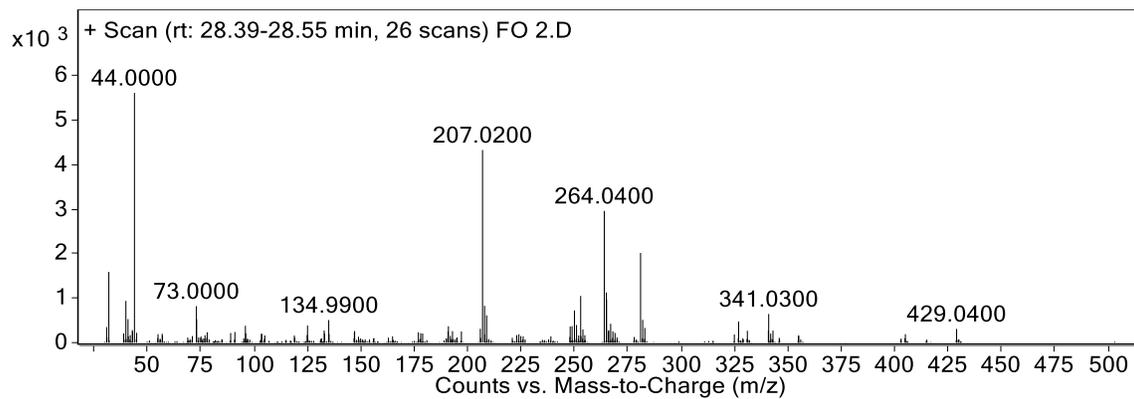


Figura 72. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 28.44 de la FO2.

ANEXO 4

Compuestos detectados por CG-EM en la FO3

Cuadro 12. Composición de la FO3 obtenida por CG-EM. El compuesto más abundante se marca en negritas. RT: Tiempo de retención.

Compuesto	RT	Abundancia relativa (%)
1-butano,2-metil,acetato	3.68	9.05
1-(2-butozietoxi)-etanol	4.48	2.16
5-Hidroximetilfufural	4.78	4.54
	6.30	1.67
Sacarosa	6.53	35.19
4,[2-(metilamino)etil]-fenol	6.53	3.36
	7.04	3.73
	10.02	1.59
	18.11	3.13
Licorina	25.54	23.11
Licorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10-[metilenebis(oxi)]	29.09	9.23

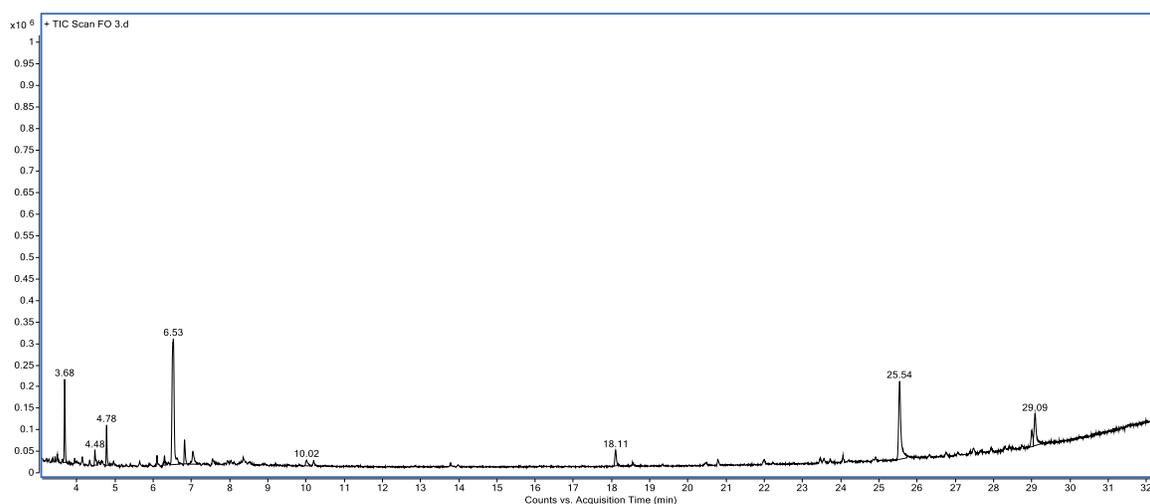


Figura 69. Cromatograma de la FO3 de *Zephyranthes fosteri* obtenido por CG-EM.

