



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

**UNIDAD LEGARIA**

**ELUCIDACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE FITOFÁRMACOS PARA EL  
TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA**

PRESENTA

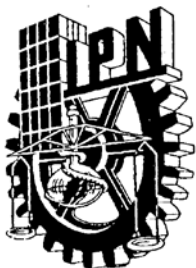
**GERARDO EHECATL GONZÁLEZ CÓRDOVA**

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. ROCIO GUADALUPE CASAÑAS PIMENTEL**

**DR. EDUARDO SAN MARTÍN MARTÍNEZ**

**JUNIO 2017**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 05 del mes 06 del año 2017, el (la) que suscribe Ing. Gerardo Ehecatl González Córdova alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro B150553, adscrito al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria CICATA-Legaria, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Rocio Guadalupe Casañas Pimentel y Dr. Eduardo San Martín Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado Elucidación de compuestos activos de fitofármacos para el tratamiento de cáncer de mama, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gehecatlgc@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ing. Gerardo Ehecatl González Córdova  
Nombre y firma



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 09 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-Legaria para examinar la tesis titulada:  
Elucidación de compuestos activos de fitofármacos para el tratamiento de cáncer de mama

Presentada por el alumno:

González Córdova Gerardo Ehecatl  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)  
Con registro: B 1 5 0 5 5 3

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

Lra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Lc. Miguel Ángel Aguilar Méndez

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

Dra. Delia Quintana Zavala

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca



SEP  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA  
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
**CICATA - LEGARIA**

# Contenido

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
INTRODUCCIÓN.....	iii
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Cáncer de mama.....	3
1.3 Líneas Celulares.....	7
1.4 Muerte celular.....	9
1.5 Fitofármacos como alternativa para el tratamiento del cáncer de mama.....	13
1.6 Biosíntesis de los principios activos.....	17
1.7 Plantas medicinales y su efecto en el cáncer.....	23
1.8 Fraccionamiento guiado por bioensayo.....	27
1.9 Métodos de extracción de los principios activos.....	29
1.10 Ensayo de MTT.....	32
1.11 Cromatografía en capa fina.....	33
1.12 Cromatografía preparativa.....	36
1.13 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	37
1.14 Espectroscopia UV-Vis.....	39
1.15 Espectroscopia FT-IR.....	41
2. OBJETIVO.....	43
2.1 Objetivo General.....	43
2.2 Objetivo específicos.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1 Material vegetal, obtención y caracterización.....	44
3.2 Acondicionamiento del material vegetal.....	44
3.3 Obtención de extractos.....	45
3.5 Espectroscopia FT-IR de los extractos crudos.....	45
3.6 Cultivo celular.....	46
3.7 Ensayo de viabilidad MTT de los extractos.....	46

3.8 Cromatografía en capa fina.....	47
3.9 Identificación de metabolitos secundarios.....	47
3.10 Cromatografía preparativa.....	48
3.11 Ensayo colorimétrico.....	49
3.12 Ensayo de viabilidad MTT de las fracciones.....	50
3.13 Espectroscopia UV-Visible.....	51
3.14 Espectroscopia FT-IR.....	51
3.15 HPLC.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1 Obtención de los extractos.....	52
4.2 Espectrofotometría FT-IR y UV-Vis de los extractos.....	52
4.3 Estandarización de la técnica cromatográfica e identificación de los metabolitos secundarios.....	77
4.5 Cromatografía Preparativa.....	80
4.6 Ensayo de citotoxicidad de las fracciones del extracto de cancerina.....	85
4.7 Análisis de la fracción de cancerina C2 con efecto citotóxico.....	88
5. CONCLUSIONES.....	101
6. REFERENCIAS.....	103

## Índice de tablas.

Tabla 1 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama.....	13
Tabla 1 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama (continuación).....	14
Tabla 1 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama (continuación).....	15
Tabla 2 Reveladores utilizados en la técnica de cromatografía en capa fina. ....	35
Tabla 3 Columnas de fase de sílice. ....	39
Tabla 4 Características de absorción de algunos cromóforos.....	41
Tabla 5 Pesos de los extractos. ....	52
Tabla 6 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en agua. ....	59
Tabla 7 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en etanol.....	60
Tabla 8 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en éter de petróleo. ....	61
Tabla 9 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en agua.....	63
Tabla 10 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en etanol. ....	64
Tabla 11 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo.....	65
Tabla 12 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en agua.....	66
Tabla 13 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en etanol.....	68
Tabla 14 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en éter de petróleo. ....	69
Tabla 15 Valores de DE50 de los extractos a 24 y 72 en la línea celular MDA-MB-231. ..	77
Tabla 16 Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos de los extractos.....	77
Tabla 17 Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos de los extractos de cancerina.....	78
Tabla 18 Revelamiento fotoquímico del extracto en éter de petróleo de cancerina. ....	78
Tabla 19 Resultados de los reveladores con la técnica CCF. ....	79
Tabla 20 Pesos de las fracciones del extracto de cancerina en éter de petróleo.....	85
Tabla 21 Valores de DE50 de las fracciones a 24 y 72 en la línea celular MDA-MB-231..	88
Tabla 22 Resultado de los ensayos colorimétricos de la fracción C2. ....	89
Tabla 23 Señales de la espectrofotometría FT-IR de la fracción C2.....	93
Tabla 24 Rampa para modificar la fase móvil en la cromatografía de C2. ....	100

## Índice de Figuras.

Figura 1 Estrategia antigua.....	28
Figura 2 Estrategia moderna.....	29
Figura 3 Niveles de energía electrónicos de los orbitales moleculares .....	40
Figura 4 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en agua.....	53
Figura 5 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en etanol.....	53
Figura 6 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en éter de petróleo.....	54
Figura 7 Espectroscopia UV/Vis del extracto de muicle en agua. ....	54
Figura 8 Espectroscopia a UV/Vis del extracto de muicle en etanol. ....	55
Figura 9 Espectroscopia UV/Vis del extracto de muicle en éter de petróleo. ....	55
Figura 10 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en agua.....	56
Figura 11 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en etanol. ....	56
Figura 12 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en éter de petróleo. ....	57
Figura 13 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en agua.....	58
Figura 14 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en etanol.....	59
Figura 15 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en éter de petróleo.....	60
Figura 16 Espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en agua. ....	62
Figura 17 Espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en etanol. ....	63
Figura 18 Espectrofotometría FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo. ....	64
Figura 19 Espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en agua.....	66
Figura 20 Espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en etanol. ....	67
Figura 21 Espectrofotometría FT-IR del extracto de tejocote en éter de petróleo. ....	68
Figura 22 Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de cancerina a 24 y 72 horas.....	70
Figura 23. Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de cancerina a 24 y 72 horas. ...	71
Figura 24 Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 24 y 72 horas. ....	72
Figura 25 Réplicas del ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 24 horas.....	72
Figura 26 Réplicas del ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 72 horas.....	73
Figura 27. Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de muicle a 24 y 72 horas. ....	74
Figura 28. Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de muicle a 24 y 72 horas. ....	74
Figura 29. Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de muicle a 24 y 72 horas. ....	75
Figura 30. Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de tejocote a 24 y 72 horas. ....	75
Figura 31 Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de tejocote a 24 y 72 horas .....	76
Figura 32. Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de tejocote a 24 y 72 horas. ....	76
Figura 33. Espectroscopia UV/Vis de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa. ....	81
Figura 34. Espectro UV/Vis de la fracción 1 del tubo 1 del extracto de cancerina.....	82
Figura 35. Espectro UV/Vis de la fracción 2 del tubo 2 del extracto de cancerina.....	82

Figura 36. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 4, 5, 6, 7 y 8 del extracto de cancerina.....	83
Figura 37. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 9, 10 y 11 del extracto de cancerina.....	84
Figura 38. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 13, 14 y 16 del extracto de cancerina.....	84
Figura 39. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C1 a 24 y 72 horas. ....	86
Figura 40. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C2 a 24 y 72 horas. ....	86
Figura 41. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C3 a 24 y 72 horas. ....	87
Figura 42. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C4 a 24 y 72 horas. ....	87
Figura 43. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C5 a 24 y 72 horas. ....	88
Figura 44. Clasificación de la familia de las saponinas.....	89
Figura 45. Triterpenos identificados en <i>Hippocratea excelsa</i> Kunth.....	89
Figura 46 Espectroscopia UV-Vis de la fracción C2. ....	91
Figura 47 Espectrofometría FT-IR de la fracción C2.....	92
Figura 48 Molécula de pristimerina con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR. 94	
Figura 49 Molécula de dzununcanona con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR. ....	94
Figura 50 Molécula de 29-hidroxifriedelan con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR .....	95
Figura 51 Cromatograma de la fracción C2 mediante HPLC-DAD a diferentes longitudes96	
Figura 52. Cromatografías de la fracción C2 y de pristimerina .....	98
Figura 53 Cromatografía de la fracción C2 en HPLC-DAD .....	99



## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado y la acumulación de múltiples alteraciones genéticas. En 2015 el cáncer fue la segunda causa de muerte en el mundo y en el 2012 más de 408,000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama en América, de las cuales, 92,000 fallecieron a causa de esta enfermedad. En México el cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres, existen varias maneras de tratar el cáncer de mama, dependiendo de su tipo y estadio, desde tratamientos locales como cirugía y radioterapia y tratamientos sistémicos que son la quimioterapia y hormonoterapia. Debido a la toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos y el desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales a múltiples fármacos anti-cáncer se dificulta este tipo de tratamiento en los pacientes, se han propuesto varias alternativas para su tratamiento, muchas de las cuales utilizan productos derivados de plantas, estas todavía tienen un enorme potencial para proporcionar nuevos fármacos.

Esta investigación forma parte de un grupo de trabajo en el cual anteriormente se estudiaron seis plantas mexicanas a las que se les atribuye por medicina tradicional propiedades contra el cáncer de mama, de estas seis plantas se obtuvieron extractos con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, etanol y agua) dando un total de dieciocho extractos, los cuales fueron probados en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 y en una línea celular de tejido mamario sano MCF 10A, con el objetivo de encontrar aquellos extractos que produjesen un efecto citotóxico en las líneas células de cáncer de mama con una dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) igual o menor a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los extractos con mayor actividad fueron los de cancerina, muicle y tejocote obtenidos en éter de petróleo.

En el presente trabajo se renovó el material vegetal y se obtuvieron los extractos de cancerina, muicle y tejocote con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, etanol y agua), estos nueve extractos se analizaron con las técnicas espectroscópicas UV-Vis y FT-IR, posteriormente fueron probados en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 donde se encontró que el extracto de cancerina en éter de petróleo presentó actividad citotóxica con una  $DE_{50}$  de 19.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 72 horas, este extracto se fraccionó por cromatografía preparativa dando como resultado cinco fracciones, estas fracciones se probaron en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, en donde la fracción C2 presentó actividad citotóxica con una  $DE_{50}$  de 12.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 72 horas, encontrándose una disminución del 36.76% en la  $DE_{50}$  de la fracción C2, con respecto al extracto crudo.

Se analizó la fracción C2 haciendo uso de diferentes técnicas, con el fin de elucidar la molécula o moléculas a las que se les atribuye el efecto citotóxico, desde reveladores en cromatografía en capa fina como screening químico y ensayos de colorimetría en donde se encontró que en la fracción C2 se encuentran moléculas pertenecientes a la familia de las sapogeninas triterpenoides, en las técnicas espectrofotométricas UV-Vis y FT-IR se observaron similitudes en los espectros de la fracción con respecto a los reportados para la molécula pristimerina y en la cromatografía HPLC-DAD se obtuvieron tiempos de retención similares a los reportados para dicha molécula. En conclusión, el efecto citotóxico en la línea celular MDA-MB-231 que se observa en el extracto de cancerina en éter de petróleo probablemente debe a la presencia del triterpeno llamado pristimerina y su derivado dzununcanona.

## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell growth and the accumulation of multiple genetic alterations. In 2015 cancer was the second leading cause of death in the world and in 2012 more than 408,000 women were diagnosed with breast cancer in America, of which, 92,000 died of this disease. In Mexico breast cancer is the most frequent among women, there are several ways to treat breast cancer, depending on its type and stage, from local treatments such as surgery and radiotherapy and systemic treatments that are chemotherapy and hormone therapy. Due to the toxicity of chemotherapeutic drugs and the development of resistance by tumor cells to multiple anti-cancer drugs, this type of treatment is difficult in patients, several alternatives have been proposed for their treatment, many of which use derivative products of plants, these still have a huge potential to provide new drugs.

This research is part of a working group that previously studied six Mexican plants that are attributed by traditional medicine properties against breast cancer, of these six plants were obtained extracts with solvents of different polarities (petroleum ether, ethanol and water) giving a total of eighteen extracts, which were tested in the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 and in a healthy breast tissue cell line MCF 10A, with the aim of finding those extracts that produced a cytotoxic effect in the breast cancer cell lines with an effective dose 50 (ED50) of 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$  or less, extracts with the highest activity were cancerina, muicle and tejocote obtained in petroleum ether.

In the present work the plant material was renewed and extracts of cancerina, muicle and tejocote were obtained with solvents of different polarities (petroleum ether, ethanol and water), these nine extracts were analyzed with spectroscopic techniques UV-Vis and FT- IR, were subsequently tested in the breast cancer cell line MDA-MB-231 where the cancerina extract in petroleum ether presented cytotoxic activity with an ED50 of 19.07  $\mu\text{g} / \text{mL}$  at 72 hours, this extract was fractionated by flash chromatography giving place to 5 fractions, the fractions were tested in the breast cancer cell line MDA-MB-231, where the C2 fraction showed cytotoxic activity with an ED50 of 12.06  $\mu\text{g} / \text{mL}$  at 72 hours, with a decrease of 36.76% in the ED50 of fraction C2, relative to the crude extract.

The C2 fraction was analyzed using different techniques, in order to elucidate the molecule or molecules to which the cytotoxic effect is attributed, from developers in thin layer chromatography like chemical screening and colorimetry tests it was found that in the fraction C2 are molecules belonging to the family of triterpenoid sapogenins, in the spectrophotometric techniques UV-Vis and FT-IR similarities were observed in the spectra of the fraction with respect to those reported for the pristimerin molecule and in HPLC-DAD chromatography retention times similar to those reported for that molecule were obtained. In conclusion, the cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line observed in the cancerine extract in petroleum ether probably owes to the presence of triterpene called pristimerin and its dzununcanone derivative.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades que se pueden presentar en diversas partes del organismo, cuyas características principales son: crecimiento celular descontrolado, evasión de la apoptosis, favorecimiento de la angiogénesis y acumulación de múltiples alteraciones genéticas, entre otros, (WHO, World Health Organization, 2013). En 2012 a nivel mundial, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en la mujer fueron los de mama (25.2% del total), colon y recto (9.2%), pulmón (8.7%), cuello uterino (7.9%) y estómago (4.8%). Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (W. Stewart & P. Wild, 2014). En las mujeres mexicanas el cáncer de mama encabeza la incidencia con un 30.9% del total, seguido por cáncer en órganos genitales con 17.6% y cáncer en órganos digestivos con 12.8% (INEGI, 2016).

Existen diversos tipos de tratamientos para el cáncer de mama, pueden ser locales son aquellos que tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo como la cirugía y radio terapia, o tratamientos sistémicos que son con fármacos, que se pueden administrar por vía oral o directamente al torrente sanguíneo como quimioterapia y hormonoterapia (ACS, 2016). Algunos síntomas de los medicamentos que componen a la quimioterapia para el cáncer de mama son bajo recuento de glóbulos blancos, anemia (bajo recuento de glóbulos rojos), infecciones, hinchazón (edema), náusea, vómito, diarrea, neuropatía (daño nervioso), dolor muscular o articular y períodos irregulares, esto puede incluir la interrupción temporal (por lo general se reanuda después de que la medicación se completa) o el cese definitivo de los períodos menstruales dependiendo de la edad y otros factores (BreastCancer, 2015). La toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos crea a veces un problema significativo en su tratamiento. Se han propuesto varias terapias para el tratamiento del cáncer, muchas de las cuales utilizan productos derivados de plantas. En la actualidad existen cuatro clases de agentes anticancerosos derivados de las plantas, los alcaloides derivados de la vinca (vinblastina, vincristina y vindesina), las epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y los derivados de camptotecina (camptotecina e irinotecán). Las plantas todavía tienen un

enorme potencial para proporcionar nuevos fármacos y como tal son un depósito de productos químicos naturales que pueden proporcionar potencial quimioprotector contra el cáncer (Desai, y otros, 2008).

Este trabajo forma parte de un grupo de trabajo en el cual anteriormente se estudiaron seis plantas mexicanas a las que se les atribuye por medicina tradicional propiedades contra el cáncer de mama, estas seis plantas se obtuvieron extractos con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, etanol y agua) dando un total de dieciocho extractos los cuales fueron probados en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 y en una línea celular de tejido mamario sano MDA-10A, con el objetivo de encontrar aquellos extractos que produjesen un efecto citotóxico en las líneas células de cáncer de mama con una dosis efectiva 50 igual o menor a 30  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales fueron los extractos en éter de petróleo de cancerina, muicle y tejocote, estos extractos candidatos fueron estudiados para determinar el tipo de muerte celular que generaban por medio de la evaluación de anexina V y ROS mediante citometría de flujo, concluyendo que inducían la muerte celular por apoptosis.

En la presente investigación se trabajó con los extractos candidatos para llevar a cabo su fraccionamiento por cromatografía preparativa, con el fin de obtener fracciones que presenten una  $DE_{50}$  menor a la que presentaron los extractos crudos, posteriormente se llevó a cabo el análisis de estas fracciones para elucidar la naturaleza química de la molécula o moléculas a las que se les atribuye el efecto citotóxico, para obtener un fitofármaco que posteriormente se pueda nanoencapsular y sea una nueva alternativa para el tratamiento de cáncer de mama.

# 1. ANTECEDENTES.

## 1.1 Cáncer.

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades que se pueden presentar en diversas partes del organismo, cuyas características principales son: crecimiento celular descontrolado, evasión de la apoptosis, favorecimiento de la angiogénesis y acumulación de múltiples alteraciones genéticas, entre otros, (WHO, World Health Organization, 2013). Otra característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (WHO, World Health Organization, 2016).

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se le atribuyeron 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 (W. Stewart & P. Wild, 2014). Los principales tipos de cáncer son los siguientes:

Pulmonar (1.59 millones de defunciones);

- Hepático (745 000 defunciones);
- Gástrico (723 000 defunciones);
- Colorrectal (694 000) defunciones;
- Mamario (521 000 defunciones);
- Cáncer de esófago (400 000 defunciones).

En 2012 a nivel mundial, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón (16.7% del total), próstata (15%), colon y recto (10%), estómago (8.5%) e hígado (7.5%). En la mujer fueron los de mama (25.2% del total), colon y recto (9.2%), pulmón (8.7%), cuello uterino (7.9%) y estómago (4.8%). Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (W. Stewart & P. Wild, 2014).

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos (WHO, World Health Organization, 2016), a saber:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes;
- Carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas que son contaminantes de los alimentos o el arsénico que es un contaminante del agua potable.
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El cáncer es una enfermedad genética por que puede rastrearse hasta alteraciones dentro de genes específicos, pero en la mayor parte de los casos no es hereditario. En una enfermedad hereditaria, el defecto genético se halla en los cromosomas de uno de los padres y se trasmite al cigoto. A causa de estos cambios genéticos, en las células cancerosas se liberan de muchas de las restricciones a las que se encuentran sujetas las células sanas. Las células sanas no se dividen a menos que sean estimuladas para hacerlo a través de la maquinaria homeostática del cuerpo; tampoco sobreviven cuando incurren en un daño irreparable; ni se separan de un tejido para empezar colonias nuevas en otros sitios del cuerpo. Por el contrario, en la mayor parte de las células cancerosas se descomponen estas influencias reguladoras que protegen al cuerpo del caos y la autodestrucción. Lo que es más importante, proliferan de manera incontrolable y producen tumores malignos que invaden el tejido sano circundante. Mientras el crecimiento del tumor permanezca localizado, la enfermedad casi siempre puede curarse mediante la extirpación quirúrgica de la neoplasia. Sin embargo, los tumores malignos son propensos a la metástasis, es decir, a diseminar células apóstatas que se separan de la masa original, ingresan a la circulación linfática o sanguínea y se extienden a sitios distantes del cuerpo, donde establecen tumores secundarios letales (metástasis) que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Karp, 2014).

Una vez que el cáncer se propaga, puede ser difícil de controlar. Aunque algunos tipos de cáncer metastásico pueden ser curados con tratamientos actuales, la mayoría no se puede. Aun así, hay tratamientos para todos los pacientes con cáncer metastásico. El objetivo de estos tratamientos es detener o ralentizar el crecimiento del cáncer o aliviar los síntomas causados por el mismo. En algunos casos, los tratamientos para el cáncer metastásico pueden ayudar a prolongar la vida (NCI, 2016).

## 1.2 Cáncer de mama.

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo en desarrollo debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales (WHO, World Health Organization, 2016).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, 2014), en el 2012, más de 408,000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama en América y 92,000 fallecieron a causa de esta enfermedad. Las proyecciones indican que el número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama en América aumentará en un 46% en el 2030 y es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de América Latina y el Caribe (ALCA), tanto en número de casos nuevos como en número de muertes.

En la población mexicana el cáncer de mama tiene una incidencia de 19.4% del total siendo este el mayor porcentaje, seguido por cáncer en órganos digestivos con 16.7% y cáncer en órganos genitales con 15.2%. Para los hombres mexicanos el cáncer de órganos digestivos encabeza la incidencia con un 23% del total, seguido por cáncer en órganos genitales con 11.4% y cáncer en tejido linfático y afines con 12.8%. En las mujeres mexicanas el cáncer de mama encabeza la incidencia con un 30.9% del total, seguido por cáncer en órganos genitales con 17.6% y cáncer en órganos digestivos con 12.8% (INEGI, 2016).

El cáncer más frecuente en las mujeres es el de mama, pero a partir del año 2006, gracias a la detección temprana y opciones de tratamiento, la tasa de mortalidad ha disminuido (IMSS, 2015).

En México se realizan dos tipos de mastografía una de tamizaje que permite la detección temprana de cáncer de mama a mujeres aparentemente sano, y de diagnóstico que se realiza como parte de la evaluación del estado de salud de la mujer cuando se sospecha o tiene síntomas clínicos de patología de cáncer de mama (DOF, 2011).