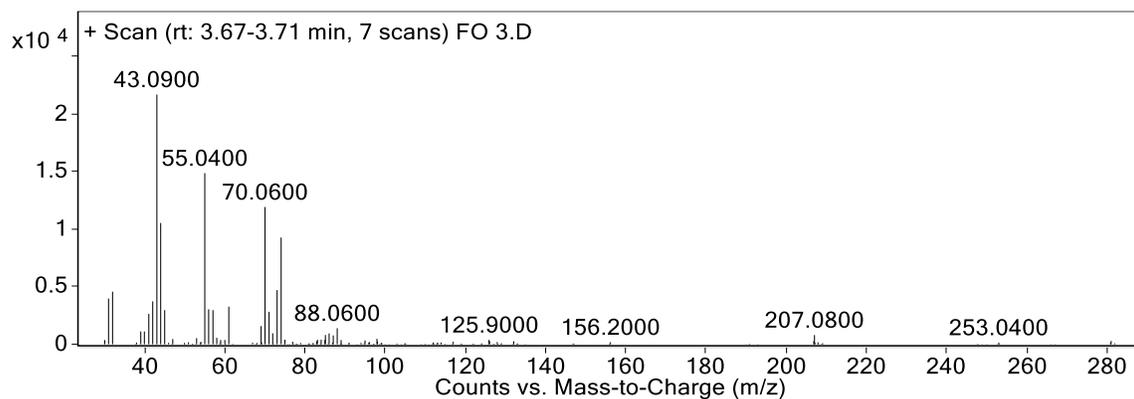


Figura 74. Espectro de masas correspondiente a 1-butano,2-metil,acetato en el tiempo de retención 3.68 de la FO3.

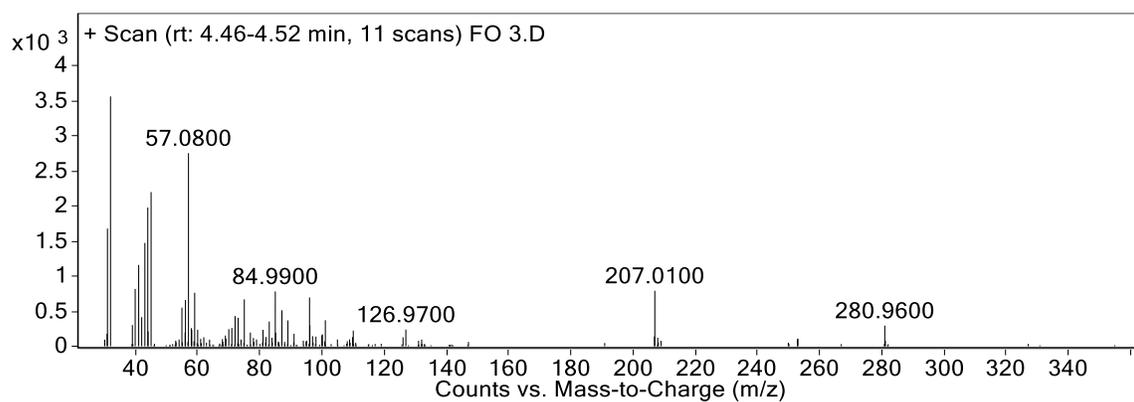


Figura 75. Espectro de masas correspondiente 1-(2-butoxi)etanol en el tiempo de retención 4.48 de la FO3.