Hay varias maneras de tratar el cáncer de mama, dependiendo de su tipo y estadio (ACS, 2016):

- **Tratamientos locales:** Algunos tratamientos se llaman terapias locales, lo que significa que tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo. Los tipos de terapia local utilizados para el cáncer de mama incluyen cirugía y radioterapia. Estos tratamientos tienen más probabilidades de ser útiles para los cánceres de estadio temprano o menos avanzados, aunque también pueden ser utilizados en otras situaciones.
- **Tratamientos sistémicos:** El cáncer de mama también se puede tratar con fármacos, que se pueden administrar por vía oral o directamente al torrente sanguíneo. Estos se llaman terapias sistémicas, ya que pueden llegar a las células del cáncer en cualquier parte del cuerpo. Dependiendo del tipo de cáncer de mama, se pueden usar varios tipos diferentes de fármacos, como quimioterapia y hormonoterapia

De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen dos tipos principales de cáncer de mama. La mayoría de los cánceres de mama comienzan en los conductos que llevan la leche al pezón (cáncer ductal *in suit*, CDIS). Algunos comienzan en las glándulas que producen la leche materna (cáncer lobular *in suit*, CLIS).



También hay otros tipos de cáncer de mama que son menos comunes. Un pequeño número de cánceres comienza en otros tejidos de la mama. Estos cánceres se llaman sarcomas y linfomas y en realidad no se piensa como cáncer de mama (ACS, 2016).

El carcinoma invasivo o infiltrante se debe a importantes modificaciones genéticas, el tumor invade tejidos subyacentes vertiendo células a la sangre o linfa generando metástasis a través del cuerpo, haciéndose letales si afectan órganos vitales (Santos, y otros, 2012).

El carcinoma ductal invasivo (CDI), también conocido como carcinoma ductal infiltrante, es un cáncer que comenzó a crecer en el conducto y que ha invadido el tejido graso de la mama fuera del conducto. El carcinoma ductal invasivo es la forma más común de cáncer de mama, que representa el 80 por ciento de todos los diagnósticos de cáncer de mama, (MJH, 2016). EL carcinoma lobulillar invasivo (CLI) o infiltrante se origina en los lobulillos de la glándula mamaria, propagándose a través de la pared de los lobulillos (Santos, y otros, 2012).

El cáncer puede extenderse a casi cualquier parte del cuerpo, los sitios más comunes donde se disemina el cáncer de mama son el hueso, cerebro, hígado y pulmón (ACS, 2016).

Aunque este esquema de clasificación ha sido una valiosa herramienta por décadas, se basa únicamente en la histología sin la utilización de nuevos marcadores moleculares que tienen una probada importancia en el pronóstico (Gautam , Xiangshan, Band, & Band, 2010).

En los últimos años se ha descubierto un gran número de biomarcadores importantes en la regulación de los procesos implicados en la carcinogénesis, por lo que en muchos estudios se han aplicado estos avances para la identificación y caracterización de factores predictivos y pronósticos en el cáncer de mama. Actualmente los únicos tres marcadores validados como factores predictivos de respuesta a tratamientos específicos en este tipo de tumor son los receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y el oncogen HER2/neu (de la Vega, y otros, 2014).

Estudios recientes identificaron varios subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama que posteriormente fueron confirmados y clasificados (de la Vega, y otros, 2014) como:

a) Subtipo basal epitelial: Caracterizado por la ausencia o mínima expresión de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y HER2/neu (triple negativo), elevada

expresión de citoqueratinas 5/6 y 17 (mioepiteliales), laminina, etc. A diferencia de otros subtipos, este grupo de tumores presenta alta frecuencia (82%) de mutaciones en TP53 y expresión de proteína p53 (TP53 funciona como punto de control «checkpoint» en el ciclo celular desencadenando respuestas ante el daño del DNA, así como en reparación y apoptosis). Los tumores de tipo basal reciben este nombre por su perfil de expresión genómica similar a la de un epitelio celular basal normal y a células mioepiteliales normales. También comparte características histológicas con las células basales epiteliales de la mama normal, y muestra una elevada tasa proliferativa, necrosis central con margen infiltrativo, así como escaso estroma, frecuentes células apoptóticas, respuesta linfocítica y estromal, características similares a las observadas también en los carcinomas que aparecen en mujeres portadoras de mutación en el gen BRCA1.

b) Subtipo HER2 +: Ausencia o mínima expresión de RE, elevada expresión de HER2/neu. El perfil de expresión revela no sólo copias aumentadas de RNAm del gen HER2/neu, sino también un aumento en la transcripción de otros genes adyacentes que están amplificados en este segmento de DNA, como GRB7.

c) Luminal A: Caracterizado por la elevada expresión de RE, proteína 3 de un complejo de unión de GATA, proteína de unión a caja-X, el factor 3, el factor nuclear 3-alfa de hepatocito LIV-1 y regulada por estrógeno. Comparte características con las células epiteliales luminales que se desarrollan a partir de la capa interna de revestimiento del ducto mamario.

d) Luminal B y C: Baja a moderada expresión de genes específicos de perfil luminal incluyendo los de grupo de RE.

En particular, los subtipos moleculares muestran diferencias muy significativas en la predicción de la supervivencia global, así como la supervivencia libre de enfermedad con el subtipo basal o triple negativo (RE- / RP- / HER2/neu -) que tiene la supervivencia más corta, (Gautam , Xiangshan, Band, & Band, 2010). Del 50 al 80% de los carcinomas mamarios que expresan receptores de estrógenos (RE), estos tumores son más frecuentes en mujeres postmenopáusicas. Estadísticamente, las mujeres con carcinoma de mama con receptores hormonales positivos tienen un pronóstico ligeramente mejor que el de las mujeres con receptores hormonales negativos (de la Vega, y otros, 2014).

### 1.3 Líneas Celulares.

El cultivo celular se refiere al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se le llama cultivo primario a la etapa comprendida entre el aislamiento celular y el primer subcultivo, las células pueden separarse del tejido directamente y disgregarse por medios enzimáticos o mecánicos antes del cultivo, o pueden derivarse de una línea celular o cepa celular que ya ha sido establecida. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia, en esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene, dado a esto, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte, esta de operación se denomina subcultivo o pase. Después de la primera subcultura, el cultivo primario se conoce como una línea celular o subclon. Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida útil limitada ya que predominan las células con la mayor capacidad de crecimiento, dando lugar a un grado de uniformidad genotípica y fenotípica en la población (Vargas & de la Rosa, 2016).

En el presente trabajo se utilizarán las siguientes líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y MCF 10A.

El MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama humana cultivada que es ampliamente utilizada para estudios de biología del cáncer de mama y mecanismo hormonal de acción. La línea celular se derivó originalmente de la Michigan Cancer Foundation de un derrame pleural alineante de una mujer posmenopáusica con cáncer de mama metastásico que había sido previamente tratados con radioterapia y manipulación hormonal. Las células expresan receptores y respuestas biológicas a una variedad de hormonas incluyendo estrógeno, andrógeno, progesterona, glucocorticoides, insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, prolactina y hormona tiroidea (Osborne, Hobbs, & Trent, Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories, 1987).

Una de las contribuciones más importantes de la línea celular MCF-7 a la investigación del cáncer de mama ha sido su utilidad para el estudio del receptor de estrógeno (RE) alfa, ya que esta línea celular es una de muy pocas para expresar niveles sustanciales de RE imitando a la mayoría de los cánceres de mama humanos invasivos que expresan RE. Es de destacar que el mantenimiento de la expresión del receptor de estrógeno alfa en las líneas celulares cultivadas es especialmente difícil, y esto ha dado lugar a la generación de mucho más RE negativas que las líneas de células de cáncer de mama humano RE positivas (Lee, Oesterreich, & Davidson, 2015).

Las células MCF-7 han servido como un modelo para el estudio de la respuesta del estrógeno tanto *in vitro* e *in vivo*. La vía de señalización RE es un ejemplo de una vía biológica compleja que controla una variedad de funciones tales como proliferación celular, apoptosis y angiogénesis que son explotadas por células de cáncer de mama para servir como una vía de supervivencia principal impulsada por la hormona femenina estrógeno (Osborne & Schiff, Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer., 2013). Estudios más recientes han demostrado que el estrógeno simultáneamente induce y reprime un gran número de genes, lo que indica una compleja red de cambios que se coordinan para alterar el crecimiento (Lee, Oesterreich, & Davidson, 2015).

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se obtuvo de un paciente en 1973 en el Centro de Cáncer M.D. Anderson. Con morfología epitelial, las células de cáncer de mama MDA-MB-231 aparecen fenotípicamente como células en forma de huso. *In vitro*, la línea celular MDA-MB-231 tiene un fenotipo invasivo. La línea celular MDA-MB-231 también es capaz de crecer en agarosa, un indicador de transformación y tumorigenicidad, y muestra una eficiencia de formación de colonias relativamente alta. *In vivo*, las células MDA-MB-231 forman tumores de almohadillas de grasa mamaria en ratones desnudos. Se ha demostrado que la inyección intravenosa de células en la vena de la cola de ratones desnudos produce metástasis experimental (Cell Biolabs INC., 2016).

Clínicamente, el cáncer de mama puede dividirse en distintos subtipos que tienen implicaciones en el pronóstico y el tratamiento. Los pacientes con cáncer de mama por lo general tienen la expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), y la amplificación del oncogen HER-2 / Neu. La línea celular MDA-MB-231 de cáncer de

mama carece de estos tres marcadores moleculares, lo que caracteriza al cáncer del tipo basal epitelial o triple negativo (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010).

El tratamiento de pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN), que carece de la expresión de RE, PR y HER-2 / Neu, ha sido un desafío debido a la heterogeneidad de la enfermedad y la ausencia de objetivos moleculares bien definidos. Los triples negativos constituyen entre el 10% y el 20% de todos los cánceres de mama, afectan más frecuentemente a los pacientes más jóvenes y son más frecuentes en las mujeres afroamericanas (Lehmann, y otros, 2011). Dada la falta de objetivos moleculares validados y el mal resultado en los pacientes con CMTN, existe una clara necesidad de una mayor comprensión de CMTN en todos los niveles y el desarrollo de mejores terapias (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010).

La línea epitelial no tumoral MCF-10 es un modelo de un estado basal del epitelio de mama, esta línea celular es negativa para receptores hormonales (RE- y RP-) así como para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-) y, expresa marcadores comúnmente asociados con el fenotipo basal del tejido epitelial. Esta línea fue obtenida a partir de una mastectomía de una mujer pre-menopáusica de 36 años de edad con enfermedad fibroquística (Debnath, Muthuswamy, & Brugge, 2003).

#### 1.4 Muerte celular.

La muerte celular, se refiere a la apoptosis, la autofagia y la necrosis programada, son los mecanismos de muerte celular ante cualquier patología, como una mediada de un programa intracelular. Estas tres formas de muerte celular programada pueden decidir conjuntamente el destino de las células de neoplasias malignas, la apoptosis y la necrosis programada contribuyen invariablemente a la muerte celular, mientras que la autofagia puede desempeñar papeles pro-supervivencia o pro-muerte (Ouyang, y otros, 2012).

La expresión apoptosis se puede describir como un aspecto morfológico específico de la muerte celular. La apoptosis se acompaña de un redondeo de la célula, retracción de los pseudópodos, reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrhexis), clásicamente de poca o ninguna modificación

ultraestructural de organelos citoplásmicos, el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática hasta las etapas finales del proceso y engullimiento por fagocitos residentes (*in vivo*). Por lo tanto, el término "apoptosis" debe aplicarse exclusivamente a los eventos de muerte celular que ocurren mientras se manifiestan varias de estas características morfológicas. Cabe señalar que no es correcto suponer que la muerte celular programada y la apoptosis son sinónimos porque la muerte celular, tal como ocurre durante el desarrollo fisiológico, puede manifestar características no apoptóticas (Kroemer, y otros, 2009).

El cáncer, una compleja enfermedad genética resultante de la mutación de oncogenes o genes supresores de tumores, puede desarrollarse debido a la alteración de las vías de señalización; Se ha sabido que tiene numerosos vínculos con la muerte celular programada. La apoptosis es el principal tipo de muerte celular que ocurre cuando el daño del ADN es irreparable. Existen dos vías principales para inducir la apoptosis, la vía del receptor de muerte extrínseca y la vía intrínseca-mitocondrial. La vía extrínseca se desencadena mediante la unión del receptor de muerte transmembranal Fas (y otros receptores similares, como el receptor de necrosis tumoral 1 y sus familiares) con su ligando extracelular, Fas-L. Cuando ocurren estímulos de muerte, Fas-L se combina con Fas para formar un complejo de muerte. El compuesto Fas / Fas-L recluta la proteína que contiene dominio de muerte (FADD) y pro-caspasa-8, agregándose para convertirse en el complejo de señalización inductor de muerte (CSIM). En consecuencia, el complejo proteico activa su pro-caspasa-8, que procede a desencadenar pro-caspasa-3, la penúltima enzima para la ejecución del proceso apoptótico. La vía intrínseca también conduce a la apoptosis bajo el control de proenzimas mitocondriales. En ambos casos, si una célula se inicia por estímulos extracelulares o señales intracelulares, las membranas mitocondriales externas se vuelven permeables al citocromo interno c, que luego se libera en el citosol. El citocromo C recluta Apaf-1 y pro-caspasa-9 para componer el apoptosoma, el cual desencadena una cascada de señalización de las caspasas -9 y -3, culminando (como concluye la vía extrínseca) en apoptosis. La acumulación de pruebas ha demostrado que las expresiones anormales de algunos factores reguladores clave pueden conducir al cáncer, lo que indica las complejas relaciones entre la apoptosis y el cáncer (Ouyang, y otros, 2012).

La Anexina V es una proteína de unión a fosfatidilserina recombinante que interactúa fuerte y específicamente con residuos de fosfatidilserina y puede usarse para la detección de apoptosis. Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán necesariamente en respuesta al mismo estímulo. La irradiación o las drogas usadas para la quimioterapia del cáncer dan lugar a daño del ADN en algunas células, que pueden conducir a la muerte apoptótica a través de una vía p53-dependiente. Algunas hormonas, como los corticosteroides, pueden conducir a la muerte apoptótica en algunas células, aunque otras células no se ven afectadas o estimuladas (Elmore, Apoptosis: A review of programmed cell death, 2007).

La autofagia es un mecanismo catabólico principal, regulado, con muchos enlaces a procesos que ocurren en células malignas, y altamente regulado por algunos genes relacionados con la autofagia (ATGs). Es un mecanismo crucial que responde al estrés extra o intracelular y puede resultar en supervivencia celular bajo ciertas circunstancias, sin embargo, la sobre activación de la autofagia puede resultar en muerte celular autofágica. Al analizar las relaciones entre la autofagia y el cáncer, un reto común es determinar si la autofagia protege la supervivencia celular o contribuye a la muerte celular (Ouyang, y otros, 2012).

La muerte celular autofágica se define morfológicamente (especialmente por microscopía electrónica de transmisión) como un tipo de muerte celular que se produce en ausencia de condensación de la cromatina, pero acompañada de una vacuolización autofágica masiva del citoplasma. Las células que mueren con morfología autofágica tienen poca o ninguna asociación con los fagocitos, a diferencia de las células apoptóticas (cuya depuración está asegurada por el engolfamiento y la degradación lisosomal). Aunque la expresión 'muerte celular autofágica' es una invitación lingüística a creer que la muerte celular es ejecutada por autofagia, el término simplemente describe la muerte celular con autofagia (Kroemer, y otros, 2009).

La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por una ganancia en el volumen celular (oncosis), hinchazón de los organelos, rotura de la membrana plasmática y posterior pérdida del contenido intracelular. Durante mucho tiempo, la necrosis se ha

considerado meramente como una forma accidental descontrolada de muerte celular, pero se está acumulando evidencia de que la ejecución de la muerte celular necrótica puede ser finamente regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos (Kroemer, y otros, 2009).

La necrosis puede ser un evento programado, tanto en su ocurrencia como en su mecanismo: (1) la muerte celular con apariencia necrótica puede contribuir al desarrollo embrionario ya la homeostasis del tejido adulto, (2) la muerte celular necrótica puede ser inducida por ligandos que se unen a receptores específicos de membrana plasmática, y (3) la necrosis puede ser regulada por factores genéticos, epigenéticos y farmacológicos). Además, la inactivación de las caspasas provoca un cambio de la apoptosis a morfologías con características mixtas necróticas y apoptóticas o a una necrosis total (Galluzzi & Kroemer, 2008).

Recientemente, el término necroptosis se ha utilizado para designar un tipo particular de necrosis programada que depende de la actividad serina / treonina quinasa de RIP1 (Kroemer et al., 2008). De hecho, RIP1 representa el objetivo molecular de una nueva clase de agentes citoprotectores, las necrostatinas

Existen varios mediadores, orgánulos y procesos celulares han sido implicados en la muerte celular necrótica, pero aún no está claro cómo se interrelacionan entre sí. Los elementos causales de la necrosis no son claros, así como sus efectos espectadores. Estos fenómenos incluyen alteraciones mitocondriales (por ejemplo, desacoplamiento, producción de especies reactivas de oxígeno, es decir, ROS, estrés nitroxidativo por óxido nítrico y permeabilización de la membrana mitocondrial, frecuentemente controlada por ciclofilina D), cambios lisosómicos, (reacciones de Fenton, permeabilización de la membrana lisosomal), cambios nucleares (hiperactivación de PARP-1 e hidrólisis concomitante de NAD), degradación lipídica (tras la activación de fosfolipasas, lipoxigenasas y esfingomielinasas), aumenta la concentración citosólica de calcio  $Ca^{+2}$  La sobrecarga mitocondrial y la activación de proteasas no caspasas (por ejemplo, calpains y catepsinas). En varios (pero no todos) casos de muerte celular necrótica, se ha demostrado un papel crucial para la serina / treonina quinasa RIP1 (Kroemer, y otros, 2009). Recientemente, el término necroptosis se ha utilizado para designar un tipo particular de



necrosis programada que depende de la actividad serina / treonina quinasa de RIP1 (Galluzzi & Kroemer, 2008).

### 1.5 Fitofármacos como alternativa para el tratamiento del cáncer de mama.

Como se mencionó existen diversos tipos de tratamientos para el cáncer de mama, pueden ser locales son aquellos que tratan el tumor sin afectar al resto del cuerpo como la cirugía y radio terapia, o tratamientos sistémicos que son con fármacos, que se pueden administrar por vía oral o directamente al torrente sanguíneo como quimioterapia y hormonoterapia (ACS, 2016). Entre los medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama, se incluyen los siguientes (tabla 1) (BreastCancer, 2015).

Tabla 1 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama

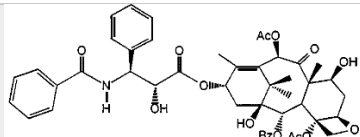
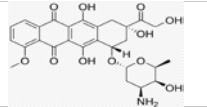

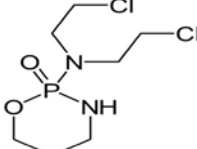
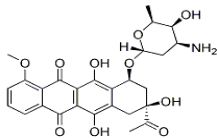
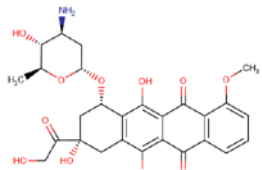
Nombre	Nombre genérico	Origen	Molécula	Referencia
Abraxane	Paclitaxel unido a albúmina	Botánico		(Miele, Spinelli, Miele, Tomao, & Tomao, 2009)
Adriamicina Doxil	Doxorrubicina	Biológico		(Shahi & Manga, 2007)
Carboplatino	Paraplatin	Sintético		(de Sousa, Wlodarczky, & Monteiro, 2014)
Cytosan	Ciclofosfamida	Sintético		(Lieberman, Druker, Refojo, & Arzt, 2008)
Daunorrubicina	Cerubidine	Biológico		(Hande, 1998)
Ellence	Epirubicina	Biológico		(Tanei, y otros, 2009)

Tabla 2 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama (continuación)

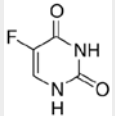

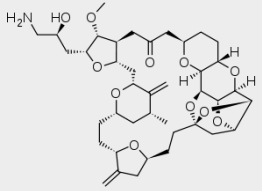
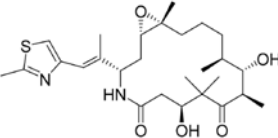
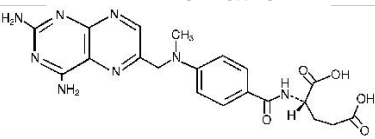
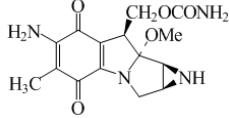
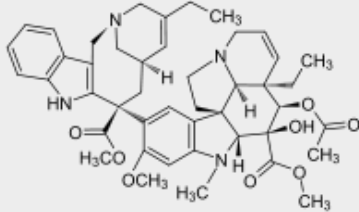
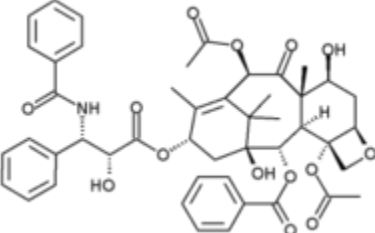
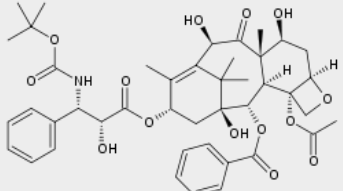
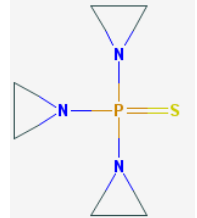
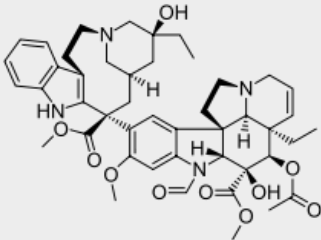
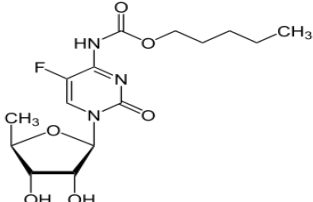
Fluorouracilo	Adrucil	Sintético		(Jin, y otros, 2003)
Gemzar	Gemcitabina	Sintético		(Carmichael, y otros, 1995)
Halaven	Eribulina	Sintético		(Cortes, y otros, 2011)
Ixempra	Ixabepilona	Producto natural Semisintético		(Thomas, y otros, 2007)
Metotrexato	Amethopterin Mexate Folex	Sintético		(García, y otros, 2009)
Mitomicina	Mutamicina	Biológico		(Flores, y otros, 2008)
Navelbine	Vinorelbina	Botánico		(Menendez, Colomer, & Lapu, 2004)
Taxol	Paclitaxel	Botánico		(Klauber, Paragi, Flynn, Hamel, & D'Amato, 1997)
Taxotere	Docetaxel	Producto natural Semisintético		(Esteva, y otros, 2002)

Tabla 3 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama (continuación)

Tiotepa	Thioplex	Sintético		(Antman, y otros, 1992)
Vincristina	Oncovin Vincasar PES Vincrex	Botánico		(Misset, y otros, 1996)
Xeloda	Capecitabina	Sintético		(O'Shaughnessy, y otros, 2002)

Biológico generalmente, un péptido o molécula aislados de un organismo / línea celular o producidos por biotecnología en un huésped sustituto, botánico producto natural de origen vegetal, producto natural semisintética derivado de un producto natural y generalmente tiene una modificación semisintética (Newmann & Cragg, 2012).