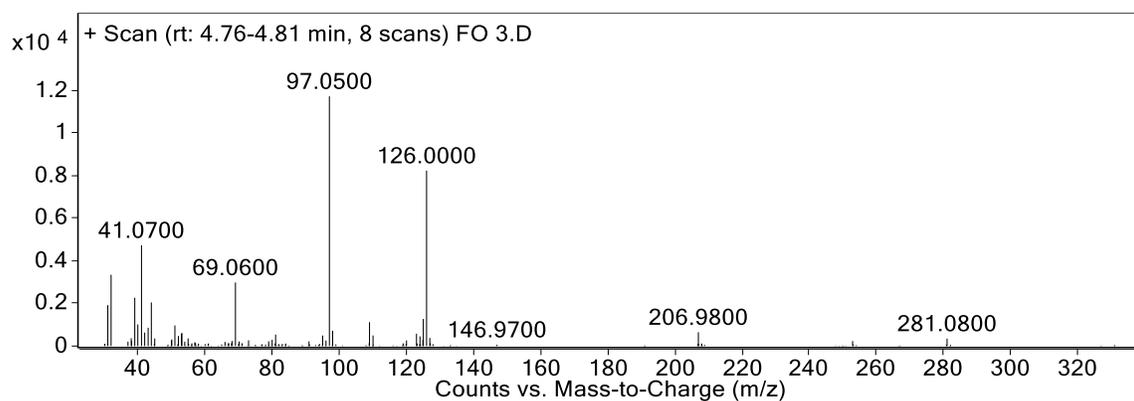


Figura 76. Espectro de masas correspondiente a 5-hidroximetilfural en el tiempo de retención 4.78 de la FO3.

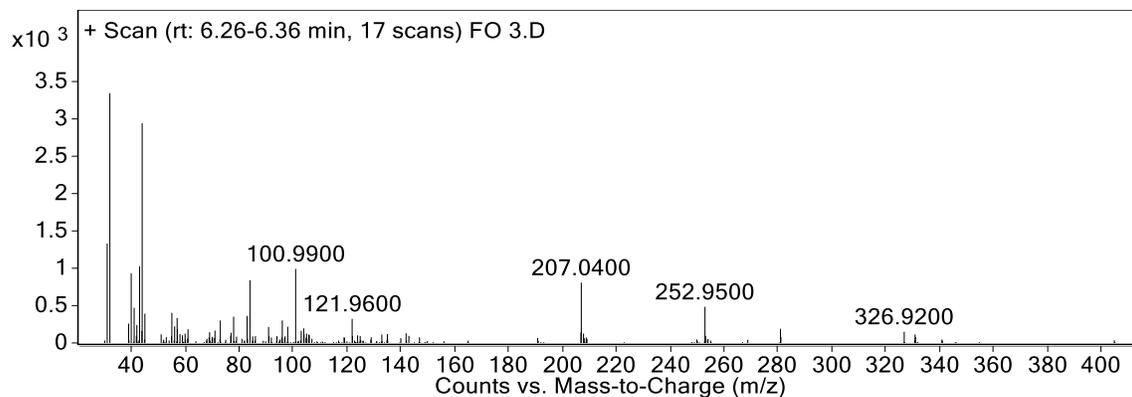


Figura 77. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 6.30 de la FO3.

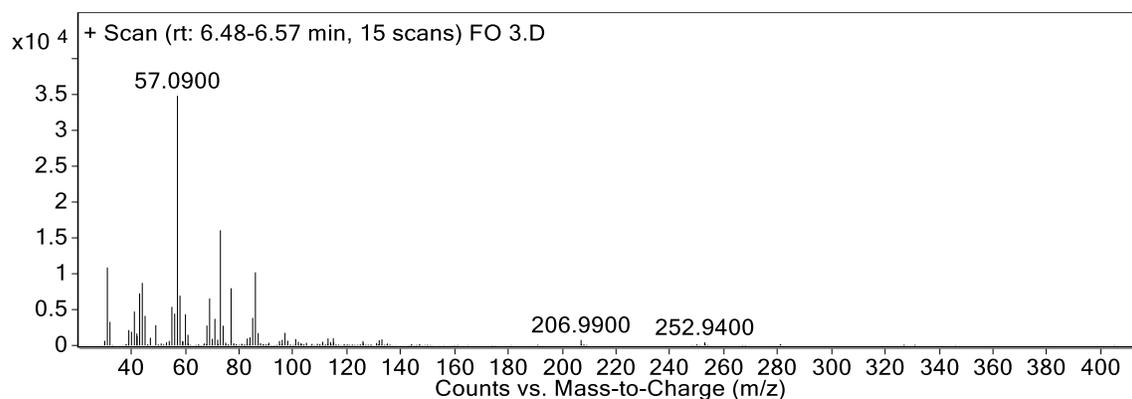


Figura 78. Espectro de masas correspondiente a la sacarosa en el tiempo de retención 6.53 de la FO3.

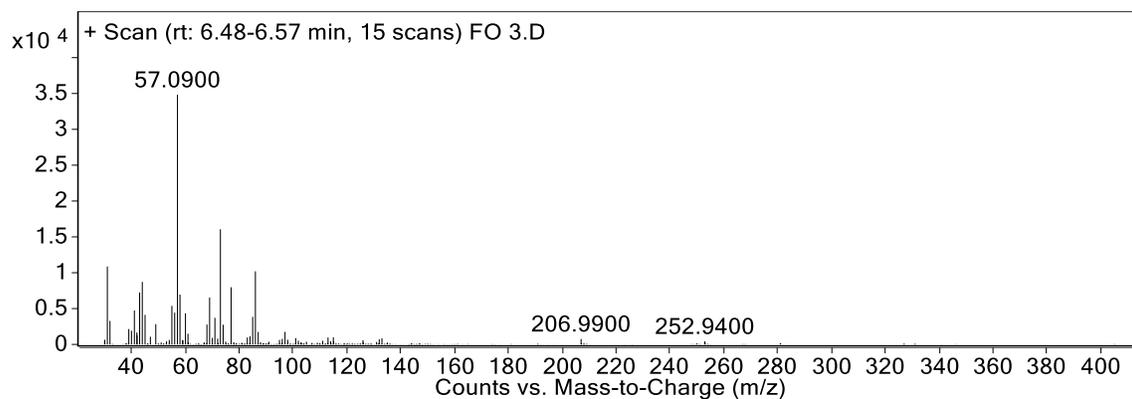


Figura 79. Espectro de masas correspondiente al 4,[2-(metilamino)etil]-fenol en el tiempo de retención 6.82 de la FO3.

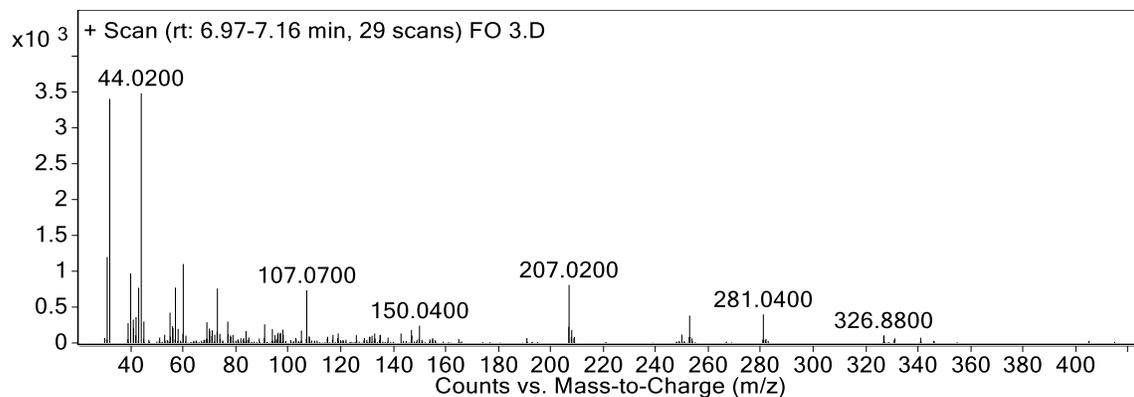


Figura 80. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 7.04 de la FO3.