Algunos síntomas de los medicamentos que componen a la quimioterapia para el cáncer de mama son bajo recuento de glóbulos blancos, anemia (bajo recuento de glóbulos rojos), infecciones, hinchazón (edema), náusea, vómito, diarrea, neuropatía (daño nervioso), dolor muscular o articular y períodos irregulares, esto puede incluir la cesación temporal (por lo general se reanuda después de que la medicación se completa) o el cese definitivo de los períodos menstruales dependiendo de la edad y otros factores (BreastCancer, 2015).

Las terapias contra el cáncer están limitadas por las bajas concentraciones de fármacos que llegan al tumor. La eliminación rápida y la distribución generalizada del fármaco en órganos y tejidos no enfermos requiere su administración en grandes cantidades que a menudo da como resultado toxicidad sistémica y efectos adversos (Bassiouni & Faddah, 2012).

A pesar de la creciente incidencia del cáncer de mama, la mortalidad de la enfermedad ha estado disminuyendo en la mayoría de los países desarrollados debido al uso de la terapia sistémica en el cáncer de mama temprano, aunque el riesgo de recurrencia del cáncer es mayor durante la primera década, puede ser importante durante la segunda década después del diagnóstico. El objetivo principal del tratamiento adyuvante sistémico es controlar cualquier enfermedad micrometastásica, reducir la tasa de recurrencia y mejorar la supervivencia a largo plazo. Dado que la mayor parte de la mejoría en la mortalidad por cáncer de mama es producida por la quimioterapia adyuvante, terapia hormonal y por radioterapia adyuvante (Hassan, Ansari, Spooner, & Hussain, 2010).

Aunque con el avance de una mayor comprensión del uso de terapias adyuvantes para el cáncer de mama en etapa temprana, el tratamiento de la enfermedad metastásica sigue siendo un reto importante. El uso de antraciclinas y taxanos en el contexto del adyuvante ha llevado a un número cada vez mayor de mujeres con enfermedad metastásica que ya han estado expuestas a estos agentes, lo que se suma a las complejidades del manejo de la enfermedad (Hassan, Ansari, Spooner, & Hussain, 2010).

El desarrollo de la resistencia a los agentes quimioterapéuticos es otro de los principales retos en el tratamiento efectivo del cáncer. Las células tumorales son capaces de generar resistencia a múltiples fármacos a la mayoría de fármacos anti-cáncer. La resistencia al tratamiento resulta de una variedad de factores incluyendo variaciones individuales y diferencias genéticas de células somáticas en tumores, incluso los del mismo tejido (Bassiouni & Faddah, 2012).

La toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos crea a veces un problema significativo en su tratamiento por lo tanto se han propuesto varias terapias para el tratamiento del cáncer, muchas de las cuales utilizan productos derivados de plantas. En la actualidad existen cuatro clases de agentes anticancerosos derivados de las plantas, los alcaloides derivados de la vinca (vinblastina, vincristina y vindesina), las epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y los derivados de camptotecina (camptotecina e irinotecán). Las plantas todavía tienen un enorme potencial para proporcionar nuevos fármacos y como tal son un depósito de productos químicos naturales que pueden proporcionar quimioprotector potencial contra el cáncer (Desai, y otros, 2008).

Los fármacos contra el cáncer en un marco de tiempo cubierto de 1940 al 2010 se han aprobado 206 fármacos contra el cáncer en todo el mundo de los cuales 11.1% son productos de origen natural, 1% es un producto natural botánico (esta clasificación es reciente), 32.3% son derivados de un producto natural y suelen tener modificaciones semisintética, 20.2% es una droga totalmente sintética, 16.2% es una droga totalmente sintética pero una imitación de un producto natural, 11.1% está hecho por síntesis, pero el fármaco es un producto natural y 8.1% está hecho por síntesis, pero el fármaco es una imitación de un producto natural. El 20.2% del total de fármacos contra el cáncer las moléculas se clasifican en la categoría sintética y con una proporción del 79.8% corresponde a los no biológicos pero eran productos naturales en sí o se basaban en ellos, o imitaban productos naturales de una forma u otra (Newmann & Cragg, 2012).

Los productos naturales son metabolitos secundarios son moléculas pequeñas que contribuyen a la supervivencia del organismo. Estas sustancias muestran una considerable diversidad estructural y "andamios privilegiados", es decir, arquitecturas moleculares que se adaptan a la unión a proteínas. Los productos naturales han evolucionado para unir objetivos biológicos y obtener efectos biológicos como armas químicas o para transmitir información de un organismo a otro (Basmadjian, y otros, 2014).

#### 1.6 Biosíntesis de los principios activos.

Gracias a la mejora de las técnicas bioquímicas y al surgimiento de la biología molecular, se ha demostrado claramente que los metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas a su medio ambiente. Estas moléculas contribuyen en gran medida a la aptitud de la planta al interactuar con los ecosistemas. Se han descrito como antibióticos, antifúngicos y antivirales, y por lo tanto son capaces de proteger a las plantas de los patógenos (fitoalexinas), y también anti-germinativo o tóxico para otras plantas (alelopatía). Además, constituyen importantes compuestos absorbentes de UV, evitando así graves daños a las hojas de la luz. Los metabolitos secundarios de las plantas suelen clasificarse de acuerdo con sus vías biosintéticas. Se consideran generalmente tres familias de moléculas grandes: fenólicos, terpenos y esteroides, y alcaloides (Bourgaud, Gravot, Milesi, & Gontier, 2001).

La vía del mevalonato es una vía metabólica importante que proporciona a las células moléculas bioactivas esenciales, vitales en múltiples procesos celulares. Esta vía convierte el mevalonato en esteroides isoprenoides, como el colesterol, precursor indispensable de los ácidos biliares, las lipoproteínas y las hormonas esteroideas y en una serie de moléculas hidrófobas, los isoprenoides de nonsterol. Estos intermedios de la vía biosintética del mevalonato desempeñan un papel importante en la modificación post-traducciona de una multitud de proteínas implicadas en la señalización intracelular y son esenciales en el crecimiento y diferenciación celular, la expresión, la glicosilación de proteínas y el montaje citoesquelético (Buhaescu & Izzedine, 2007).

A principios del siglo XX, las investigaciones estructurales de muchos terpenoides llevaron a Otto Wallach a formular la "regla del isopreno", que postulaba que la mayoría de los terpenoides podrían construirse hipotéticamente uniendo repetidamente unidades de isopreno. Este principio proporcionó el primer marco conceptual para una relación estructural común entre los productos naturales terpenoides (Buchanan, Grusissem, & Jones, 2015).

La enzimología básica de la biosíntesis de isopentenil difosfato (IPP) a través de la vía acetato/mevalonato es ampliamente aceptada. Esta vía IPP citosólica implica la condensación en dos etapas de tres moléculas de acetil-CoA catalizadas por tiolasa e hidroximetilglutaril-CoA sintasa. El producto resultante, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), se reduce posteriormente mediante HMG-CoA reductasa en dos reacciones acopladas que forman ácido mevalónico. Dos moléculas de ATP ceden dos átomos de fosfato al ácido mevalónico para transformarlo en ácido mevalónico 5-difosfato (MVAPP) subsecuentemente una descarboxilación mediante la enzima MVAPP descarboxilasa que da resultado al isopentenil difosfato (IPP). El IPP se utiliza en una secuencia de reacciones de alargamiento para producir una serie de homólogos prenil difosfato, que sirven como precursores inmediatos de las diferentes familias de terpenoides. La isomerización de IPP por IPP isomerasa produce el isómero alílico dimetilalil difosfato (DMAPP) que se considera el primer prenil difosfato. Debido a que DMAPP y los prenil difosfatos relacionados contienen un doble enlace alílico, estos compuestos pueden ionizarse para generar carbocaciones estabilizadas por resonancia. Una vez formado, un intermedio de

carbocación de  $n$  carbonos puede reaccionar con IPP para producir un grupo prenilo Difosfato homólogo que contiene  $n+5$  carbonos. De este modo, el cebador reactivo DMAPP experimenta condensación con IPP para producir el GPP intermedio C10. La repetición del ciclo de reacción por adición de una o dos moléculas de IPP proporciona FPP (C15) o GGPP (C20), respectivamente. Cada homólogo de prenilo en la serie surge como un éster de difosfato alílico que puede ionizarse para formar un carbocación estabilizado por resonancia y condensarse con IPP en otra ronda de elongación (Buchanan, Grusissem, & Jones, 2015) .

Los terpenoides forman una familia grande y estructuralmente diversa de productos naturales derivados de unidades de isopreno C5 unidas de una manera de cabeza a cola. Las estructuras típicas contienen esqueletos de carbono representados por (C5) y están clasificados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40). Relativamente pocos de los terpenoides naturales se ajustan exactamente al concepto simple de una combinación lineal de cabeza a cola de unidades de isopreno como se observa con geraniol (C10), farnesol (C15) y geranylgeraniol (C20). El escualeno (C30) y el fitoeno (C40), aunque formados enteramente de unidades de isopreno, muestran un enlace de cola a cola en el centro de las moléculas. La mayoría de los terpenoides se modifican adicionalmente mediante reacciones de ciclación. La disposición lineal de unidades de isopreno puede ser mucho más difícil de apreciar en muchas otras estructuras cuando se han producido reacciones de transposición por ejemplo los esteroides donde, además, se han perdido varios átomos de carbono. No obstante, dichos compuestos se forman por medio de precursores terpenoides regulares. Los terpenoides comprenden el grupo más grande de productos naturales, con más de 35 000 miembros conocidos (Dewick, 2009).

El escualeno es un hidrocarburo aislado originalmente del aceite de hígado de tiburón (*Squalus sp.*), Pero posteriormente se encuentro en el hígado de ratas y levadura, y estos sistemas se usaron para estudiar su papel biosintético como precursor de triterpenos y esteroides. Los esqueletos triterpenoides pentacíclicos como por ejemplo el lupeol se encuentran frecuentemente como una estructura de saponina triterpenoide. Las saponinas son glucósidos que, incluso a bajas concentraciones, producen una espumación en solución

acuosa, porque tienen propiedades tensioactivas y similares al jabón. El nombre proviene del latín *sapo*, que significa jabón, y los materiales vegetales que contienen saponinas se usaron originalmente para limpiar ropa. La hidrólisis catalizada por ácido de las saponinas libera azúcares y una aglicona (sapogenina) que puede ser un triterpenoide o esteroide (Dewick, 2009).

Los esteroides son triterpenoides modificados que contienen el sistema de anillo tetracíclico de lanosterol, pero carecen de los tres grupos metilo en C-4 y C-14. El colesterol tipifica la estructura fundamental, pero con otras modificaciones, especialmente en la cadena lateral, ayudan a crear una amplia gama de productos naturales biológicamente importantes, como esteroides, saponinas esteroideas, glucósidos cardioactivos, ácidos biliares, corticosteroides y hormonas sexuales de mamíferos. Debido a las profundas actividades biológicas encontradas, muchos esteroides naturales y un número considerable de compuestos esteroideos sintéticos y semisintéticos se emplean rutinariamente en medicina (Dewick, 2009).

El ácido shikímico es un precursor de los aminoácidos aromáticos, tales como fenilalanina, tirosina y triptófano, que conducen a indoles, derivados de tipo indol y alcaloides. Además, la vía del ácido shikímico conduce a un gran número de compuestos fenólicos, en particular, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y cumarinas (Cooper & Nicola, 2015).

La ruta del shikimato comienza con un acoplamiento de fosfoenolpiruvato (PEP) de la vía glicolítica y d-eritrosa 4-fosfato del ciclo de pentosa fosfato para dar el 7-fosfato de ácido 7-carbonato de 3-desoxi-draabano-heptulosónico (DAHP). Esta reacción es una condensación de tipo aldol, se sabe que es mecánicamente más compleja en la versión catalizada por enzimas. La eliminación del ácido fosfórico del DAHP seguida de una reacción aldólica intramolecular genera el primer ácido carbocíclico intermedio 3-deshidroquinico. La eliminación del ácido fosfórico sigue en realidad una oxidación dependiente de NAD<sup>+</sup> del hidroxilo central, y este se vuelve a formar en una reacción de reducción dependiente de NADH sobre el compuesto carbonilo intermedio antes de que ocurra la reacción aldólica. Todos estos cambios se producen a través de la función de una sola enzima, la 3-deshidroquinato sintasa. La reducción del ácido 3-deshidroquinico conduce al ácido quinico, un producto natural bastante común que se encuentra en forma



libre, como ésteres, o en combinación con alcaloides tales como quinina. El ácido shikímico en sí mismo se forma a partir del ácido 3-dehidroquinico a través del ácido 3-dehidroshikímico a través de pasos de deshidratación (3-deshidroquinasa) y reducción (shikimato deshidrogenasa). Según el organismo, se reconocen dos tipos distintos de enzimas dehidroquinasa, y éstos emplean diferentes mecanismos de reacción. Una enzima bifuncional cataliza los dos pasos en las plantas (Dewick, 2009).

Los ácidos fenólicos simples ácido protocatequídico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico) y ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) pueden formarse por reacciones que se ramifican partir del ácido 3-deshidroshikímico que implican deshidratación y enolización o, en el caso del ácido gálico, deshidrogenación y enolización. El ácido gálico se caracteriza como un componente de muchos taninos. Un compuesto que se ramifica en diversos productos por medio de varias reacciones y de gran importancia en la vía de shikimato es el ácido coriónico, que ha incorporado una molécula adicional de PEP como una cadena lateral de enol éter. Una simple reacción de fosforilación dependiente de ATP produce ácido 3-fosfato de ácido shikímico, y esto es seguido por una reacción de eliminación de adición con PEP para dar 3-fosfato de ácido 5-enolpiruvil-shikimico (EPSP). Esta reacción es catalizada por la enzima EPSP sintasa. El derivado sintético de la N- (fosfometil) glicina glifosato es un poderoso inhibidor de esta enzima, y se cree que se une al sitio de unión a la PEP en la enzima. El glifosato encuentra un uso considerable como un herbicida de amplio espectro, la planta muriendo debido a su incapacidad para sintetizar aminoácidos aromáticos transforma del EPSP en ácido coriónico. El ácido coriónico puede aminarse con amoníaco (generado a partir de glutamina como nucleófilo) en C-4 para dar el ácido 4-amino-4-desoxicorismico y luego el ácido p-aminobenzoico (PABA), o en C-2 para dar el análogo del ácido isocorisámico que producirá ácido 2-aminobenzoico (antranílico). El ácido antranílico es un intermedio en la ruta biosintética al aminoácido aromático que contiene indol-1-triptófano. Aunque un precursor de 1-triptófano, el ácido antranílico también puede ser producido por el metabolismo del triptófano. Ambos compuestos presentan como bloques de construcción para una variedad de estructuras de alcaloides (Dewick, 2009).

En la vía shikimato, se produce un proceso de transposición singular, transformando el ácido corísmico en ácido prefénico. La ruta metabólica a los aminoácidos aromáticos l-fenilalanina y l-tirosina a través del ácido prefénico pueden variar de acuerdo con el organismo, frecuentemente más de una ruta puede operar en una especie determinada según las actividades enzimáticas disponibles. En esencia, sólo están implicadas tres reacciones, la aromatización descarboxilativa, la transaminación y, en el caso de la biosíntesis de tirosina, una oxidación, pero el orden en que se producen estas reacciones diferencia las rutas. El ácido l-aórgeno es el resultado de la transaminación del ácido prefénico que tiene lugar antes de la aromatización descarboxilativa y puede transformarse en l-fenilalanina y l-tirosina dependiendo de la ausencia o presencia de una actividad enzimática de deshidrogenasa adecuada. La L-fenilalanina y la L-tirosina, como bloques de construcción C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>, son precursoras de una amplia gama de productos naturales. En las plantas, un primer paso frecuente es la eliminación del amoníaco de la cadena lateral para generar el ácido trans (E) cinámico apropiado. En el caso de la fenilalanina, esto daría ácido cinámico, mientras que la tirosina podría producir ácido 4-cumárico. La hidroxilación de los ácidos cinámicos orto a la cadena lateral como se observa en la biosíntesis del ácido salicílico es un paso crucial en la formación de un grupo de derivados de la lactona del ácido cinámico, las cumarinas (Dewick, 2009).

Los ácidos cinámicos, como sus ésteres de coenzima A, también pueden funcionar como unidades de arranque para la extensión de la cadena con unidades de malonil-CoA a través de PKS (policétido sintasa), combinando así elementos de las vías shikimato y acetato. Más comúnmente, se añaden tres unidades C<sub>2</sub> a través de malonato, dando lugar a flavonoides y estilbenos. Los flavonoides y estilbenos son productos de una unidad de inicio de cinamoil-CoA, con una extensión de cadena utilizando tres moléculas de malonil-CoA. Las reacciones se catalizan mediante una enzima PKS, de tipo III. Estas enzimas no utilizan ACPs (proteínas acarreadoras de acilos), sino que emplean a la vez los ésteres de coenzima A y tienen un solo sitio activo para realizar las reacciones necesarias como la extensión de cadena, condensación y ciclación. La extensión de la cadena de 4-hidroxicinamoil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA da inicialmente un policétido que puede doblarse de dos formas diferentes. Se llevan a cabo las reacciones de Claisen o aldol que producen la generación de anillos aromáticos. Los estilbenos por ejemplo, resveratrol o chalconas como

naringenina-chalcona son los productos finales formados por enzimas sintasa de estilbeno y sintasa de chalcona, respectivamente. Ambas estructuras ilustran bien los diferentes patrones característicos de oxigenación en los dos anillos aromáticos derivados de las vías de acetato o shikimato. Las Chalconas actúan como precursores de una amplia gama de derivados de flavonoides encontrados a lo largo del reino vegetal. La mayoría de los flavonoides contienen un anillo heterocíclico de seis miembros, formado por ataque nucleofílico tipo Michael de un grupo fenólico sobre la cetona insaturada para dar una flavanona. Las flavanonas pueden entonces dar lugar a muchas variantes en este esqueleto básico como flavonas, flavonoles, antocianidinas y catequinas. La mayoría de los sistemas enzimáticos muestran una especificidad de sustrato bastante amplia y convierten compuestos con diferentes patrones de oxigenación en el sustituyente arilo (Dewick, 2009).

### 1.7 Plantas medicinales y su efecto en el cáncer.

La República Mexicana es uno de los cinco países con mayor diversidad del mundo dado que alrededor del 50% de las 30000 especies de plantas vasculares son endémicas. Más de 3000 de estas plantas se usan medicinalmente, es el 10% de la riqueza florística total del país. Actualmente, en México hay alrededor de 4000 especies con atributos medicinales que corresponde al 15% de la flora total (Muñiz, Palomo, & Vega, 2012).

En este trabajo se utilizarán las siguientes especies vegetales a las que se les atribuye propiedades anticancerígenas que son tejocote (*Crataegus pubescens*), muicle (*Justicia spicigera*) y cancerina (*Hippocratea excelsa* Kunth).

En México, *Hippocratea excelsa* ó *Semialarium mexicanum* es llamada popularmente mata piojo, misegbat (Oaxaca), barajillo (Guerrero), piojo, zipche (Chiapas) y palo de reguilete (Yucatán). En medicina tradicional se le conoce como cancerina y ha sido principalmente utilizada para el tratamiento de enfermedades como las úlceras gástricas, cáncer, los padecimientos renales, las afecciones de la piel, la amenorrea y algunas infecciones uterinas, (Fernandez, Morales, & Angeles, 1998). La cancerina, es una especie de árbol pertenecientes a la familia *Celastraceae*, son árboles bajos con ramas patentes, que alcanza un tamaño de hasta 8 m de alto, o arbustos de 2 m de alto o trepadoras gruesas y

escandentes. Las hojas son ovaladas o elíptico-oblongas, de 4 a 10 cm de largo y 2 a 6 cm de ancho (CONABIO, CONABIO, 1998).

*Semialarium mexicanum* (sinónimo de, *Hippocratea excelsa Kunth*), presento actividad citotóxica contra la línea celular HCT-15 (adenocarcinoma Colon rectal) con valores de ED50 inferiores a 10 µg/mL, (Herrera, y otros, 2016). Se obtuvieron extractos metanolicos de cinco poblaciones diferentes de *Hippocratea Celastroides* y presentaron actividad citotóxica frente a líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo (KB), de mama (MCF-7) y de colon (HCT-116) con valores de ED50 entre 1.18 y 9.77 µg/mL (Hinojosa, y otros, 2014).

Se han encontrado y aislado diferentes triterpenos con actividad para el tratamiento de parásitos protozoarios en las raíces cancerina (*Hippocratea excelsa Kunth*) que son los siguientes el 21-hidroxiolean-12-en-3-uno, secodinin-triterpenoide llamado dzununcanona, 21R-hidroxi-oxofriedelano, pristimerina, tingenona y xuxarina (Rejón, y otros, 2007).

Pristimerina es un triterpenoide natural y se ha aislado de *Celastrus* y *Maytenus* que pertenecen a la familia *Celastraceae*. Estudios previos han demostrado que la pristimerina tiene actividad antiinflamatoria y puede inhibir la proliferación de células tumorales mediante la inhibición de la vía NF-κB y el ciclo celular. Además, se ha informado que la pristimerina induce apoptosis por la vía de las caspasas de las células de cáncer de mama y células de cáncer de próstata *in vitro*. El efecto inhibitorio de la pristimerina sobre la migración e invasión de células de cáncer de mama parecía estar asociado con su capacidad para inhibir la actividad del proteasoma similar a la quimotripsina y para aumentar los niveles de RGS4 en células de cáncer de mama. Evidentemente, el tratamiento con el inhibidor de proteasoma MG132 también inhibió la migración de células de cáncer de mama y la invasión. Además, la disminución de RGS4 como expresión de la migración de células cancerígenas y la invasión. En particular, la pristimerina tiene un efecto inhibitorio más potente que la MG132 sobre la migración e invasión de RGS4 silenciando células de cáncer de mama *in vitro*. Este efecto altamente inhibitorio sugiere que la pristimerina también puede afectar a otras moléculas implicadas en la regulación de la metástasis del cáncer (Li, Wang, & Jiang, 2012).

En algunos estados como Yucatán a *Justicia spicigera* se le conoce con el nombre de chak lool, ts'i'its y yichkaan, y en la Huasteca Potosina se le conoce comúnmente como muicle o muite. Se puede describir como una hierba erecta o trepadora perene. Sus hojas son pecioladas con un margen de la hoja que generalmente es entero. Las brácteas y bractéolas son generalmente visibles y superpuestas. La corola se puede observar, con un labio posterior que es generalmente de dos lóbulos, un labio anterior que es de tres lóbulos, dos estambres y una cápsula con cuatro semillas. La infusión de las hojas de *Justicia spicigera* se emplea para la hipertensión, la anemia, durante periodos de menstruación en mujeres, parásitos intestinales, inflamación, diarrea, depurativo de la sangre y leucemia. También se le han atribuido propiedades anticancerígenas y antidiabéticas (Cruz, 2015).

La actividad citotóxica que se observó con el extracto etanólico de *J. spicigera* tuvo un valor de  $ED_{50} = 0,43 \mu\text{g} / \text{ml}$  en la línea celular T47D de cáncer de mama humano y en la línea celular HeLa (cáncer de cérvix) fue  $ED_{50} = 5.59 \mu\text{g/mL}$  con un extracto acuoso (Avila, Serna, Aguilar, & Lezama, 2009).

El extracto de la planta entera de *J. spicigera* contiene factores citotóxicos para células leucémicas y no tiene actividad proliferativa en células progenitoras hematopoyéticas normales. El extracto de planta induce apoptosis en la línea celular de leucemia humana TF-1, pero no en la línea celular transfectante bcl-2 TB-1. Estos datos sugieren una fuerte correlación entre el efecto citotóxico y la proliferación celular. Los resultados indican que la infusión de las partes aéreas de *J. spicigera* no contiene actividad hematopoyética, induce la apoptosis inhibida por bcl-2, y está relacionada con la proliferación celular (Correâ & Alcântara, 2012).

La actividad antimicrobiana y antiinflamatoria del flavonoide kaempferitrin, así como sus efectos sobre la regulación de los macrófagos y la reducción de los niveles de glucosa en sangre están relacionados con los usos populares de *J. spicigera* en terapias giardicidas, antiinflamatorias, anticancerosas y antidiabéticas (Correâ & Alcântara, 2012).

La determinación fitoquímica en los extractos de etanol, acuoso y decocción de *J. spicigera* mostró compuestos de flavonas. Kaempferol-3,7-bisrhamnosida (kaempferitrin) es una flavona que ha sido previamente aislada del extracto de etanol obtenido de hojas de *J. spicigera*. La kaempferitrina (II) es otra flavona aislada de la fracción de metanol soluble

del extracto de *J. spicigera* de hexano-éter-metanol (Avila, Serna, Aguilar, & Lezama, 2009).

El tejocote pertenece a la familia de las *Rosáceas*, al género *Crataegus*, el cual agrupa alrededor de 150 especies en todo el mundo. En México, el género *Crataegus* está integrado por quince especies todas conocidas como tejocote, trece de las cuales se encuentran en el norte y en el centro del país, mientras que dos habitan en el sur. Diez de esas especies son endémicas. Se han encontrado en 20 de los 32 estados de la República Mexicana. Las regiones donde se encuentra más abundante la especie son las que se ubican en la Sierra Madre Oriental, en la Occidental y la del Sur, así como en el eje neo-volcánico de clima templado, semidesértico, desértico y subtropical. Esta especie crece silvestre, pero también se cultiva. Los frutos de este género son muy apreciados en México por el contenido en vitamina C de sus infusiones (tés), las cuales se usan para prevenir enfermedades respiratorias (Corona, 2013).

*Crataegus pubescens* o *Crataegus mexicana* es un árbol o arbusto caducifolio, de 4 a 10 metros de altura y a menudo provisto de espinas, la copa es ovoide extendida proporciona una sombra densa y las hojas son simples, alternas, romboides-elípticas u ovado lanceoladas, agudas, margen aserrado, en forma irregular; haz verde oscuro y glabro; envés más pálido y a veces pubescente, el tronco es recto con ramas rígidas con espinas, y la corteza de color gris rojiza y se desprende en tiras (CONABIO, CONABIO, 1995).

De las especies *Crataegus pubescens*, sólo hay un estudio que relata el efecto vasorelaxante de los extractos de *C. mexicana* en la tráquea de cobayas, a pesar de que la mayoría de estas plantas también se utilizan tradicionalmente para trastornos cardiovasculares como los implicados en circulación coronaria, taquicardia e hipertensión. Los estudios químicos de las flores de tres de las especies mexicanas han informado de cuatro quercetin glicósidos. Los mecanismos por los cuales algunos flavonoides y triterpenos ya encontrados que en *Crataegus* ejercen sus efectos sobre el sistema cardiovascular (Pérez, y otros, 2014). Se ha reportado que tradicionalmente se utiliza *Crataegus mexicana* para el tratamiento de la obesidad donde se emplea su fruto que presenta actividad diurética, también se ha reportado que el extracto de etanol de las partes aéreas tiene efectos inhibidores efectos de la lipasa, y

el intervalo de su actividad fue del 6,3% al 26,6% (Castro, Domínguez, Morales, & Álvarez, 2015).

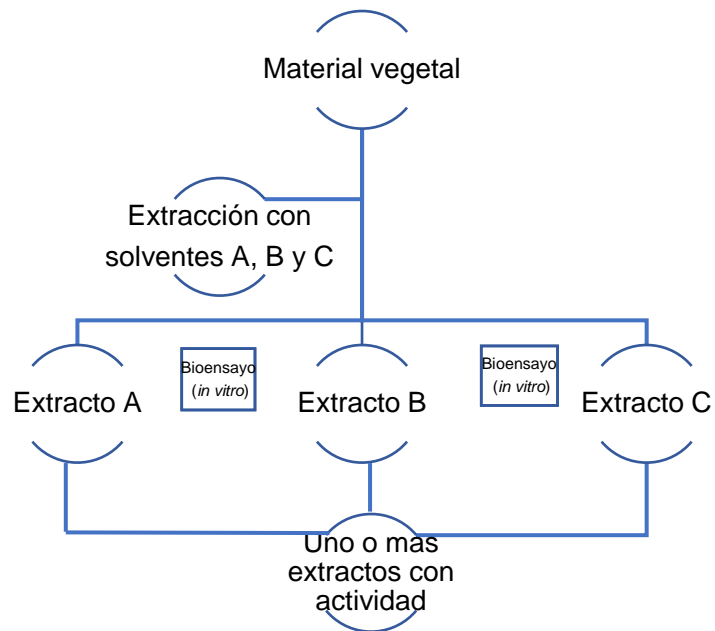
En el género *Crataegus* se ha encontrado que los triterpenos citotóxicos de tipo ursano se aislaron de *Crataegus pinnatifida* que fueron identificados como uvaol, ácido ursólico y ácido 3-oxo-ursólico. Las actividades citotóxicas de estos compuestos se ensayaron in vitro contra L1210 murino y líneas celulares de cáncer humano (A549, SKOV-3, SK-MEL-2, XF498 y HCT15). El uvaol y el ácido ursólico mostraron citotoxicidades moderadas contra L1210, mientras que mostraron una actividad débil contra las líneas celulares de cáncer humano (Kumar, Arya, Bhat, Ahmad, & Prasad, 2012).

### 1.8 Fraccionamiento guiado por bioensayo.

Los productos naturales incluyen a todo un organismo (por ejemplo, una planta, un animal o un microorganismo) que no ha sido sometido a ningún tipo de procesamiento o tratamiento de otro tipo (por ejemplo, hojas o flores de una planta, un órgano aislado de un animal), un extracto de un organismo o parte de un organismo, y exudados y compuestos puros (por ejemplo, alcaloides, cumarinas, flavonoides, glucósidos, lignanos, esteroides, azúcares, terpenoides, etc.) aislados de plantas, animales o microorganismo. Sin embargo, en gran variedad de casos, el término productos naturales se refiere a los metabolitos secundarios, moléculas pequeñas (peso molecular < 2000 uma) producidas por un organismo que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo. Las estrategias para la investigación en el área de productos naturales han evolucionado significativamente durante las últimas décadas. Éstos se pueden dividir en dos categorías (Sarker, Latif, & Gray, 2006):

1. Estrategias más antiguas (figura 1):
  - a) Centrarse en la química de los compuestos de fuentes naturales, pero no en la actividad.

- b) El aislamiento sencillo y la identificación de los compuestos de fuentes naturales seguido de pruebas de actividad biológica (principalmente in vivo).
- c) Investigación quimiotaxonómica.
- d) Selección de organismos basados principalmente en información etnofarmacológica, reputación folclórica o usos tradicionales.



*Figura 1 Estrategia antigua*

## 2. Estrategias modernas (figura 2):

- a) Aislamiento guiado por bio-ensayo (principalmente in vitro) y la identificación de los compuestos activos de fuentes naturales.
- b) Producción de bibliotecas de productos naturales.
- c) Producción de compuestos activos en cultivo de células o tejidos, manipulación genética, química combinatoria natural, etc.
- d) Más centrado en la bioactividad.
- e) Introducción de los conceptos de desreplicación, huellas químicas y metabolómica.



- f) Selección de organismos basados en información etnofarmacológica, reputación folclórica o usos tradicionales, así como aquellos seleccionados aleatoriamente

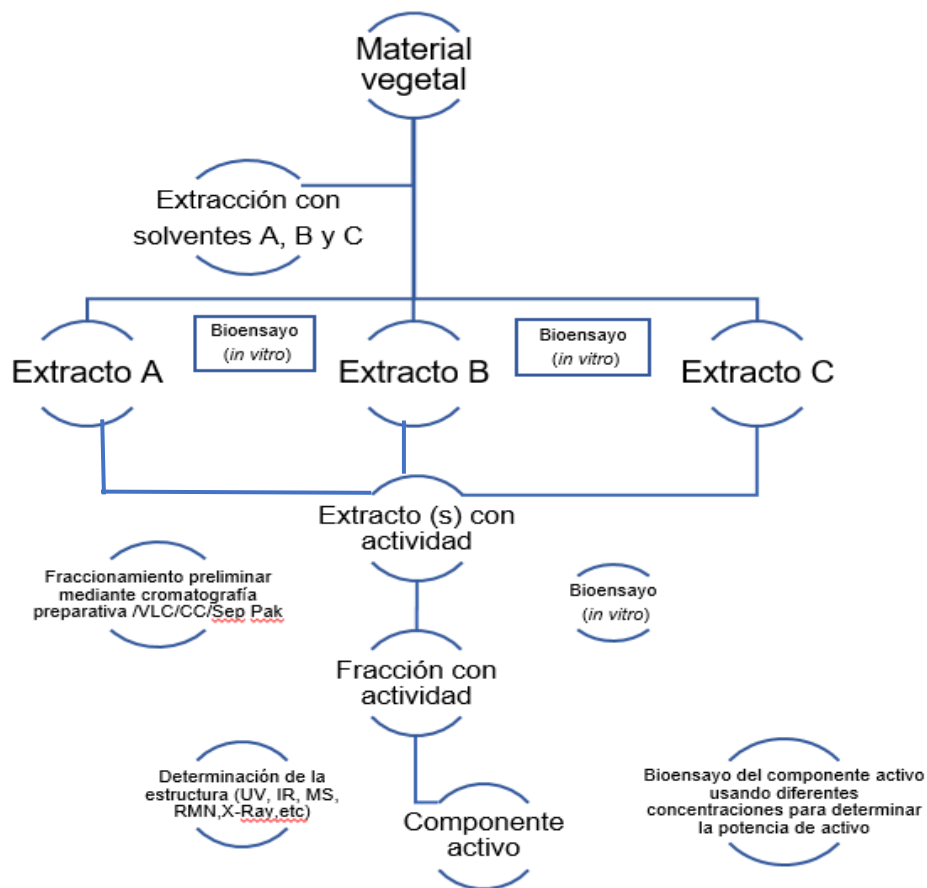


Figura 2 Estrategia moderna.

### 1.9 Métodos de extracción de los principios activos.

Las plantas son matrices complejas, produciendo una gama de metabolitos secundarios con diferentes grupos funcionales y polaridades. Las categorías de productos naturales comúnmente encontrados incluyen ceras y ácidos grasos, poliacetilenos, terpenoides (por ejemplo, monoterpenoides, iridoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides), esteroides, aceites esenciales (terpenoides inferiores y fenilpropanoides), fenólicos (fenólicos simples, fenilpropanoides, flavonoides, taninos, antocianinas, quinonas, cumarinas, lignanos), alcaloides y derivados glicosídicos (por ejemplo, saponinas,

glucósidos cardiotónicos, glucósidos de flavonoides). Se pueden emplear varios métodos para extraer el material vegetal. Aunque el agua se utiliza como extractante en muchos protocolos tradicionales, generalmente se seleccionan disolventes orgánicos de polaridades variables en métodos modernos de extracción para explotar las diversas solubilidades de los constituyentes de las plantas. Los procedimientos de extracción de solventes aplicados a productos naturales de plantas incluyen maceración, percolación, extracción Soxhlet, extracción con disolvente con ultrasonido, extracción bajo reflujo y destilación con vapor (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

La maceración es un procedimiento sencillo, pero todavía ampliamente utilizado, implica dejar la planta pulverizada para sumergirla en un disolvente adecuado en un recipiente cerrado a temperatura ambiente. El método es adecuado tanto para la extracción inicial como para la extracción en masa. La agitación ocasional o constante de la preparación (utilizando agitadores mecánicos o mezcladores para garantizar un mezclado homogéneo) puede aumentar la velocidad de la extracción. La extracción se detiene finalmente cuando se alcanza un equilibrio entre la concentración de metabolitos en el extracto y la del material vegetal. Después de la extracción, el material vegetal residual (orujo) debe separarse del disolvente. Esto implica una clarificación brusca por decantación, que suele ser seguida por una etapa de filtración. La centrifugación puede ser necesaria si el polvo es demasiado fino para ser filtrado. Para asegurar una extracción exhaustiva, es común llevar a cabo una maceración inicial, seguida de clarificación, y una adición de nuevo solvente al orujo (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

La extracción con disolvente con ultrasonido se trata de un método de maceración modificado en el que la extracción se facilita mediante el uso de ultrasonidos (pulsos de alta frecuencia, 20 kHz). El polvo de la planta se coloca en un vial. El vial se coloca en un baño de ultrasonidos, y el ultrasonido se utiliza para inducir un esfuerzo mecánico sobre las células a través de la producción de cavitaciones en la muestra. La ruptura celular aumenta la solubilización de los metabolitos en el disolvente y mejora los rendimientos de extracción. La eficiencia de la extracción depende de la frecuencia del instrumento, y de la longitud y temperatura de la sonicación. La ultrasonificación rara vez se aplica a la extracción a gran escala; Se utiliza principalmente para la extracción inicial de una pequeña

cantidad de material. Se aplica comúnmente para facilitar la extracción de metabolitos intracelulares de cultivos de células vegetales. En la percolación, el material vegetal en polvo se empapa inicialmente en un disolvente en un percolador (un recipiente cilíndrico o cónico con un grifo en la parte inferior). Luego se vierte disolvente adicional sobre el material de la planta y se deja percolar lentamente (gota a gota) desde la parte inferior del percolador. No se requiere una filtración adicional del extracto porque hay un filtro en la salida del percolador. La percolación es adecuada tanto para la extracción inicial como para la extracción a gran escala. En cuanto a la maceración, se pueden realizar percolaciones sucesivas para extraer el material vegetal exhaustivamente rellenando el percolador con un disolvente nuevo y reuniendo todos los extractos juntos. La extracción de Soxhlet se utiliza ampliamente en la extracción de metabolitos de plantas debido a su conveniencia. Este método es adecuado tanto para la extracción inicial como para la extracción en masa. El polvo de la planta se coloca en un dedal de celulosa en una cámara de extracción, que se coloca encima de un matraz colector bajo un condensador de reflujo. Se añade un disolvente adecuado al matraz, y se calienta la mezcla a reflujo. Cuando un cierto nivel de disolvente condensado se ha acumulado en el dedal, se sifona en el matraz debajo. En la extracción bajo reflujo, el material vegetal se sumerge en un disolvente en un matraz de fondo redondo, que está conectado a un condensador. El disolvente se calienta hasta alcanzar su punto de ebullición. Cuando el vapor se condensa, el disolvente se recicla al matraz. La destilación de vapor es un proceso similar y se aplica comúnmente a la extracción de aceites esenciales de plantas (una mezcla compleja de constituyentes volátiles). La planta (seca o fresca) se cubre con agua en un matraz conectado a un condensador. Tras el calentamiento, los vapores (una mezcla de aceite esencial y agua) se condensan y el destilado (separado en dos capas inmiscibles) se recoge en un tubo graduado conectado al condensador. La fase acuosa se recircula en el matraz, mientras que el aceite volátil se recoge por separado. Las condiciones de extracción óptimas (por ejemplo, la velocidad de destilación) tienen que determinarse dependiendo de la naturaleza del material que se está extrayendo. La desventaja principal de la extracción bajo reflujo y destilación con vapor es que los componentes termolábiles corren el riesgo de ser degradados (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

Las extracciones pueden ser «selectivas» o «totales». La elección inicial del disolvente más apropiado se basa en su selectividad para las sustancias a extraer. En una extracción selectiva, el material vegetal se extrae utilizando un disolvente de una polaridad apropiada siguiendo el principio de "similar se disuelve". Así, se usan disolventes no polares para solubilizar compuestos principalmente lipófilos (por ejemplo, alcanos, ácidos grasos, pigmentos, ceras, esteroides, algunos terpenoides, alcaloides y cumarinas). Se usan disolventes de polaridad media para extraer compuestos de polaridad intermedia (por ejemplo, algunos alcaloides, flavonoides), mientras que los más polares se utilizan para compuestos más polares (por ejemplo, glucósidos de flavonoides, taninos, algunos alcaloides). Una extracción selectiva también puede realizarse secuencialmente con disolventes de polaridad creciente. Esto tiene la ventaja de permitir una separación preliminar de los metabolitos presentes en el material dentro de extractos distintos y simplifica el aislamiento adicional. En una extracción denominada "total", se emplea un disolvente orgánico polar (por ejemplo, etanol, metanol o una mezcla alcohólica acuosa) en un intento de extraer tantos compuestos como sea posible. Esto se basa en la capacidad de los disolventes alcohólicos para aumentar la permeabilidad de la pared celular, facilitando la extracción eficiente de grandes cantidades de componentes polares y de polaridad media a baja. El extracto total se evapora a sequedad, se redisuelve en agua y los metabolitos se vuelven a extraer basándose en su coeficiente de reparto (es decir, afinidad relativa para ambas fases) por división sucesiva entre agua y disolventes orgánicos inmiscibles de polaridad variable (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

#### 1.10 Ensayo de MTT.

El ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) tetrazolio fue el primer ensayo de viabilidad celular homogéneo desarrollado para un formato de 96 pocillos que era adecuado para un cribado de alto rendimiento. La tecnología de ensayo de tetrazolio MTT ha sido ampliamente adoptada y sigue siendo popular en los laboratorios académicos como lo demuestran miles de artículos publicados. El sustrato de MTT se prepara en una solución fisiológicamente equilibrada, se añade a células en cultivo, usualmente a una concentración final de 0,2 - 0,5 mg / ml, y se

incuba durante 1 a 4 horas. La cantidad de formazán (presumiblemente es directamente proporcional al número de células viables) se mide registrando los cambios en la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de lectura de placas. A veces se utiliza una longitud de onda de referencia de 630 nm, pero no es necesaria para la mayoría de las condiciones de ensayo (Riss, y otros, 2016).

Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de formazán de color púrpura con un máximo de absorbancia cercano a 570 nm. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazan, por lo tanto, la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente de sólo las células viables. El mecanismo celular exacto de la reducción del MTT en formazán no es bien entendido, pero probablemente involucre la reacción con NADH o moléculas reductoras similares que transfieren electrones a MTT. La especulación en la literatura temprana que implica enzimas mitocondriales específicas ha llevado a la suposición mencionada en numerosas publicaciones que MTT está midiendo la actividad mitocondrial. El producto formazano del tetrazolio MTT se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células, así como se deposita cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo. El formazano debe solubilizarse antes de registrar las lecturas de absorbancia. Se han utilizado diversos métodos para solubilizar el producto de formazano, estabilizar el color, evitar la evaporación y reducir la interferencia con el rojo de fenol y otros componentes del medio de cultivo. Varios métodos de solubilización incluyen el uso de isopropanol acidificado, DMSO, dimetilformamida, SDS y combinaciones de detergente y disolvente orgánico (Riss, y otros, 2016).

### 1.11 Cromatografía en capa fina.

La cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil) en una dirección definida. La fase estacionaria suele estar en una columna, pero puede tener otras formas, como una fase plana (Gary, 2009).