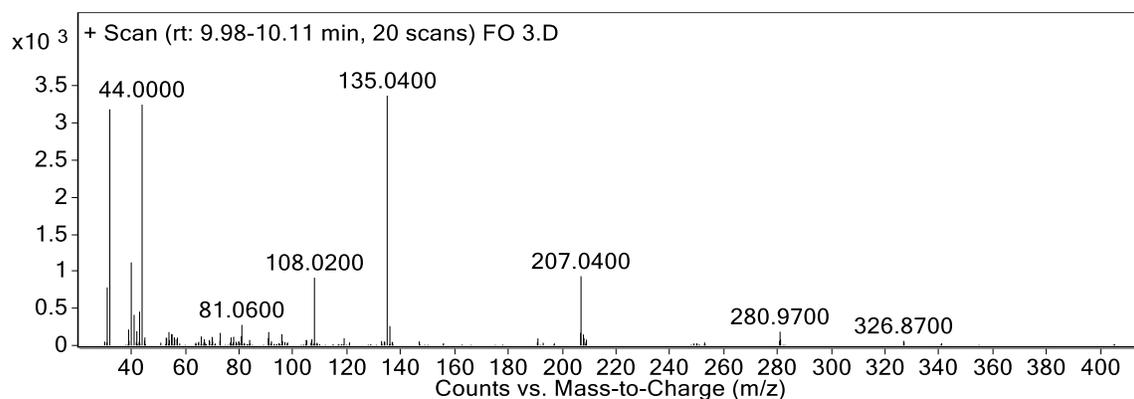


Figura 81. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 10.02 de la FO3.

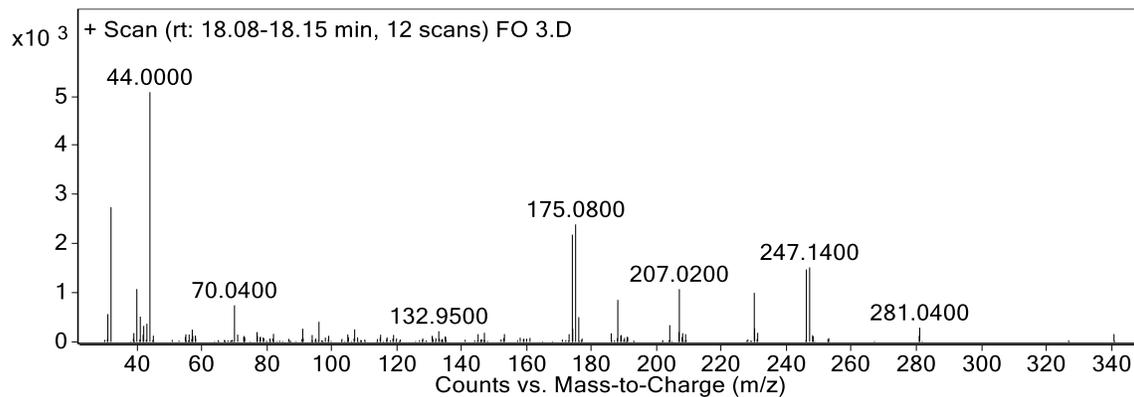


Figura 82. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 18.11 de la FO3.

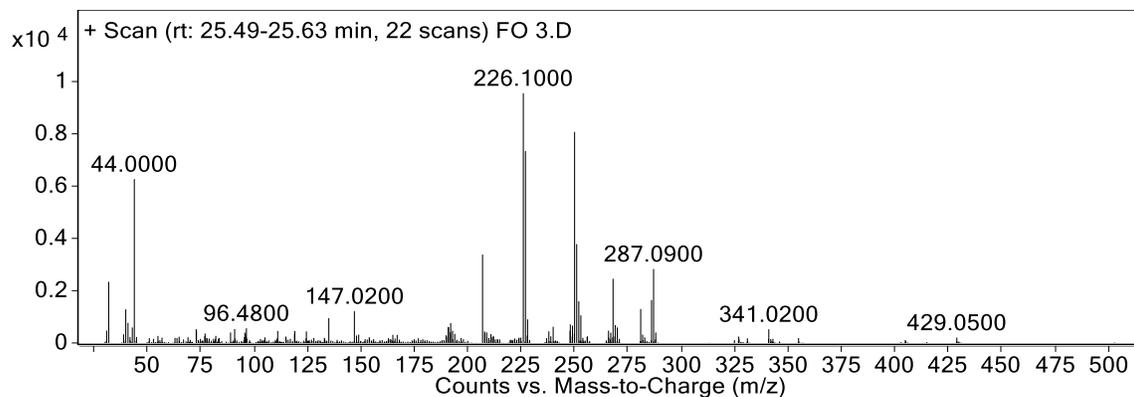


Figura 83. Espectro de masas correspondiente a la licorina en el tiempo de retención 25.54 de la FO3.