La cromatografía planar utiliza la separación de mezclas de compuestos orgánicos en capas delgadas de adsorbentes que en la mayoría de los casos están recubiertas de láminas de vidrio, plástico o aluminio. La forma más ampliamente utilizada de cromatografía planar es la cromatografía en capa fina (TLC) (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

El uso de la cromatografía de capa fina (TLC) para el análisis de extractos de plantas comenzó en la década de 1960, con el trabajo de Stahl y Randerath. El uso continuo y el desarrollo de la cromatografía de capa fina en el análisis de plantas se justifica debido a su rapidez y a la disponibilidad de una serie de solventes diferentes. La TLC también es útil en el análisis de plantas porque es posible trabajar con extractos crudos, lo que no ocurre con otros métodos analíticos. En el análisis de plantas, los métodos de derivatización sirven para aumentar la sensibilidad y la selectividad, además de proporcionar evidencia sobre la calidad de la separación otra ventaja es que cuenta con métodos de detección y reactivos que permiten la identificación de moléculas que pertenecen a las familias de metabolitos secundarios que se muestran en la tabla 2. La TLC es muy económica y puede emplearse para un uso rutinario debido a que el consumo de disolvente es muy bajo, y es posible analizar numerosas muestras en la misma placa. La literatura sobre el análisis de plantas por TLC es muy extensa, la mayoría de los estudios de TLC se enumeran en las diferentes farmacopeas del mundo, las clases de compuestos vegetales separados por TLC cubiertas son las siguientes (Pothier, 2000):

- ❖ Alcaloides
- ❖ Glicósidos: flavonoides, cumarinas, antocianinas, ginkgólidos, glicósidos de antraquinona, glucósidos cardiacos
- ❖ Saponinas
- ❖ Aceites esenciales
- ❖ Cannabinoides
- ❖ Valepotriates
- ❖ Principios amargos

Tabla 4 Reveladores utilizados en la técnica de cromatografía en capa fina.

<b>Revelador</b>	<b>Familia de compuesto que identifica</b>
<b>Yodo</b>	Ácidos grasos insaturados
<b>Vainillina e hidróxido de potasio</b>	Aminoácidos y aminas
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides
<b>Cloruro férrico</b>	Fenoles y esteroides fenólicos
<b>Reactivo citrobórico</b>	Flavonoides
<b>Hidróxido potasio, etanol</b>	Cumarinas volátiles
<b>Revelador Lebermann-Buchard</b>	Triterpenos y esteroides

La separación por TLC se efectúa mediante la aplicación de una mezcla o un extracto como una mancha o línea delgada sobre un sorbente que se ha aplicado a una placa de soporte. La placa analítica de TLC tiene un grosor de 0.1 a 0.2, la placa de gel de sílice analítica más común es la placa de plástico de 20 x 20 cm. La placa se coloca entonces en un tanque de revelado de vidrio con un disolvente adecuado suficiente para humedecer el borde inferior de la placa / sorbente pero no es suficiente para humedecer la parte de la placa donde se aplicaron las manchas (el origen). El frente de disolvente migra entonces hacia arriba la placa a través del sorbente debido a la acción capilar. Un factor para cuantificar el movimiento (migración) de un compuesto sobre un sorbente particular y sistema disolvente es el valor de Rf. Esto se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el componente}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Los valores de Rf son siempre relaciones, nunca superiores a uno, y varían dependiendo del sistema de sorbente y / o disolvente. En el caso de la cromatografía de adsorción, donde el sorbente es sílice, los compuestos polares tendrán una mayor afinidad para el sorbente (fase estacionaria), se "adherirán" al sorbente y se mueven lentamente por la placa a medida que el disolvente (fase móvil) migra. Estos compuestos tendrán valores Rf relativamente pequeños. Los compuestos no polares tendrán menos afinidad para la fase estacionaria, se

moverá comparativamente rápidamente por la placa, y tendrá valores  $R_f$  relativamente mayores. Como consecuencia los compuestos de una mezcla se separarán según sus polaridades relativas. La polaridad está relacionada con el tipo y el número de grupos funcionales presentes en una molécula capaz de unirse con hidrógeno (Sarker, Latif, & Gray, 2006).

### 1.12 Cromatografía preparativa.

La cromatografía instantánea en gel de sílice se ha vuelto omnipresente dentro de la química orgánica y desde su introducción formal en 1978. Todos los métodos cromatográficos, con la excepción de la TLC, utilizan columnas para el proceso de separación. La cromatografía en columna ha encontrado su lugar en muchos laboratorios con fines preparativos, así como para el control en síntesis orgánicas. La importancia de la cromatografía en columna se debe a los siguientes factores que se dan a continuación (Swathi, Srividya, Ajitha, & Rao, 2015).

- Procedimiento simple de empacado.
- Baja presión de trabajo.
- Bajo gasto para la instrumentación.

La cromatografía preparativa es básicamente un híbrido impulsado por aire a presión media y una cromatografía de columna más corta que ha sido optimizada para una separación particularmente rápida. La cromatografía preparativa es una técnica utilizada para separar las mezclas de moléculas en sus constituyentes individuales, que se utilizan con frecuencia en el proceso de descubrimiento de fármacos. La cromatografía preparativa se difiere de la técnica convencional de dos maneras: en primer lugar, se utilizan partículas de gel de sílice ligeramente más pequeñas (malla 250-400), y segundo, debido al flujo restringido de disolvente causado por las pequeñas partículas de gel con una presión aproximadamente de 10-15 psi para conducir el disolvente a través de la columna de fase estacionaria. El resultado neto es una cromatografía rápida y de alta resolución (Swathi, Srividya, Ajitha, & Rao, 2015).



### 1.13 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

La riqueza acumulada por la cromatografía, en especial por parte de la cromatografía de gases, ha producido al desarrollo de los métodos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC; high-performance liquid chromatography) que rivaliza con la cromatografía de gases y permite hacer separaciones y mediciones en cuestión de minutos (Gary, 2009).

El corazón del sistema HPLC es la columna donde ocurre la separación, una fase móvil es bombeada del reservorio, mediante un inyector, entra a la columna y sale por el detector. Una muestra se disuelve en la fase móvil o un solvente similar es inyectado en el flujo de la fase móvil a la columna, la separación ocurre en la columna y esta depende de las características de la columna, los componentes que fueron separados entran al detector generando una señal que es enviada a un sistema de datos. La bomba toma el disolvente de un depósito a través de algún tipo de filtro, presuriza el disolvente lo suficiente para superar la resistencia del empaque de la columna y conduce el disolvente dentro del inyector. Los disolventes se aspiran a la bomba por succión y es importante que se desgasifiquen antes de que se coloquen en el depósito de disolvente a menos que el sistema esté diseñado para desgasificar disolventes automáticamente. La desgasificación puede hacerse mediante sonicación, pero el método de desgasificación más eficaz es la filtración por succión a través de un filtro fritado de tamaño de poro fino (McMaster, 2005).

Un sistema de inyección se compone de un anillo de acero inoxidable con seis conexiones diferentes, una de las cuales va a la columna, Dentro del anillo hay un cono móvil de teflón que tiene tres segmentos abiertos, y cada uno de ellos conecta un par de conexiones externas. Dos de las conexiones se unen con un circuito externo de muestra, de volumen conocido y fijo. En una configuración, el cono permite el flujo directo del efluente a la columna y así el circuito se puede llenar con la muestra. A continuación, el cono se gira 30° para que el circuito de la muestra sea parte de la corriente en movimiento, la cual barre la muestra y la lleva a la columna. Los tramos rectos de tubo de acero inoxidable permiten la construcción de columnas excelentes. Son de varios materiales y longitudes los cuales dependen de la aplicación. En general, el diámetro interno tiene 3.9 o 4.6 mm. Una

columna de 4.6 mm de diámetro, bien empacada con partículas de 5  $\mu\text{m}$  debe tener un número de platos del orden de 60 000 a 90 000 placas/ metro, a flujos de 1 mL/min. Una columna convencional de 15 cm de longitud con 4.6 mm de diámetro interno tiene 15000 platos, con partículas 3  $\mu\text{m}$ , 9000 platos con partículas de 5  $\mu\text{m}$  y 5000 platos con partículas de 10  $\mu\text{m}$  (Gary, 2009).

Las columnas de sílice sin tratar se denominan columnas de fase normal porque eran el primer tipo de columna disponible para HPLC. Estas normalmente se empaquetan con sílice para su uso con fases móviles no polares. Los componentes más polares de la muestra se separan en la fase móvil y son retenidos en la fase estacionaria, los compuestos más no polares se lavan primero. La columna de octildodecilo o C18 - sílice, fue la primera de las columnas de fase enlazada, y ha dado al HPLC gran parte de su versatilidad. Las cadenas laterales de octildodecilo están unidas al soporte de sílice por enlaces Si-O-Si. Estas columnas de fase inversa se pueden utilizar con disolventes acuosos menos caros que son más fáciles de eliminar y menos peligrosos de usar. Se supone que la separación de fase inversa es una simple partición de la muestra entre una fase unida no polar y una fase móvil polar. Los componentes más polares de la muestra deben salir del puño, con los compuestos no polares que se mantienen más largos en el embalaje de la columna no polar, la separación de la fase inversa es una separación de la muestra entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los componentes más polares de la muestra deben salir primero, los compuestos no polares que se mantienen más tiempo en el empaque de la columna no polar, en la tabla 3 se muestran otros tipos de columnas, (McMaster, 2005).

Otro componente en el sistema de HPLC es el detector puede usarse en la misma corriente de disolvente de la columna, ya sea en serie con un espectrómetro de masas o utilizando un divisor para desviar parte o la mayor parte del efluente a un detector secundario tal como un detector de índice de refracción, detector de conductividad, detector ultravioleta (UV) o detector fluorescencia (McMaster, 2005).

Tabla 5 Columnas de fase de sílice.

Columna	Fase	Solventes	Aplicación
<b>C8</b>	Octil	MeOH, H <sub>2</sub> O	No polares en general
<b>Fenil</b>	Estirilo	MeOH, H <sub>2</sub> O	Ácidos grasos, dobles enlaces
<b>Ciano</b>	Cianopropil	MeOH, H <sub>2</sub> O, THF	Cetonas, aldehídos
<b>Amino</b>	Aminopropil	MeOH, H <sub>2</sub> O, THF, CHCl <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Azucres, aniones
<b>SAX</b>	Aromatic Quaternary Amine	Buffers de sales, MeOH, H <sub>2</sub> O,	Aniones
<b>SCX</b>	Aromatic Sulfonic Acid	Buffers de sales, MeOH, H <sub>2</sub> O,	Cationes
<b>DEAE</b>	Alquil ether etil 2° amine	Buffers de sales, MeOH, H <sub>2</sub> O,	Proteínas, aniones
<b>CM</b>	Alquil ether ácido acético	Buffers de sales, MeOH, H <sub>2</sub> O,	Proteínas, aniones
<b>Diol</b>	Dihidroxihexil	MeOH, H <sub>2</sub> O, THF	Proteínas

#### 1.14 Espectroscopia UV-Vis.

La absorción de radiación ultravioleta y visible tiene una gran aplicación en la identificación y determinación de una enorme cantidad de especies inorgánicas y orgánicas. Esta absorción de radiación por una especie atómica o molecular  $M$  se puede considerar como un proceso de dos etapas, la primera de ellas consiste en una excitación electrónica como se muestra en la ecuación:  $M + h\nu \rightarrow M^*$ . El producto de la reacción entre  $M$  y el fotón  $h\nu$  es una especie excitada electrónicamente simbolizada por  $M^*$ , el tiempo de vida de la especie excitada es breve de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  segundos, y su existencia termina por alguno de los distintos procesos de relajación. La forma más común de relajación supone la conversión de la energía de excitación en calor, también puede ocurrir por la descomposición de  $M^*$  para dar lugar a nuevas especies, dicho proceso se denomina reacción fotoquímica, en otros casos la relajación puede suponer la reemisión de fluorescencia o fosforescencia. La absorción de radiación ultravioleta resulta de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. Los electrones que contribuyen a la absorción por una molécula orgánica son aquellos que participan en la formación del enlace entre átomos y, por tanto, se asocian con más de un átomo y los electrones no enlazantes o electrones que no participan en ningún enlace que están en gran

parte localizados alrededor de átomo de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno. Los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos, en las moléculas orgánicas, se designan como orbital sigma ( $\sigma$ ), el doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares, una orbital sigma ( $\sigma$ ) correspondiente a un par de electrones enlazantes y una orbital molecular pi ( $\pi$ ) asociado con el otro par. Las transiciones electrónicas entre los distintos niveles de energía se pueden producir por absorción de radiación son posibles cuatro tipos de transiciones (figura 3) (Skoog, Holler, & Crouch, 2000).

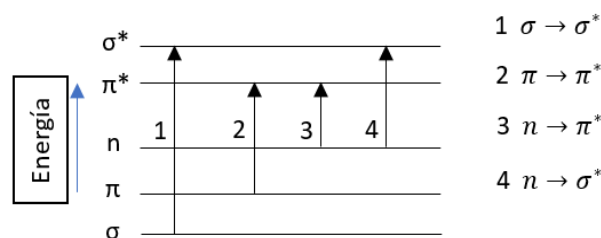


Figura 3 Niveles de energía electrónicos de los orbitales moleculares

Las transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  se producen cuando un electrón de un orbital  $\sigma$  enlazante de una molécula se excita al correspondiente orbital antienlazante mediante la absorción de radiación, comparado con otras posibles transiciones, la energía requerida para que tenga lugar la transición  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  es grande, correspondiendo a una frecuencia radiante de la región ultravioleta de vacío. Las transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  se da en los compuestos saturados que contienen pares de electrones no compartidos son capaces de sufrir esta transición, requiere menos energía que las del tipo  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  y se pueden producir por radiación de la región comprendida entre 150 – 250 nm y los máximos de absorción para las transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  tienden a desplazarse hacia longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares como agua o etanol. En las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  la mayoría de las aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos se basan en transiciones de electrones  $n$  y  $\pi$  al estado excitado  $\pi^*$  dado que la energía requerida para estos procesos produce picos de absorción dentro de una región espectral experimentalmente accesible de 200 a 700 nm, ambas transiciones requieren la presencia de grupos funcionales no saturados que aportan los electrones  $\pi$ , a estos centros absorbentes

no saturados se les aplica el término de cromóforos (tabla 4) (Skoog, Holler, & Crouch, 2000).

Tabla 6 Características de absorción de algunos cromóforos.

Cromóforo	Ejemplo	Disolvente	$\lambda_{\max}$ (nm)	Tipo de transición
Alqueno	$C_6H_{13}C = CH_2$	n-Heptano	177	$\pi \rightarrow \pi^*$
			178	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alquino	$C_5H_{11}C \equiv C - CH_3$	n-Heptano	196	--
			225	--
Carbonilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	n-Hexano	186	$n \rightarrow \pi^*$
			280	$n \rightarrow \pi^*$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	n-Hexano	180
293	$n \rightarrow \pi^*$			
Carboxilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	Etanol	204	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	Agua	214	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$CH_3N = CH_3$	Etanol	339	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	$CH_3NO_2$	Isooctano	280	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$C_4H_9NO$	Etil éter	300	$n \rightarrow \pi^*$
			665	--
Nitrato	$C_2H_5ONO_2$	Dioxano	270	$n \rightarrow \pi^*$

### 1.15 Espectroscopia FT-IR.

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12,800 y 10  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a longitudes de onda de 0.78 a 1000  $\mu\text{m}$ . La radiación en el infrarrojo no es lo suficientemente energética para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan cuando la radiación es ultravioleta, visible y de rayos x. La absorción de radiación en el infrarrojo se limita así, en gran parte, a especies moleculares para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales. Para obtener radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación, solo en estas circunstancias el campo eléctrico alterno de la radiación puede interactuar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos. La energía necesaria para provocar un cambio en los niveles

rotacionales es muy pequeña y corresponde a radiaciones de  $100\text{ cm}^{-1}$  o menores, dado que los niveles rotacionales están cuantizados, la absorción para los gases en la región de infrarrojo lejano se caracteriza por líneas discretas bien definidas. En los líquidos o los sólidos los choques e interacciones intramoleculares causan el ensanchamiento de las líneas intramoleculares causan el ensanchamiento de las líneas originando un espectro continuo. Los niveles de energía vibracionales también están cuantizados, y para la mayoría de las moléculas las diferencias de energía entre los estados cuantizados corresponden a la región del infrarrojo medio. El espectro infrarrojo de un gas consta de una serie de líneas muy próximas entre sí debido a la existencia de varios estados energéticos rotacionales para cada estado vibracional. Por otra parte, en los sólidos y en los líquidos la rotación está muy restringida y las líneas discretas vibracionales/rotaciones desaparecen, quedando sólo los picos vibracionales algo ensanchados. Se pueden distinguir dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, la vibración de flexión se caracteriza por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión. En las moléculas que contiene más de dos átomos, son posibles los tipos de vibraciones mencionados, además, puede producirse una interacción o acoplamiento de las vibraciones si éstas involucraran enlaces con un mismo átomo central (Skoog, Holler, & Crouch, 2000).

La identificación de un compuesto orgánico a partir de un espectro de este tipo implica es un proceso que consta de dos etapas. La primera etapa implica la determinación de grupos funcionales que están presentes en la región de frecuencia de grupo que abarca la radiación comprendida desde  $3600\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, la segunda etapa consiste en una comparación detallada del espectro del compuesto desconocido con los espectros compuestos puros en este caso es particularmente útil la región de la huella dactilar, comprendida entre los  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  debido a que pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de una molécula provocan cambios significativos en el aspecto y la distribución de los picos en esta región (Skoog, Holler, & Crouch, 2000).

## 2. OBJETIVO.

### 2.1 Objetivo General.

Elucidar la naturaleza química de las moléculas presentes en los extractos: acuoso, etanólico y en éter de petróleo, de cancerina, tejocote y muicle, que posean actividad citotóxica.

### 2.2 Objetivo específicos.

- I. Obtener los extractos crudos en agua, etanol y éter de petróleo de cancerina, tejocote y muicle.
- II. Caracterizar a los extractos crudos mediante espectroscopia UV-Vis y FT-IR.
- III. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos crudos en la línea celular MDA-MB-231 a 24 y 72 h.
- IV. Caracterizar químicamente a los extractos crudos con actividad citotóxica mediante cromatografía en capa fina.
- V. Obtener fracciones de los extractos mediante cromatografía preparativa.
- VI. Evaluar la actividad citotóxica de las fracciones en cultivo celular de cáncer de mama.
- VII. Evaluar químicamente las fracciones con mejor actividad citotóxica mediante ensayos colorimétricos.
- VIII. Caracterizar químicamente a las fracciones con mejor actividad citotóxica mediante HPLC-DAD, FT-IR y UV-Vis.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Material vegetal, obtención y caracterización.

El material vegetal se renovó para este proyecto, las plantas fueron colectadas en distintos puntos y se llevaron a la Universidad Autónoma de Chapingo para su clasificación taxonómica, la cual se muestra a continuación.

La Cancerina (*Semialarium mexicanum* (Miers) Mennega) de la familia *Celastraceae* fue adquirida de la herboristería “Santo Domingo” ubicada en el centro histórico de la Ciudad de México, un ejemplar se encuentra resguardado en el herbario "JES" del Área de Biología de la Universidad Autónoma Chapingo, con número de registro 33093.

El Muicle (*Justicia spicígera* Schltdl) de la familia *Acanthaceae* y el Tejocote (*Crataegus mexicana* Moc) de la familia *Rosaceae* fueron recolectadas en el municipio de Texcoco, Estado de México donde un ejemplar de ambas plantas se encuentra resguardado en el herbario "JES" del Área de Biología de la Universidad Autónoma Chapingo, con número de registro 33094 para Muicle y 33049 para Tejocote.

#### 3.2 Acondicionamiento del material vegetal.

Se realizó la limpieza total de cada una de las tres plantas, eliminando los cuerpos extraños, posteriormente estas fueron lavadas con abundante agua y sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo, las plantas se dejaron secar en un periodo de 15 días a temperatura ambiente. El material vegetal una vez seco fue cortado en pequeños trozos para facilitar su trituración en molino de martillos, hasta obtener una granulometría menor o igual a 180  $\mu\text{m}$ , finalmente, el polvo obtenido fue almacenado en bolsas de polietileno a 4°C, para su posterior uso.



### 3.3 Obtención de extractos.

Para la obtención de los principios activos se mezcló el material vegetal molido con un disolvente de polaridad baja (éter de petróleo), uno de polaridad intermedia (etanol) y uno de polaridad alta (agua) de manera seriada, la obtención de los extractos se realizó mediante transferencia de materia inducida por baño ultrasónico a una frecuencia de 25 kHz durante 30 minutos a 30 °C. Para ello, se colocaron 50 g de polvo seco de cada una de las plantas en 500 mL de disolvente, realizándose tres lavados, el volumen obtenido fue centrifugado, decantado, filtrado con papel filtro Whatman No. 1 y envasado con protección de la luz.

Los extractos obtenidos de muicle y tejocote fueron concentrados en estufa de vacío a 40 °C hasta alcanzar volúmenes de 20 mL, mientras que el extracto de cancerina fue colocado en frascos color ámbar y almacenado a -13°C durante una noche para eliminar ceras y resinas por precipitación y filtración con tela, posteriormente el extracto fue filtrado con papel filtro Whatman No. 1 y concentrado en estufa de vacío a 40 °C hasta alcanzar un volumen de 20 mL. Los extractos obtenidos fueron colocados en frascos color ámbar y almacenados a 4 °C.

### 3.4 Espectroscopia UV-Visible de los extractos crudos.

Las muestras fueron analizadas con el equipo de espectrofotometría UV/Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S) en un intervalo de 190 a 700 nm para obtener su espectro e identificar longitudes de onda que indicaran la presencia de compuestos de interés para su fraccionamiento.

### 3.5 Espectroscopia FT-IR de los extractos crudos.

Los extractos fueron analizados con el equipo de espectrofotometría FT-IR (Agilent Technologies Cary 630 FT-IR) para obtener su espectro e identificar los grupos funcionales presentes en ellos.

### 3.6 Cultivo celular.

Las líneas celulares de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) fue adquirida de la American Type Culture Collection.

El manejo de las células se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar bajo buenas prácticas de laboratorio. La línea celular se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Caisson Lads) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, ATCC) a 37°C, en ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.7 Ensayo de viabilidad MTT de los extractos.

Las células de la línea MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una confluencia de 7,000 células por pozo, con un volumen total de 100 µL de medio de cultivo, las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas para permitir su adherencia a la superficie de la placa, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se aplicaron los tratamientos correspondientes.

Se tomó una cantidad conocida de los cada uno de los nueve extractos obtenidos anteriormente y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) en proporciones que no alcanzaran concentraciones citotóxicas de DMSO en cultivo (< 0.2%). A partir de esta solución, se realizaron diluciones con el medio de cultivo hasta alcanzar las diferentes concentraciones de las soluciones de trabajo (entre 2-30 µg/mL), las dosis a evaluar fueron determinadas de acuerdo con los reportes del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, que sugiere que aquellos extractos con valores de dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) menores o iguales a 30 µg/mL son considerados activos. Los controles que se emplearon fueron: control negativo, células sin tratamiento; control positivo, células tratadas con paclitaxel 0.25 µg/mL; y células tratadas con DMSO al 0.2% v/v. En todos los casos, el volumen final contenido por pozo fue de 100 µL.

Las células se mantuvieron en tratamiento durante 24 y 72 horas, una vez finalizados los respectivos tiempos de tratamiento, se revelaron los resultados adicionando a cada pozo 0.1

mg del reactivo MTT (Sigma) y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100 µL de DMSO. Las muestras se analizaron por espectroscopia en un lector ELISA (Labsystem Multiskan MS) a 570 nm. Los diferentes tratamientos fueron comparados contra el control negativo, a partir de éste, se calculó el porcentaje de viabilidad celular. Se realizaron 6 réplicas por cada tratamiento.

La DE<sub>50</sub> se calculó mediante el análisis de regresión logarítmica, debido a que se espera que los ensayos muestren una dependencia directamente proporcional (logarítmica creciente) entre la dosis aplicada y el porcentaje de células no viables considerando como no citotóxico (NC) los ensayos en los que no se observó este comportamiento; los criterios tomados en cuenta para la exclusión fueron que el coeficiente de correlación fuera  $\leq 0.5$  (indicativo de que el ensayo no se ajusta al comportamiento esperado).

### 3.8 Cromatografía en capa fina.

Se realizó la cromatografía en capa fina (CCF) del extracto que presentó actividad citotóxica (cancerina éter de petróleo). La CCF se realizó sobre placas de aluminio de 10 x 1 cm, recubiertas con gel de sílice con indicador de fluorescencia a 254 nm (Merck millipore), el extracto fue aplicado con pipeta Pasteur en el centro de la placa, a una distancia de 1 cm del borde inferior de la misma, la placa fue colocada en un contenedor hermético con una mezcla de cloroformo, ácido acético y éter de petróleo a diferentes proporciones, la fase móvil se dejó avanzar hasta 1 cm antes del borde superior de la placa, posteriormente se dejó evaporar el disolvente y las placas fueron revisadas en una cámara de luz ultravioleta de onda corta para calcular los  $R_f$  respectivos.

### 3.9 Identificación de metabolitos secundarios.

Se corrieron cinco placas, a las cuales se les aplicaron los siguientes reveladores:

Cristales de yodo: se colocó la placa en un frasco cubierto que contenía cristales de yodo. Se tomó como resultado positivo cuando algunos de los compuestos adsorbieron yodo reversiblemente, produciendo manchas de tonalidad amarilla a café, el ensayo es útil para detectar ácidos grasos insaturados.

Vainillina – Ácido sulfúrico: se roció la placa con una solución de: ácido sulfúrico al 5% en etanol, posteriormente se roció la placa con vainillina al 1% en etanol, la placa se calentó a 110°C por 5 a 10 minutos. Se tomó como resultado positivo al presentarse una coloración azul, azul violeta y amarillo, indicando la presencia de saponinas.

Reactivo citrobórico: se colocaron 5 g de ácido bórico y 5 g de ácido cítrico en 100 mL de etanol, se roció la placa con la solución y se calentó a 100°C durante 5 minutos, posteriormente se observó bajo luz UV donde se tomó como resultado positivo al observar manchas de color violeta que indica la presencia de flavonoides.

Hidróxido de potasio: se preparó una solución de hidróxido de potasio al 5% en etanol y se roció la placa con dicha solución, posteriormente se observó bajo luz UV donde se tomó como resultado positivo al observar una fluorescencia azul que indica la presencia de cumarinas.

Revelador Lieberman Buchard: se agregaron cuidadosamente 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50 mL de etanol absoluto, mientras se enfrió en baño de hielo, el reactivo debe de estar recién preparado, posteriormente se roció la placa con la solución y se calentó a 100 °C, se tomó como resultado positivo al observar una mancha de color café que indica la presencia de triterpenos y una de color rosa para esteroides.

### 3.10 Cromatografía preparativa.

Se realizó nuevamente la extracción de las plantas que presentaron actividad citotóxica con la metodología antes descrita y el volumen obtenido se concentró hasta 20 mL, el extracto se inyectó en un sistema de cromatografía preparativa (Büchi Labortechnik) que consiste en una bomba (Büchi Pump Manager C-615), un detector UV/Vis (Büchi UV Photometer C-

640) y un colector de fracciones (Büchi Fraction Collector C-660), para llevar a cabo la separación se utilizó una columna preempaquetada de gel de sílica con un tamaño de partícula menor a 5 µm, tamaño de poro de 60 Å, un área superficial específica de 483 m<sup>2</sup>/g, las condiciones de operación empleadas fueron: flujo 20 mL/min, presión de columna 16 bar, temperatura ambiente y el detector del equipo operó a la longitud de onda establecida al realizar una espectroscopia UV/Vis al extracto, con una sensibilidad de 5%.

### 3.11 Ensayo colorimétrico.

Se hicieron las siguientes reacciones con la fracción que presentó actividad citotóxica para identificar los metabolitos secundarios que contiene.

#### Saponinas

- Espuma. Se colocó 1 mL de muestra, más 1 mL de agua en un tubo de ensayo y agitó vigorosamente. La prueba se consideró positiva cuando se formó espuma estable durante 30 min.
- Liebermann Buchard. Se colocaron 0.5 mL de muestra y se agregaron 2 gotas de anhídrido acético y luego 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sin agitar. La prueba se consideró positiva para presencia de saponinas esferoidales cuando surgieron coloraciones azul o verde; y presencia de saponinas triterpenoides cuando se generaron coloraciones rosas, rojo, magenta o violeta.
- Rosenthaler. Se tomaron 0.1mL de muestra y se agregaron 2 gotas de reactivo de Rosenthaler y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, la prueba fue positiva para saponinas triterpenoides cuando se formó una coloración violeta.

Reactivo de Rosenthaler: Diluir 1g de vainillina en 100mL de etanol.

#### Triterpenos y esteroides

- Lieberman Buchard. Reactivo: 5 ml de anhídrido acético y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado se agregan cuidadosamente a 50 ml de etanol absoluto, mientras se enfría en baño de hielo. Se tomaron 05 mL y se adicionó 2 gotas del reactivo, este

debe de estar recién preparado, la prueba da positiva para triterpenos cuando se forma una coloración café y una coloración purpura violeta para esteroides.

### 3.12 Ensayo de viabilidad MTT de las fracciones.

Las células de la línea MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una confluencia de 7,000 células por pozo, con un volumen total de 100  $\mu$ L de medio de cultivo, las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas para permitir su adherencia a la superficie de la placa, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se aplicaron los tratamientos correspondientes.

Para preparar los tratamientos aplicados a las células, se tomó una cantidad conocida de cada una de las fracciones obtenidas de la cromatografía preparativa y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) en proporciones que no alcanzaron concentraciones citotóxicas de DMSO en cultivo ( $< 0.2\%$ ). A partir de esta solución, se realizaron diluciones con el medio de cultivo adecuado hasta alcanzar las diferentes concentraciones de las soluciones de trabajo (2, 4, 8, 10, 20, y 30  $\mu$ g/mL), las dosis a evaluar fueron determinadas de acuerdo con los reportes del Instituto Nacional de cáncer de los Estados Unidos, que sugiere que aquellos extractos con valores de dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) menores o iguales a 30  $\mu$ g/mL son considerados activos. Los controles que se emplearon fueron: como control negativo células sin tratamiento; control positivo, células tratadas con paclitaxel 0.25  $\mu$ g/mL; y células tratadas con DMSO al 0.2% v/v. En todos los casos, el volumen final contenido por pozo fue de 100  $\mu$ L.

Las células se mantuvieron en tratamiento durante 24 y 72 horas, una vez finalizados los respectivos tiempos de tratamiento, se revelaron los resultados adicionando a cada pozo 0.1 mg del reactivo MTT (Sigma) y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100  $\mu$ L de DMSO. Las muestras se analizaron por espectroscopia en un lector ELISA (Labsystem Multiskan MS) a 570 nm. Los diferentes tratamientos fueron comparados contra el control negativo, a partir de éste, se calculó el porcentaje de viabilidad celular y se realizaron 6 réplicas por cada tratamiento.

La DE<sub>50</sub> se calculó mediante el análisis de regresión logarítmica, debido a que se espera que los ensayos muestren una dependencia directamente proporcional (logarítmica creciente) entre la dosis aplicada y el porcentaje de células no viables considerando como no citotóxico (NC) los ensayos en los que no se observó este comportamiento; los criterios tomados en cuenta para la exclusión fueron que el coeficiente de correlación fuera  $\leq 0.5$  (indicativo de que el ensayo no se ajusta al comportamiento esperado).

Una vez analizados los ensayos de las fracciones se descartaron aquellos que no cumplían los criterios mencionado en el párrafo anterior y se eligieron las fracciones que presentaron los menores valores de DE<sub>50</sub>.

### 3.13 Espectroscopia UV-Visible.

Las fracciones con actividad citotóxica fueron analizadas con el equipo de espectrofotometría UV/Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S) en un intervalo de 190 a 700 nm para obtener su espectro e identificar las fracciones que pudieran tener la misma naturaleza química.

### 3.14 Espectroscopia FT-IR.

Las fracciones con actividad citotóxica obtenidas de la cromatografía preparativa fueron analizadas con el equipo de espectrofotometría FT-IR (Agilent Technologies Cary 630 FT-IR) para obtener su espectro e identificar los grupos funcionales que están presentes en ellas.

### 3.15 HPLC.

La fracción que presentaron actividad citotóxica en la línea celular MDA-MB-231 fueron analizadas con el equipo de HPLC-DAD donde se utilizó una columna de 4.6 x 100 mm con un tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$  fase de 85:15 acetonitrilo y agua al 5% de ácido acético a un flujo de 1 mL/min, un volumen de inyección de 2  $\mu\text{L}$ , el detector se calibró a

diferentes longitudes de onda en el espectro UV-Vis y la muestra se preparó a una concentración de 1.8 mg/mL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Obtención de los extractos

Se obtuvieron nueve extractos de las plantas Cancerina (*Semialarium mexicanum* (Miers) Menega), Muicle (*Justicia spicígera* Schltdl) y Tejocote (*Crataegus mexicana* Moc) empleando solventes de diferentes polaridades (agua, etanol y éter de petróleo), los extractos se realizaron a partir de 100 gramos de planta molida y siguiendo el método mencionado en la sección 3.3, en la tabla 5 se presentan los rendimientos que se obtuvieron de los extractos. Los extractos de cancerina y muicle en agua presentaron mayores rendimientos, seguidos de los extractos en etanol y éter de petróleo. Por su parte, el extracto de tejocote en etanol presentó un mayor rendimiento en comparación con sus extractos en agua y éter de petróleo.

Tabla 7 Pesos de los extractos.

<b>Planta</b>	<b>Agua</b>	<b>Etanol</b>	<b>Éter de petróleo</b>
Cancerina	11.42 g	6.25 g	485 mg
Muicle	10.05 g	5.0146 g	792 mg
Tejocote	4.9 g	10.91 g	1620.6 mg

### 4.2 Espectrofotometría FT-IR y UV-Vis de los extractos.

Se aplicó la técnica de espectroscopia UV-Vis en un intervalo de 190 a 700 nm con una resolución de 1 nm a los extractos para identificar la  $\lambda$  máxima que posteriormente fue empleada en el equipo de cromatografía preparativa para llevar a cabo el fraccionamiento de los extractos que presentaron actividad citotóxica, e identificar moléculas de interés presentes en los extractos.



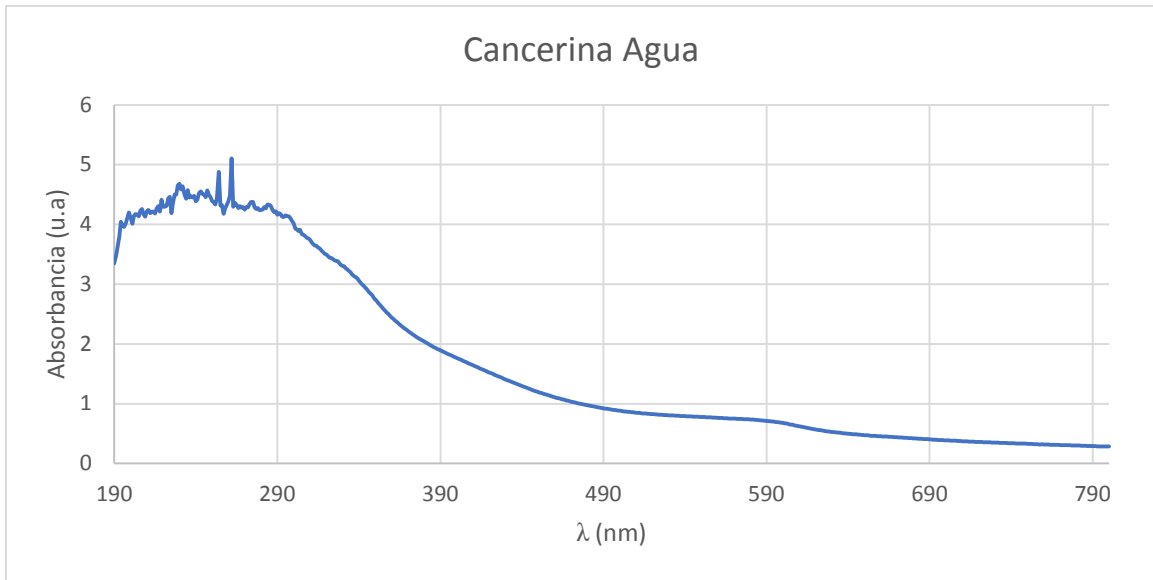


Figura 4 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en agua

En la espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en agua (Figura 4) se puede observar una señal en 250 nm y otra en 590 nm, ésta última, se puede deber a la presencia de compuestos fenolicos (Sanches, Jaime, & San Martin, 2013).

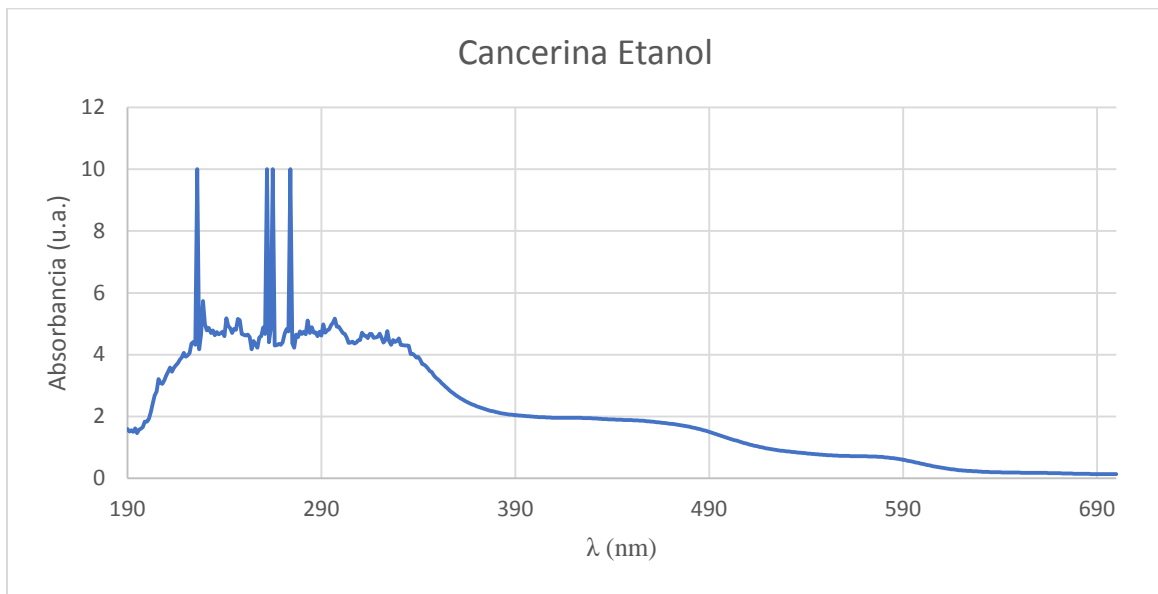


Figura 5 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en etanol.

En la figura 5 correspondiente al espectro UV-Vis del extracto de cancerina en etanol se aprecia una señal en 270 nm también se puede apreciar una señal en 455 nm que puede

corresponder a sesquiterpenos (Hernandez, 2013) y otra en 585 nm que se puede deber a otros compuestos polifenolicos (Sanches, Jaime, & San Martin, 2013).

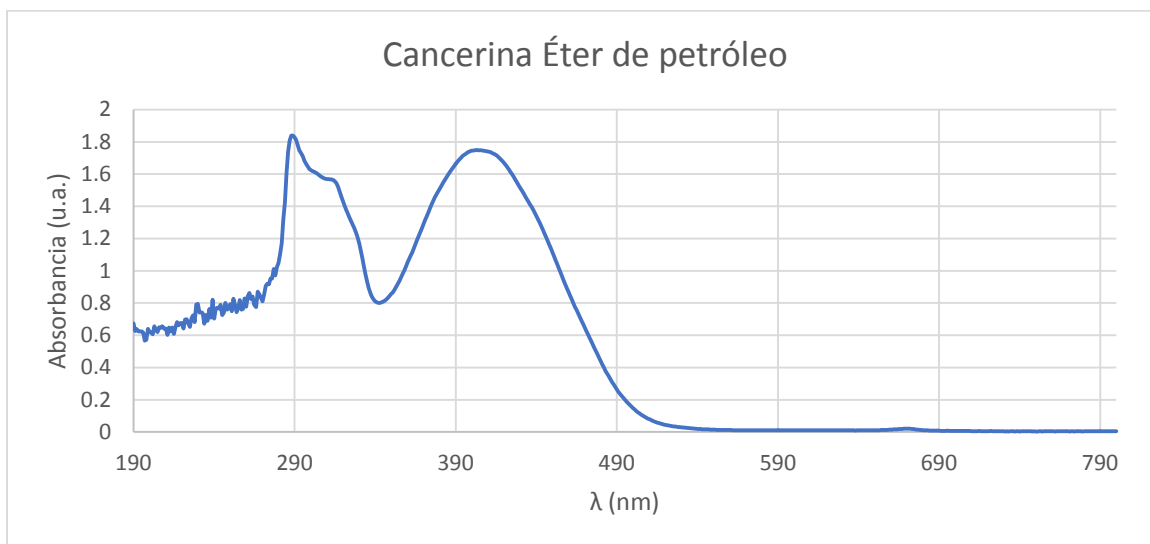


Figura 6 Espectroscopia UV/Vis del extracto de cancerina en éter de petróleo.

En la figura 6 correspondiente al espectro UV-Vis del extracto de cancerina en éter de petróleo se aprecia una señal en 288 nm que es similar a policetidos (Alvarado, 2015), posteriormente se observan dos señales a 343 nm y 409 nm características de sesquiterpenos (Hernandez, 2013). (ver figura 6).

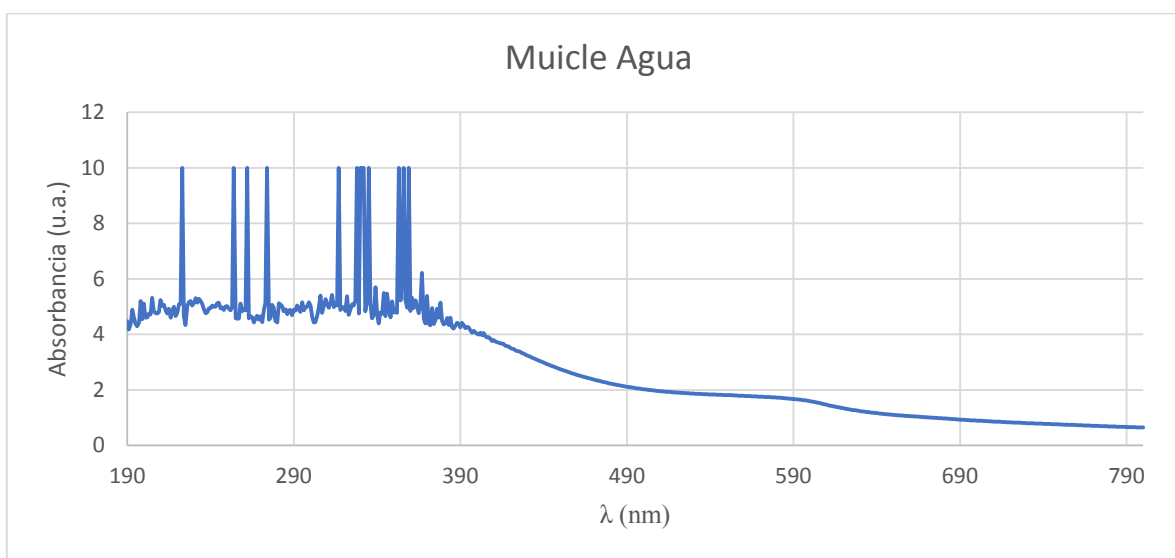


Figura 7 Espectroscopia UV/Vis del extracto de muicle en agua.