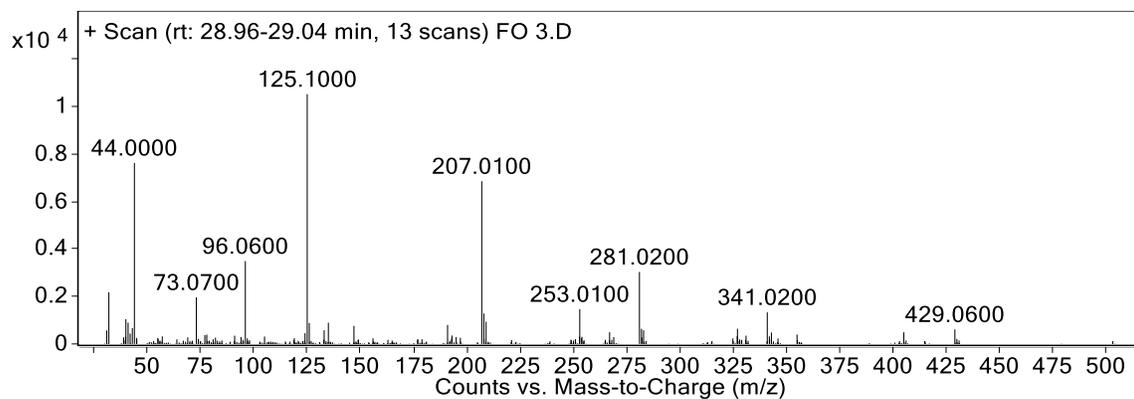


Figura 90. Espectro de masas correspondiente al licorenano-7-1,5hidroxi-1-metil-9,10 [metilenebis(oxi)] en el tiempo de retención 29.01 de la FO3.

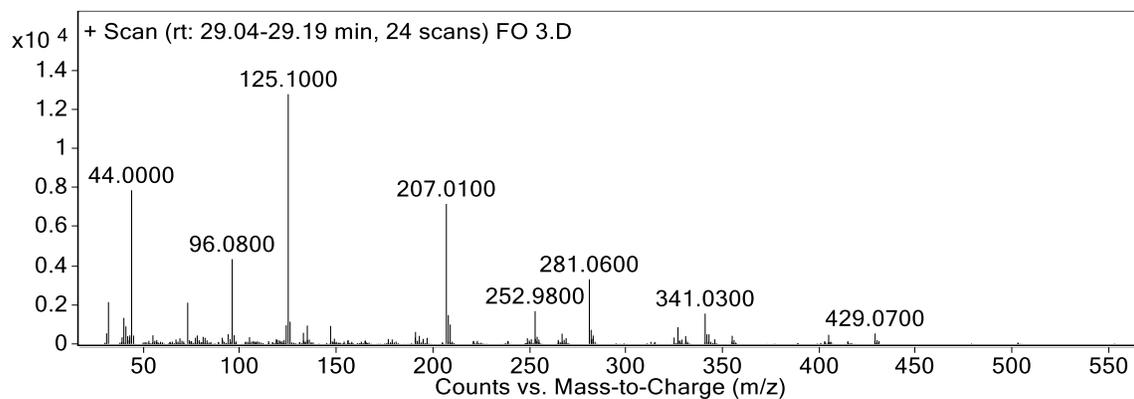


Figura 91. Espectro de masas correspondiente al pico en el tiempo de retención 29.09 de la FO3.

ANEXO 5

Cromatograma y espectro de masas de licorina por CG-EM.

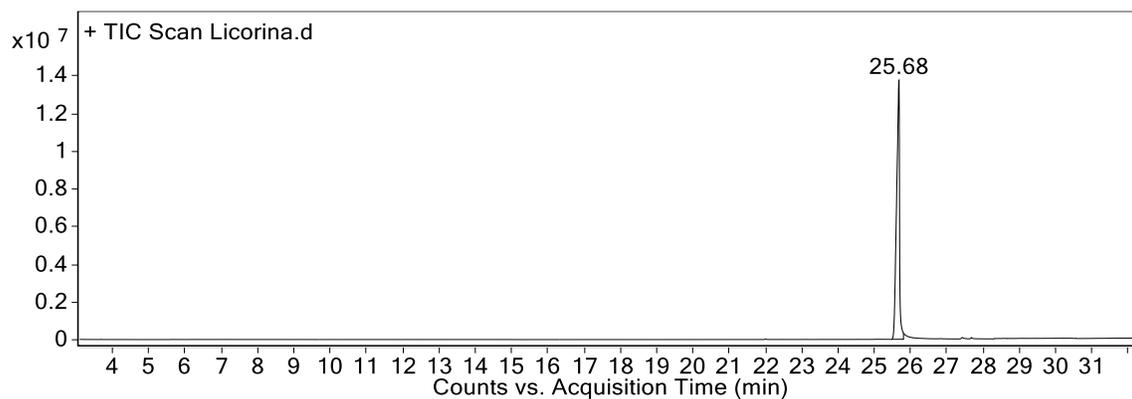


Figura 92. Cromatograma de la licorina obtenido por CG-EM.

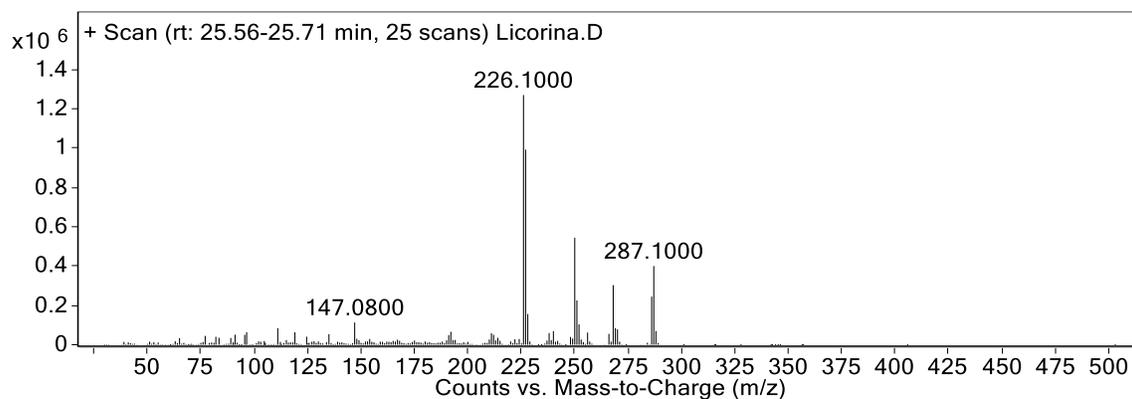


Figura 93. Espectro de masas correspondiente a la licorina.

ANEXO 6

Análisis histopatológico de hígado de las muestras provenientes del experimento de toxicidad oral aguda.

Se analizaron las muestras de hígado de los ratones del experimento de toxicidad aguda oral. En el grupo al que se le administro el EMZF a dosis de 2000 mg/kg se observó congestión de la vena central del lobulillo de forma moderada y focal, además de esteatosis y necrosis de forma leve y focal (Figura 85). Este grupo fue el que presento daños de forma leve y en menor extensión que los grupos a los que se les administró la FO2.

Respecto al grupo FO2 300 se observó congestión y dilatación de forma multifocal de forma moderada. Se presentó necrosis, esteatosis en la región del centro del lobulillo de forma moderada-grave con una extensión multifocal.

En las muestras provenientes del grupo FO2 1000 se observó congestión de vasos y sinusoides, hemorragia, esteatosis, necrosis multifocal a difusa con una gravedad moderada-grave. También se observó infiltrado inflamatorio de forma leve con una extensión difusa.

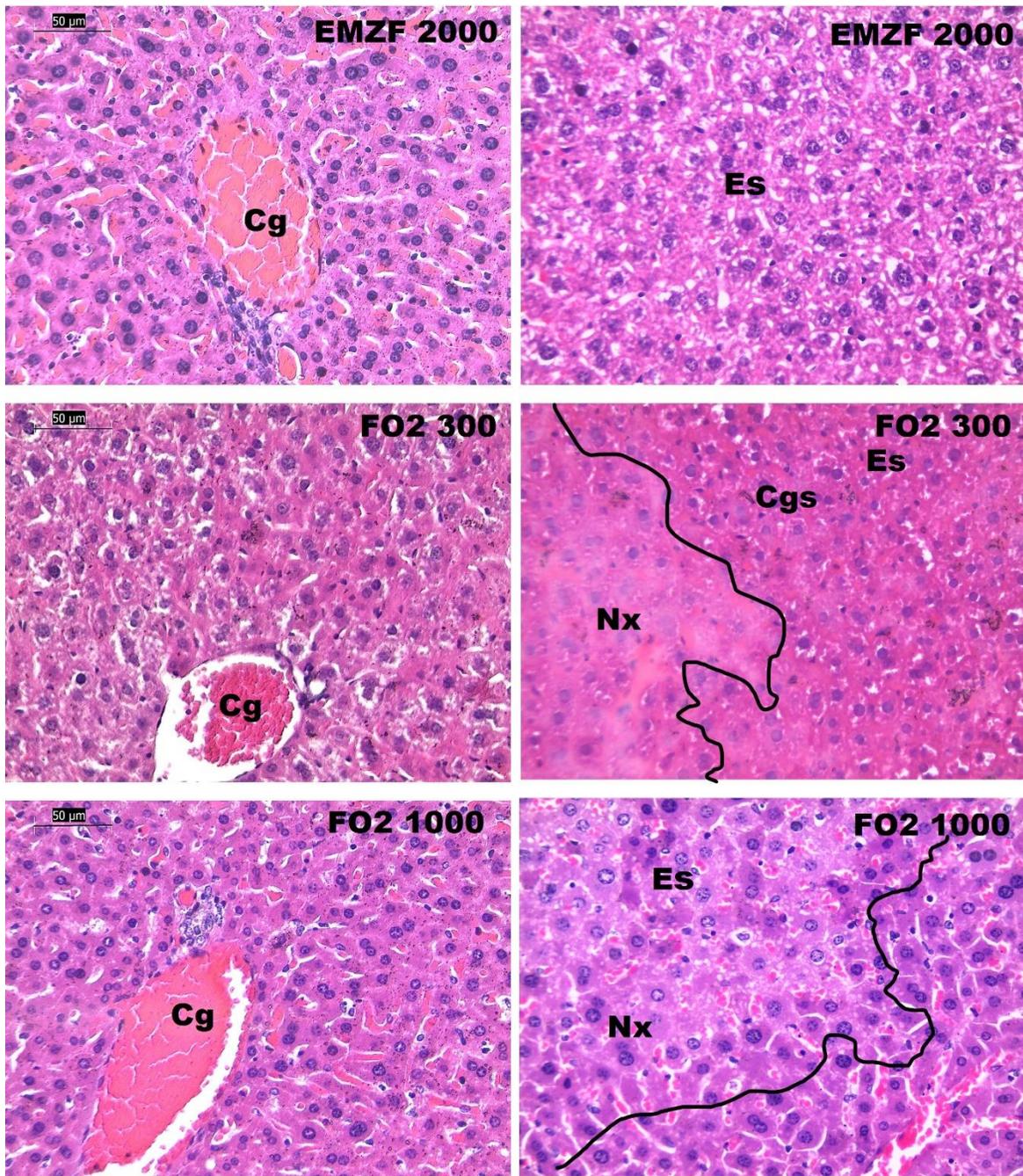


Figura 94. El EMZF a dosis de 2000 mg/kg (p.o.) produjo cambios focales, FO2 a dosis de 1000 mg/Kg (p.o.) provoco daños graves y difusos en el tejido hepático de ratones. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígado obtenidas de los ratones empleados para la toxicidad oral aguda. EMZF 2000, grupo administrado con 20000 mg/kg del EMZF, muestra congestión (Cg) de la vena central, infiltrado inflamatorio al centro del lobulillo en la imagen del lado izquierdo, del lado derecho se observa esteatosis (Es) microvesicular. FO2 300. A la izquierda presenta congestión en la vena central, en la fotomicrografía de la derecha se ve un foco necrótico (Nx), congestión de los sinusoides (Cgs) y esteatosis microvesicular de forma leve. FO2 1000, se le administró 1000 mg/kg de la FO2, se observa congestión, infiltrado inflamatorio. La fotomicrografía de la derecha muestra esteatosis y necrosis de forma moderada en casi todo el campo. Secciones teñidas con hematoxilina eosina.