En la figura 7 se muestra el espectro UV-Vis del extracto de muicle, en donde hay una señal entre 223 nm y 359 nm y por último una ligera señal en 590, nm la cual puede pertenecer a compuestos fenolicos, antocianinas y betalainas (Sanches, Jaime, & San Martin, 2013)

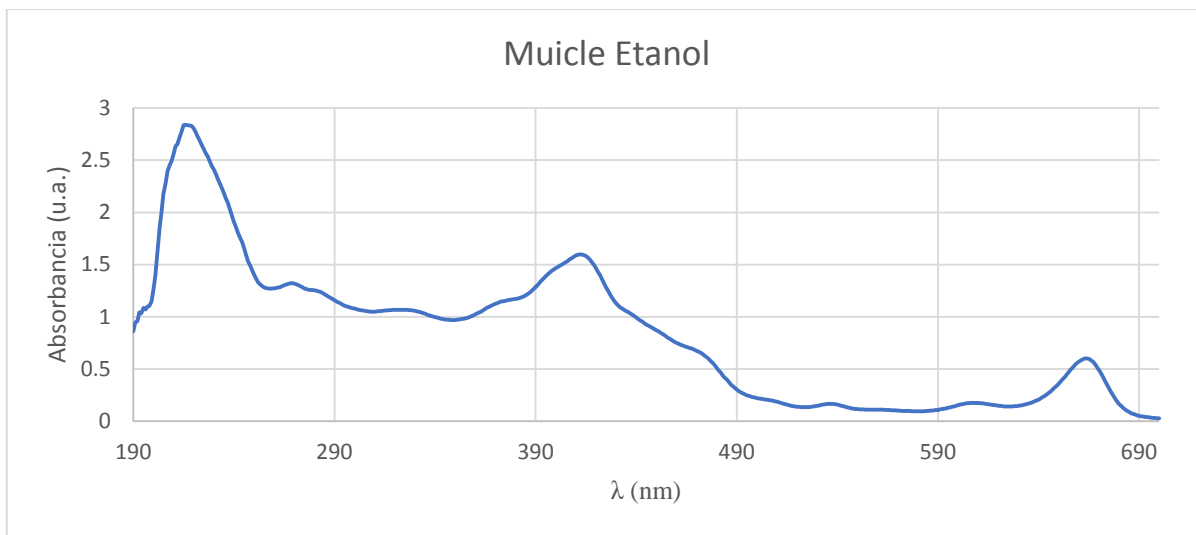


Figura 8 Espectroscopia a UV/Vis del extracto de muicle en etanol.

En el espectro UV/Vis del extracto de muicle en etanol (figura 8) se observan señales en 220 nm, 267 nm y 376 nm (Alvarado, 2015) estas señales se pueden atribuir a la presencia de flavonoides, las señales de 451 nm y 668 nm son características de antocianinas (Sanches, Jaime, & San Martin, 2013).

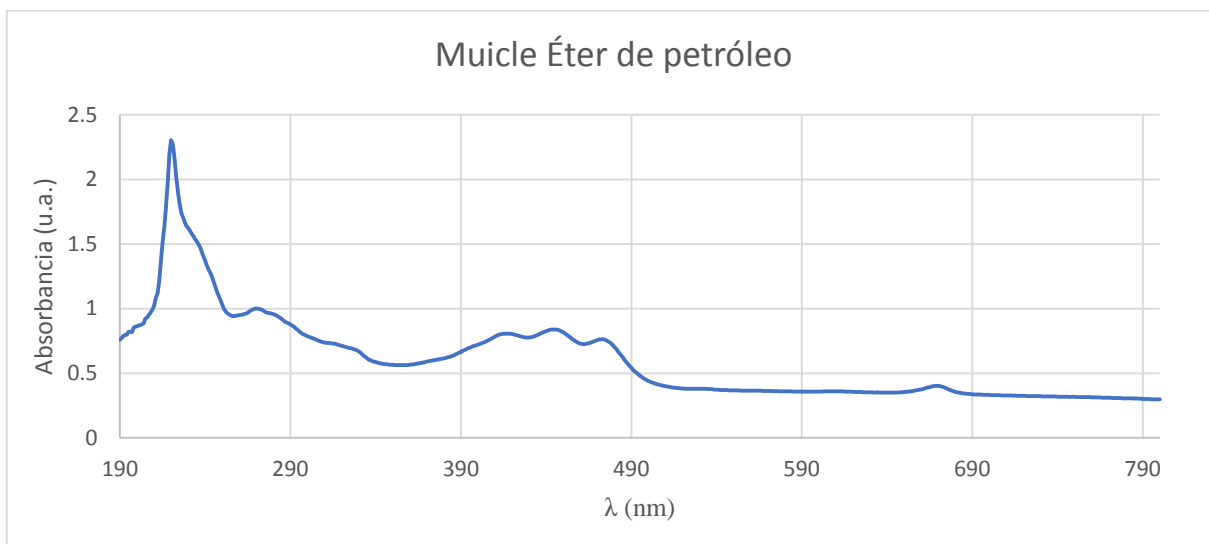


Figura 9 Espectroscopia UV/Vis del extracto de muicle en éter de petróleo.

En la figura 9 se presenta el espectro UV-Vis del extracto de muicle en éter de petróleo en donde se observa una señal en 221 nm característica de policetidos (Alvarado, 2015), posteriormente se observan tres señales continuas en 421nm, 445 nm y 475 nm características de carotenoides (de Ugaz, 1997) y una señal en 672 nm característica de clorofila a (de Costa, y otros, 2003).

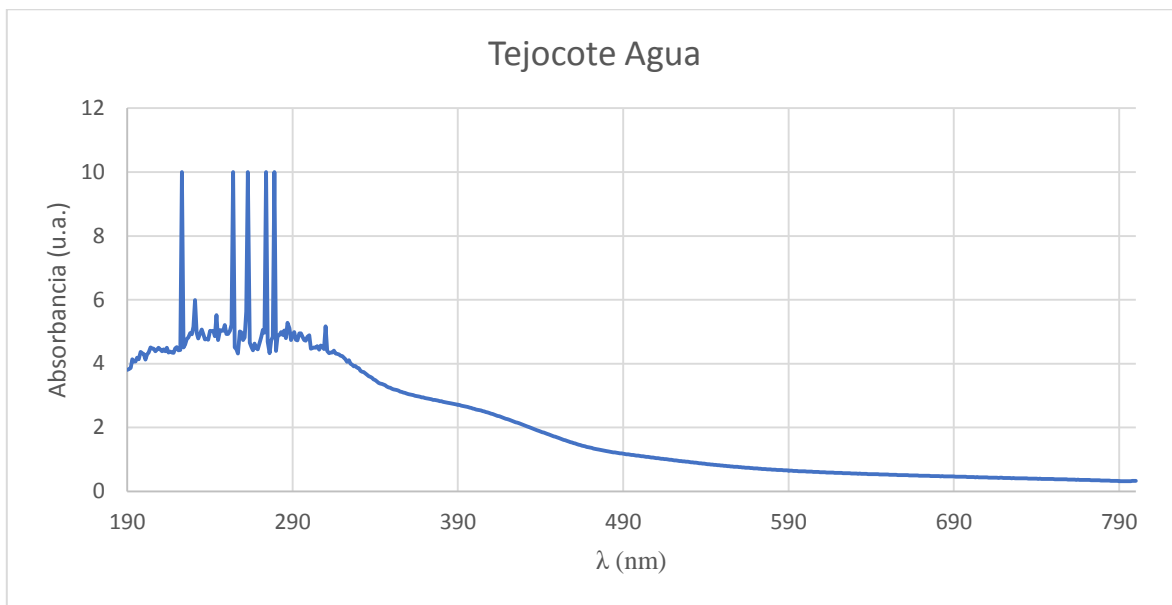


Figura 10 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en agua.

En la figura 10 se aprecia el espectro UV/Vis del extracto de tejocote en agua, donde se observa una señal en 250 nm y otra en 390 nm.

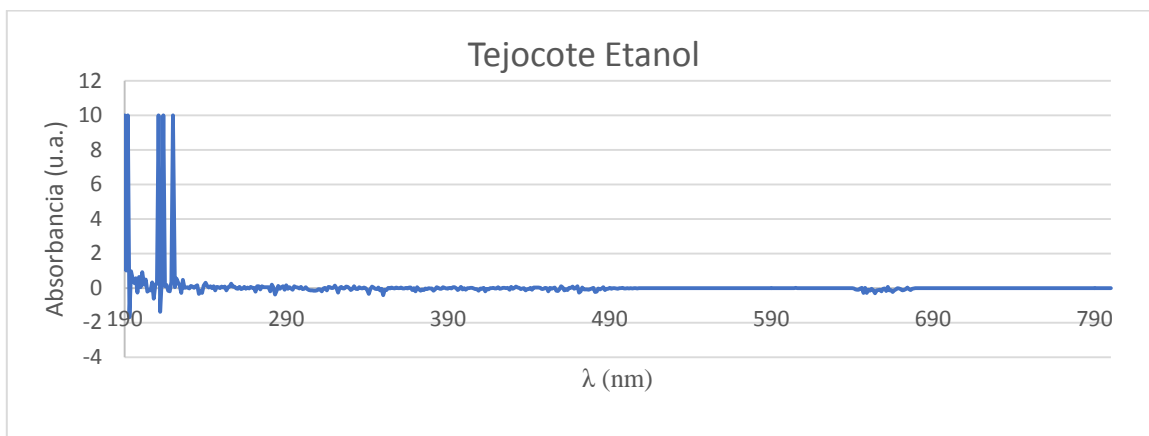


Figura 11 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en etanol.

En la figura 11 se aprecia el espectro UV/Vis del extracto de tejocote en donde se aprecian señales en 191 nm, y 220 nm.

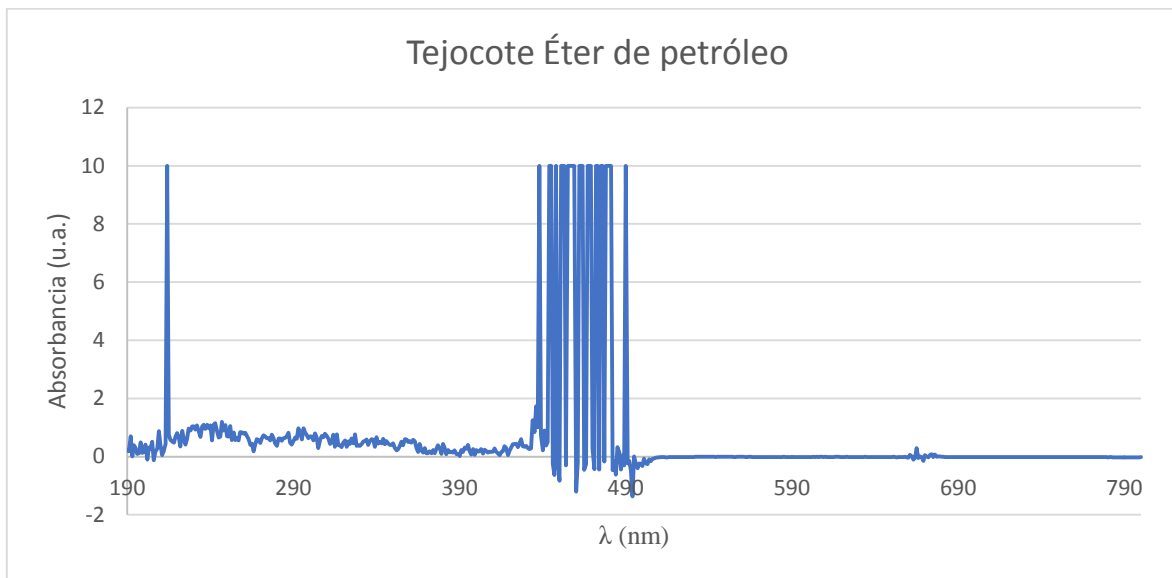


Figura 12 Espectroscopia UV/Vis del extracto de tejocote en éter de petróleo.

El espectro del extracto de muicle en éter de petróleo (figura 12) permite apreciar señales en 215 nm, y 431 nm.

La absorción de radiación ultravioleta y visible tiene una gran aplicación en la identificación y determinación de una enorme cantidad de especies inorgánicas y orgánicas. La absorción de radiación ultravioleta resulta de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies que son objeto de estudio. Los electrones que contribuyen a la absorción por una molécula orgánica son aquellos que participan en la formación del enlace entre átomos y los electrones no enlazantes o electrones que no participan en ningún enlace que están en gran parte localizados alrededor de átomo de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno (Skoog, Holler, & Crouch, 2000). Sin embargo, ésta técnica no es determinante y debe ser complementada con otras técnicas más específicas para la identificación de compuestos, tales como: las técnicas de espectrofotometría FT-IR y HPLC-DAD. Los extractos fueron

caracterizados mediante espectroscopia FT-IR con el fin de identificar grupos funcionales de moléculas presentes en ellos.



Figura 13 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en agua.

En la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en agua (figura 13) se encontraron bandas características de absorción en  $3307\text{cm}^{-1}$  (aminas primarias),  $3223\text{ cm}^{-1}$  (R-OH),  $2512\text{ cm}^{-1}$  (carboxilos),  $1375\text{ cm}^{-1}$  (grupo nitro),  $1206\text{ cm}^{-1}$  y  $1144\text{ cm}^{-1}$  (fenoles),  $1077\text{ cm}^{-1}$  (alcohol primario),  $1111\text{ cm}^{-1}$  (alcohol secundario),  $1349\text{ cm}^{-1}$  y  $1289\text{ cm}^{-1}$  (aminas aromáticas),  $1026\text{ cm}^{-1}$  (derivados de ciclopropano) y  $924\text{ cm}^{-1}$  y  $1045\text{ cm}^{-1}$  (derivados de ciclo hexano) (ver tabla 6).

Tabla 8 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en agua.

Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	Especie química	Señal (cm <sup>-1</sup> )
3500-3300	Aminas Primarias (N-H vibración de flexión)	3307
3550-3250	R-OH (H-enlace)	3223
3200-2300	OH (H- enlace)	2512
3300-2500	COOH (H- enlace)	2936
1385-1360	Grupo Nitro	1375
1300-1250	Derivados de Piridina	1264
1485-1390	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1431
1240-1130	Fenoles	1206, 1144
1350-1250	Amina Primaria Aromática (vibración C-N)	1349, 1289
1075-1000	Alcohol Primario	1077
1020-1000	Derivado de Ciclopropano (vibración de anillo)	1026
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	924
1055-1000		1045
1120-1030	Alcohol Secundario	1111
770-730S	Monosustituido (5 Hidrógenos libres)	----
710-690S		697
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	860
865-810S		----
730-675S		667
900-860M		860
2200-2000	+τ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	2001, 2089, 2031, 2120



Figura 14 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en etanol.

En la figura 14 que corresponde al espectro FT-IR del extracto de cancerina en etanol se encontraron bandas características de absorción en 3205 cm<sup>-1</sup> (grupo hidroxilo), 1603 cm<sup>-1</sup> (amina secundaria), 1719 cm<sup>-1</sup> (acetona), 1359 cm<sup>-1</sup> (grupo nitro), 1279 cm<sup>-1</sup> (derivados de piridina), 1438 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 1517 cm<sup>-1</sup> (aromáticos), 1244 cm<sup>-1</sup> y 1203 cm<sup>-1</sup> (fenoles), 1031 cm<sup>-1</sup> (alcohol primario), 1097 cm<sup>-1</sup> (alcohol secundario) y 925 cm<sup>-1</sup> y 1044 cm<sup>-1</sup> (derivados de ciclohexano) (ver tabla 7).

Tabla 9 Señales de la espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en etanol.

Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	Especie química	Señal (cm <sup>-1</sup> )
3200-2300	OH (H-enlace)	3205
1650-1550	Amina Secundaria	1603
1724-1703	Acetona	1719
1385-1360	Grupo Nitro	1359
1300-1250	Derivados de Piridina	1279
1485-1390	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1438
1500-1400	Aromáticos	1517
1385,1375	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración de tijera simétrica)	1372
1240-1130	Fenoles	1244,1203
1075-1000	Alcohol Primario	1031
1120-1030	Alcohol Secundario	1097
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	925
1055-1000		1044
1170, 1155	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)	1153
840-790		---
770-730S	Monosustituido (5 Hidrógenos libres)	765
710-690S		---
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)
810-750S		(3 Hidrógenos libres)
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	---
865-810S		820
730-675S		699, 664
2200-2000	+τ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	2108, 2028, 2085, 2052

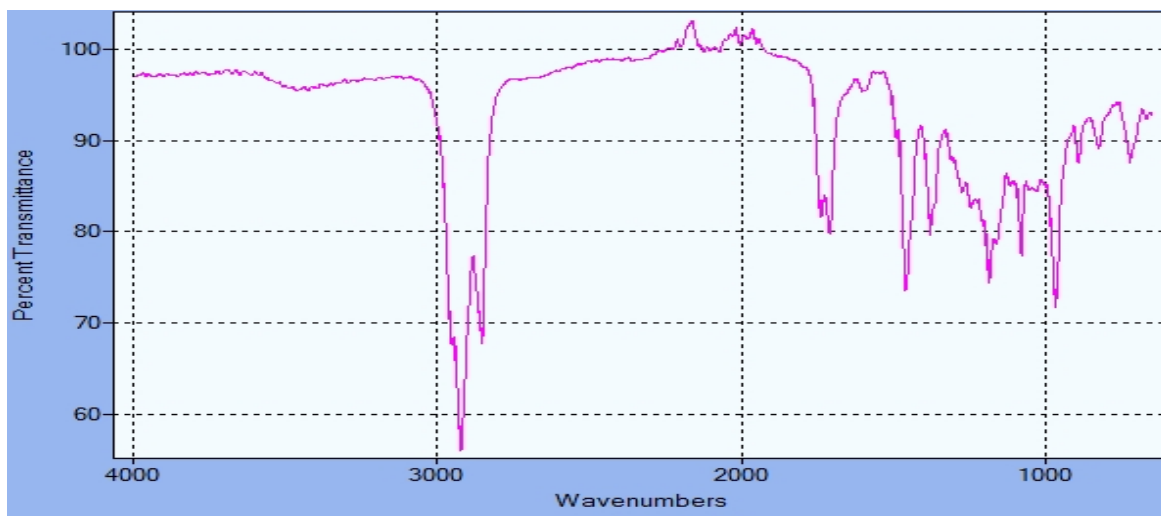


Figura 15 Espectrofotometría FT-IR del extracto de cancerina en éter de petróleo.

En el espectro FT-IR del extracto de cancerina en éter de petróleo (figura 15) se encontraron bandas características de absorción en 2952 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>3</sub> estiramiento asimétrico), 2853 cm<sup>-1</sup> y 2923 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> estiramiento asimétrico), 1738 cm<sup>-1</sup> (grupo



carbonilo), 1603  $\text{cm}^{-1}$  y 1590  $\text{cm}^{-1}$  (amina secundaria), 1710  $\text{cm}^{-1}$  (ciclohexanona), 1492  $\text{cm}^{-1}$  y 1459  $\text{cm}^{-1}$  (aromático), 1245  $\text{cm}^{-1}$ , 1226  $\text{cm}^{-1}$ , 1206  $\text{cm}^{-1}$ , 1185  $\text{cm}^{-1}$  y 1115  $\text{cm}^{-1}$  (fenoles), 1098  $\text{cm}^{-1}$  y 1080  $\text{cm}^{-1}$  (alcohol secundario) y 966  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de ciclobutano) (ver tabla 8).

Tabla 10 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de cancerina en éter de petróleo.

Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Especie química	Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )	
2960	-CH <sub>3</sub> estiramiento asimétrico	2952	
2855	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2853	
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2923	
1725-1705	>C=O	1738	
1650-1550	Carbonilo conjugado del sistema de quinona metileno	1603, 1590	
1726-1700	Ciclohexanona (vibración de tijera)	1710	
1500-1400	Aromático	1492, 1459	
1380	-CH <sub>3</sub> estiramiento asimétrico	1378	
1240-1130	Fenoles	1245, 1226, 1206, 1185, 1115	
1120-1030	Alcohol Secundario	1098, 1080	
1000-960	Derivado de Ciclobutano (vibración de anillo)	966	
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	---	
1055-1000		1054, 1027	
1250	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (vibración del esqueleto)	1245	
1170, 1155	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)	1161	
840-790		---	
770-735S	1:2 disustituido (4 Hidrógenos libres)	722	
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)	891
810-750S		(3 Hidrógenos libres)	772
860-800S	1:4 and 1:2:3:4 sustituido (2 Hidrógenos libres)	824	
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	---	
865-810S		---	
730-675S		667	
1350-1280	Amida Sec. Aromática (C-N vibración)	1309	

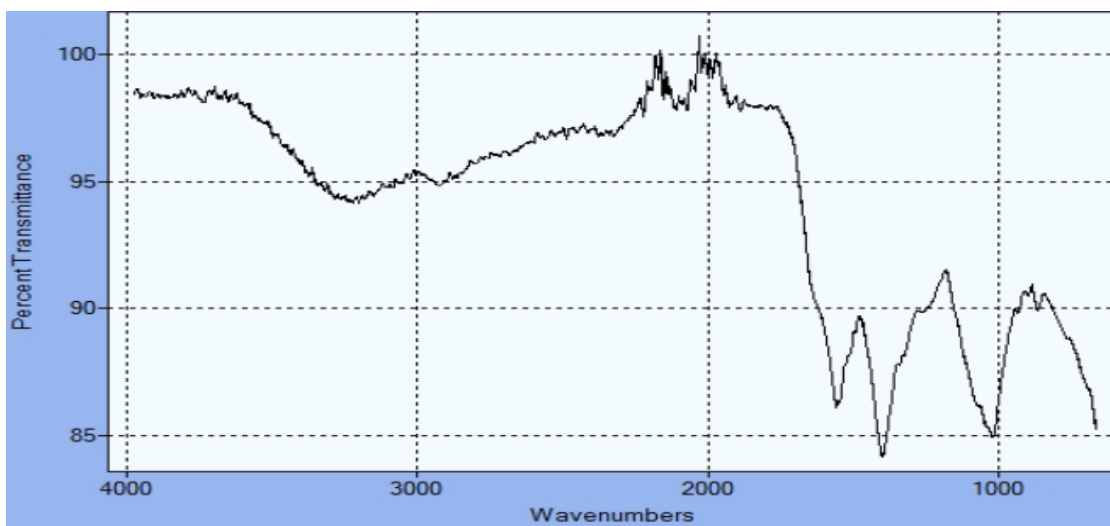


Figura 16 Espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en agua.

En la espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en agua (figura 16) se encontraron bandas características de absorción en  $3222\text{ cm}^{-1}$  (grupo hidroxilo),  $2925\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico),  $1733\text{ cm}^{-1}$  (grupo carbonilo),  $1558\text{ cm}^{-1}$  (amina secundaria),  $1240\text{ cm}^{-1}$  (fenol),  $1261\text{ cm}^{-1}$  (derivados de piridina),  $1398\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_4^+$ ),  $1324\text{ cm}^{-1}$  (amina primaria aromática),  $1072\text{ cm}^{-1}$  y  $1041\text{ cm}^{-1}$  (alcohol primario),  $2192\text{ cm}^{-1}$ ,  $2045\text{ cm}^{-1}$ ,  $2071\text{ cm}^{-1}$  y  $1983\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_3^+$ ),  $1019\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclopropano) y  $933\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclohexano) (ver tabla 9).

Tabla 11 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en agua.

Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	Especie química	Señal (cm <sup>-1</sup> )
3550-3250	ROH (H-enlace)	3222
3200-2300	OH (H-enlace)	2221
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2925
1725-1705	>C=O	1733
1650-1550	Amina Secundaria	1558
1260-1180	Fenol (C-O vibración)	1240
1300-1250	Derivados de Piridina	1261
1485-1390	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1398
1350-1250	Amina Primaria Aromática (vibración C-N)	1324
1075-1000	Alcohol Primario	1072, 1041
1020-1000	Derivado de Ciclopropano (vibración de anillo)	1019
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	933
1055-1000		---
770-735S	1:2 disubtituido (4 Hidrógenos libres)	766
900-860M	1:3 disubtituido	(1 Hidrógeno libre)
810-750S		(3 Hidrógenos libres)
900-860M	1:3:5 trisubtituido (1 Hidrógeno libre)	---
865-810S		---
730-675S		665
2200-2000		+τ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
1530-1490	δ <sub>s</sub> (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	1493
1860	Vibración de estiramiento simétrico	1888

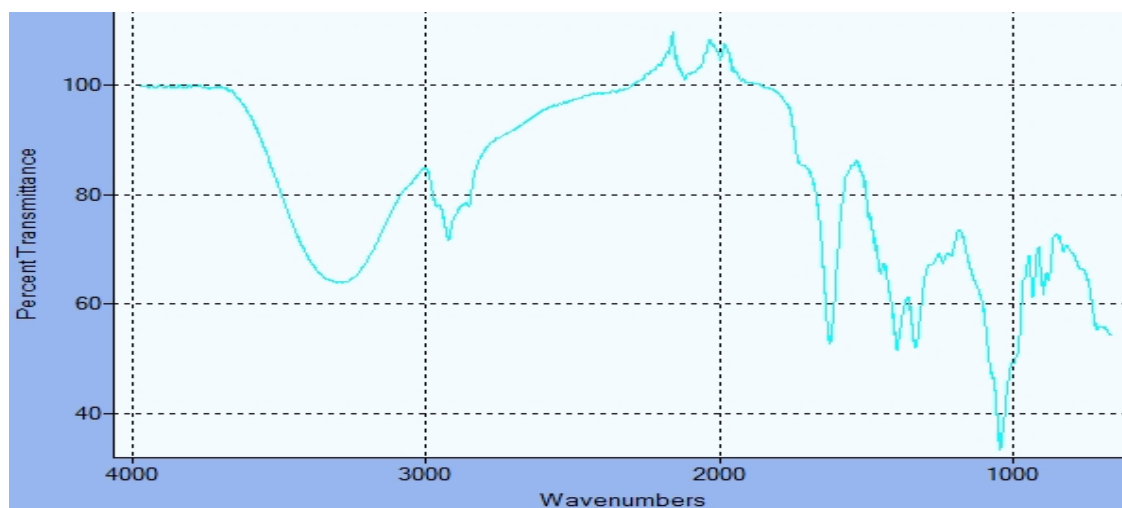


Figura 17 Espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en etanol.

En el espectro FT-IR del extracto de cancerina en etanol (figura 17) se encontraron bandas características de absorción en 3305 cm<sup>-1</sup> (grupo hidroxilo), 2965 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>3</sub> estiramiento asimétrico), 2924 cm<sup>-1</sup> y 2854 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> estiramiento asimétrico), 1717 cm<sup>-1</sup> (grupo

carboxilo), 1623  $\text{cm}^{-1}$  (amina secundaria), 1238  $\text{cm}^{-1}$  y 1210  $\text{cm}^{-1}$  (fenoles), 1491  $\text{cm}^{-1}$  y 1451  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos), 1332  $\text{cm}^{-1}$  y 1277  $\text{cm}^{-1}$  (amina primaria aromática), 999  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de ciclobutano) y 932  $\text{cm}^{-1}$  y 1043  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de ciclohexano) (ver tabla 10).

Tabla 12 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en etanol.

Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Especie química	Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )	
3550-3250	R-OH (H-enlace)	3305	
2960	-CH <sub>3</sub> estiramiento asimétrico	2965	
2855	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2854	
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2924	
1725-1705	>C=O	1717	
1650-1550	Amina Secundaria	1623	
1260-1180	Fenoles (C-O vibración)	1238, 1210	
1500-1400	Aromáticos	1491, 1451	
1385, 1375	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)	1395	
1350-1250	Amina Primaria Aromática (vibración C-N)	1332, 1277	
1000-960	Derivado de Ciclobutano (vibración de anillo)	999	
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	932	
1055-1000		1043	
900-860M	1:3 disubstituido	(1 Hidrógeno libre)	896
810-750S		(3 Hidrógenos libres)	767
800-770S	1:2:3 trisubstituido (3 Hidrógenos libres)	796	
900-860M	1:3:5 trisubstituido (1 Hidrógeno libre)	878	
865-810S		827	
730-675S		714, 665	

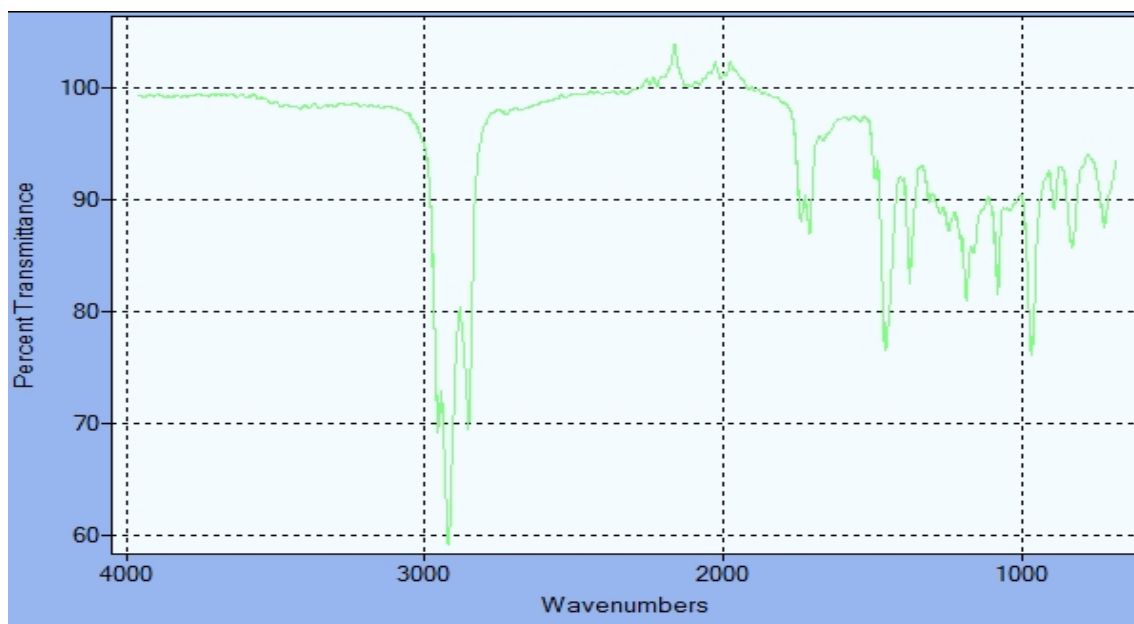


Figura 18 Espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo.

En la figura 18 que corresponde al espectro FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo se encontraron bandas características de absorción en  $2965\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$  estiramiento asimétrico),  $2853\text{ cm}^{-1}$  y  $2923\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico),  $1711\text{ cm}^{-1}$  (grupo carboxilo),  $1665\text{ cm}^{-1}$  (acetofenona),  $1161\text{ cm}^{-1}$ ,  $1273\text{ cm}^{-1}$ ,  $1245\text{ cm}^{-1}$  y  $1185\text{ cm}^{-1}$  (fenol),  $1492\text{ cm}^{-1}$  y  $1398\text{ cm}^{-1}$  (aromáticos),  $1309\text{ cm}^{-1}$  (amina primaria aromática),  $967\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclobutano),  $1475\text{ cm}^{-1}$  ( $=\text{CH}_2$ ) y  $1080\text{ cm}^{-1}$  (alcohol secundario) (ver tabla 11).

Tabla 13 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo.

Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Especie química	Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )
2960	$-\text{CH}_3$ estiramiento asimétrico	2956
2855	$-\text{CH}_2$ estiramiento asimétrico	2853
2925	$-\text{CH}_2$ estiramiento asimétrico	2921
1725-1705	$>\text{C}=\text{O}$	1711
1697-1676	Acetofenona	1665
1260-1180	Fenol (C-O vibración)	1273, 1245
1500-1400	Aromático	1492, 1398
1385 and 1375	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (vibración del esqueleto)	1375
1460	$=\text{CH}_2$	1457
1240-1130	Fenol	1161, 1185
1350-1250	Amina Primaria Aromática (vibración C-N)	1309
1120-1030	Alcohol Secundario	1080
1000-960	Derivado de Ciclobutano (vibración de anillo)	967
1170, 1155	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (vibración del esqueleto)	---
840-790		832
900-860M	1:3 disubstituido	(1 Hidrógeno libre)
810-750S		(3 Hidrógenos libres)
900-860M	1:3:5 trisubstituido (1 Hidrógeno libre)	---
865-810S		---
730-675S		723

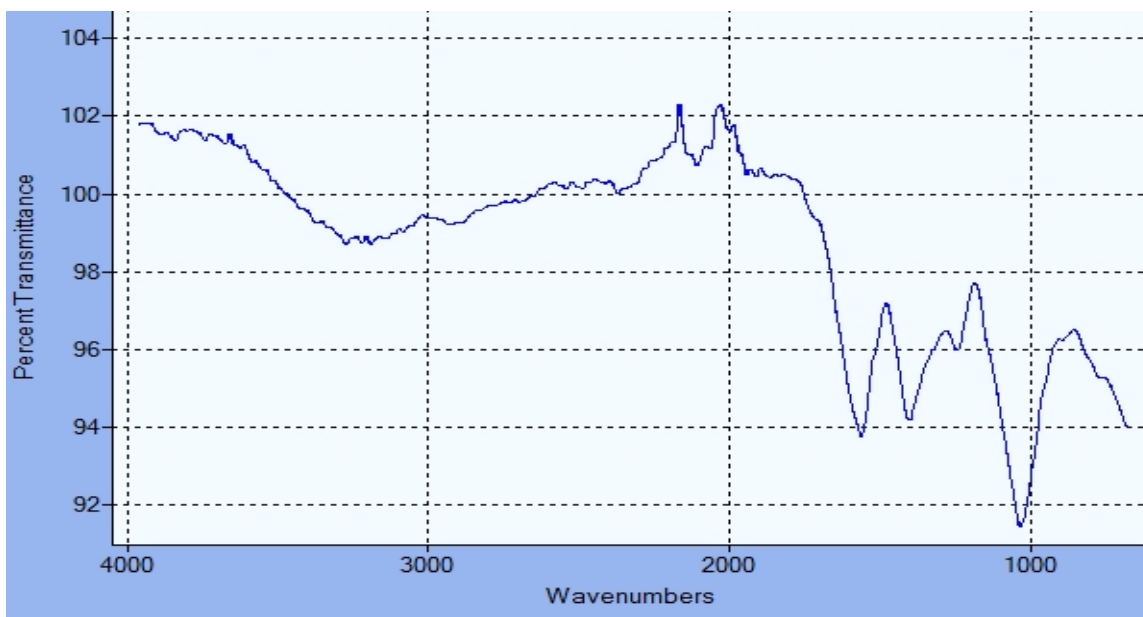


Figura 19 Espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en agua.

En la espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en agua (figura 19) se encontraron bandas características de absorción en  $3270\text{ cm}^{-1}$  (R-OH),  $2930\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico),  $1243\text{ cm}^{-1}$  (fenoles),  $1559\text{ cm}^{-1}$  (amina secundaria),  $1399\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_4^+$ ),  $1036\text{ cm}^{-1}$  (derivados de ciclo hexano) y  $2061\text{ cm}^{-1}$ ,  $2104\text{ cm}^{-1}$  y  $2136\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_3^+$ ) (ver tabla 12).

Tabla 14 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en agua.

Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Especie química	Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )
3550-3250	R OH (H-enlace)	3270
2925	$-\text{CH}_2$ estiramiento asimétrico	2930
1650-1550	Amina Secundaria	1559
1260-1180	Fenol (C-O vibración)	1243
1485-1390	$\text{NH}_4^+$	1399
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	---
1055-1000		1036
2200-2000	$+\tau$ ( $-\text{NH}_3^+$ )	2061, 2104, 2136
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)
810-750S		(3 Hidrógenos libres)
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	---
865-810S		---
730-675S		680

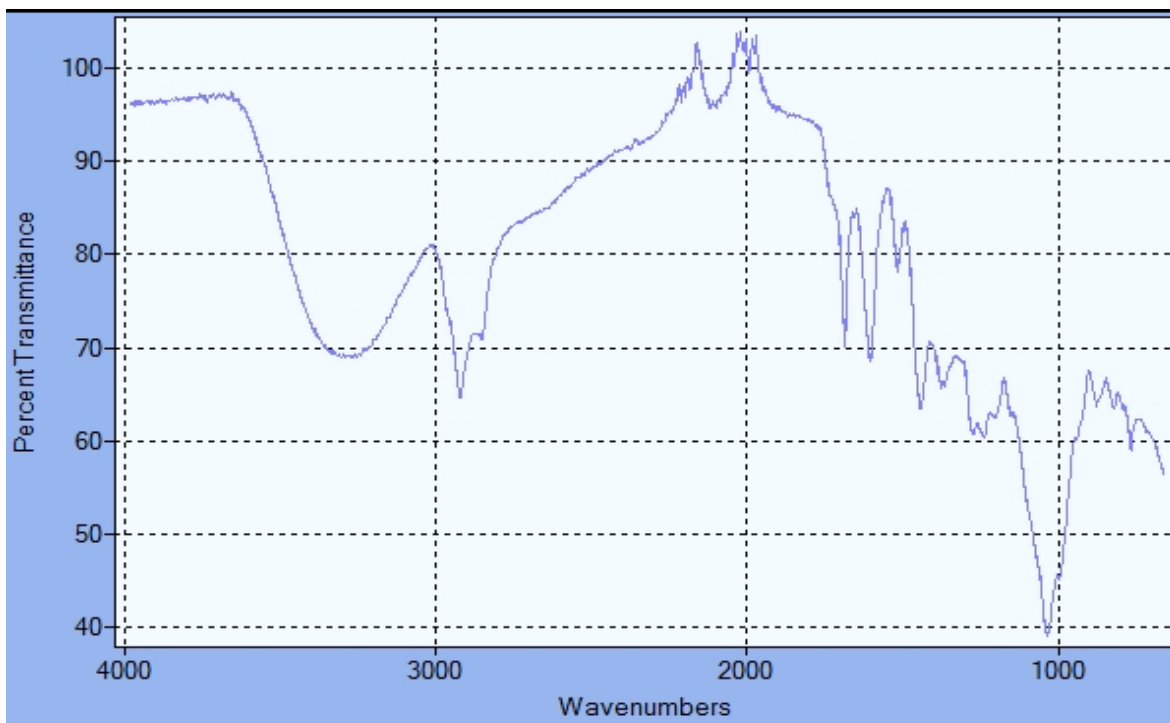


Figura 20 Espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en etanol.

En el espectro FT-IR del extracto de tejocote en etanol (figura 20) se encontraron bandas características de absorción en  $3272\text{ cm}^{-1}$  (grupo hidroxilo),  $2925\text{ cm}^{-1}$  y  $2851\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico),  $1686\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{RC}=\text{N}$ ),  $1604\text{ cm}^{-1}$  (amina primaria),  $1237\text{ cm}^{-1}$  y  $1199\text{ cm}^{-1}$  (fenoles),  $2100\text{ cm}^{-1}$  y  $1514\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_3^+$ ),  $1272\text{ cm}^{-1}$  (amina primaria aromática),  $1033\text{ cm}^{-1}$  (alcohol primario) y  $994\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclohexano) (ver tabla 13).

Tabla 15 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en etanol.

Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	Especie química	Señal (cm <sup>-1</sup> )	
3550-3250	ROH (H-enlace)	3272	
2855	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2851	
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2925	
1690-1635	RC=N	1686	
1650-1590	Amina Primaria NH <sub>2</sub> (vibración deformación)	1604	
1260-1180	Fenol (C-O vibración)	1237, 1199	
1385-1360	Grupo Nitro	1371	
1350-1250	Amina Primaria Aromática (vibración C-N)	1272	
1075-1000	Alcohol Primario	1033	
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	994	
1055-1000		---	
1170, 1155	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)	1151	
840-790		---	
2200-2000	+τ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	2100	
1530-1490	δ <sub>S</sub> (-N H <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	1514	
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)	875
810-750S		(3 Hidrógenos libres)	763
800-770S	1:2:3 trisustituido (3 Hidrógenos libres)	787	
860-800S	1:2:4 trisustituido (2 Hidrógenos libres)	819	
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	---	
865-810S		---	
730-675S		656	

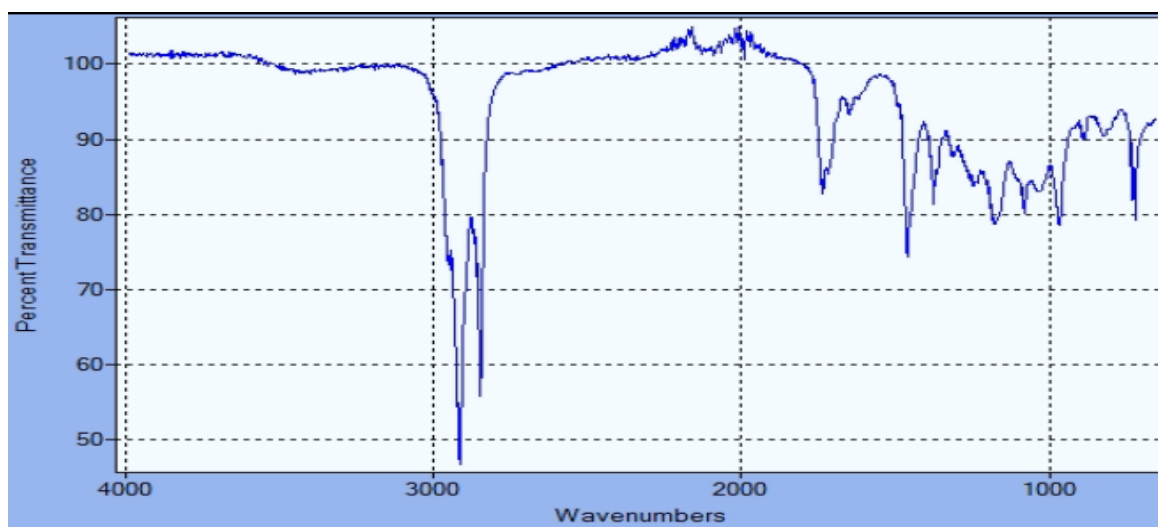


Figura 21 Espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en éter de petróleo.



En la figura 21 que corresponde al espectro FT-IR del extracto de muicle en éter de petróleo se encontraron bandas características de absorción en 2954  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$  estiramiento asimétrico), 2848  $\text{cm}^{-1}$  y 2916  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico), 1618  $\text{cm}^{-1}$  (amina secundaria), 1653  $\text{cm}^{-1}$  (acetofenona), 1736  $\text{cm}^{-1}$  (ciclohexanona), 1718  $\text{cm}^{-1}$  (acetona), 1364  $\text{cm}^{-1}$  (grupo nitro), 1316  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de piridina), 1493  $\text{cm}^{-1}$  y 1461  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos), 1234  $\text{cm}^{-1}$ , 1204  $\text{cm}^{-1}$ , y 1178  $\text{cm}^{-1}$  (fenol), 925  $\text{cm}^{-1}$  y 1030  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de ciclohexano), 968  $\text{cm}^{-1}$  (derivado de ciclobutano), y 1103  $\text{cm}^{-1}$  y 1081  $\text{cm}^{-1}$  (alcohol secundario) (ver tabla 14).

Tabla 16 Señales de la espectrofometría FT-IR del extracto de tejocote en éter de petróleo.

Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Especie química		Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )
2960	-CH <sub>3</sub> estiramiento asimétrico		2954
2855	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico		2848
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico		2916
1650-1550	Amina Secundaria		1618
1697-1676	Acetofenona		1653
1726-1700	Ciclohexanona (vibración de tijera)		1736
1724-1703	Acetona		1718
1385-1360	Grupo Nitro		1364
1300-1250	Derivados de Piridina		1316
1500-1400	Aromáticos		1493, 1461
1385 and 1375	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)		1376
1240-1130	Fenoles		1234, 1204, 1178
1120-1030	Alcohol Secundario		1103, 1081
1000-960	Derivado de Ciclobutano (vibración de anillo)		968
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)		925
1055-1000			1030
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)	887
810-750S		(3 Hidrógenos libres)	---
860-800S	1:4 and 1:2:3:4 sustituido	(2 Hidrógenos libres)	821
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)		---
865-810S			---
730-675S			729, 719, 664

Los extractos fueron evaluados en cultivo celular para identificar aquellos con actividad citotóxica y continuar con el fraccionamiento del extracto, para acotar el grupo de moléculas presentes en las muestras y proseguir con su caracterización química.

#### 4.4 Ensayos de citotoxicidad de los extractos de muicle, cancerina y tejocote obtenidos en agua, etanol y éter de petróleo.

Se evaluó el efecto de los extractos de muicle, tejocote y cancerina en agua, etanol y éter de petróleo sobre la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. El ensayo cuenta con tres controles, el primero son células sin tratamiento, el segundo células con DMSO al 0.2%, esta proporción no alcanza concentraciones citotóxicas y el tercero es paclitaxel al 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , como control positivo, el cual es un medicamento antineoplásico ya conocido y es utilizado en la quimioterapia del cáncer de mama (Klauber, Paragi, Flynn, Hamel, & D'Amato, 1997).

En la figura 22 se muestra el efecto del extracto de cancerina en agua, a 24 h se observa que el extracto no tiene efecto citotóxico al compararse con el control de células sin tratamiento, mientras que a 72 h de tratamiento se observa una ligera disminución de la viabilidad celular en la muestra tratada con 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo, de continuar con el efecto citotóxico para dosis mayores, los valores de  $\text{DE}_{50}$  para el extracto estarían por encima de las sugerencias del NCI para extractos activos.

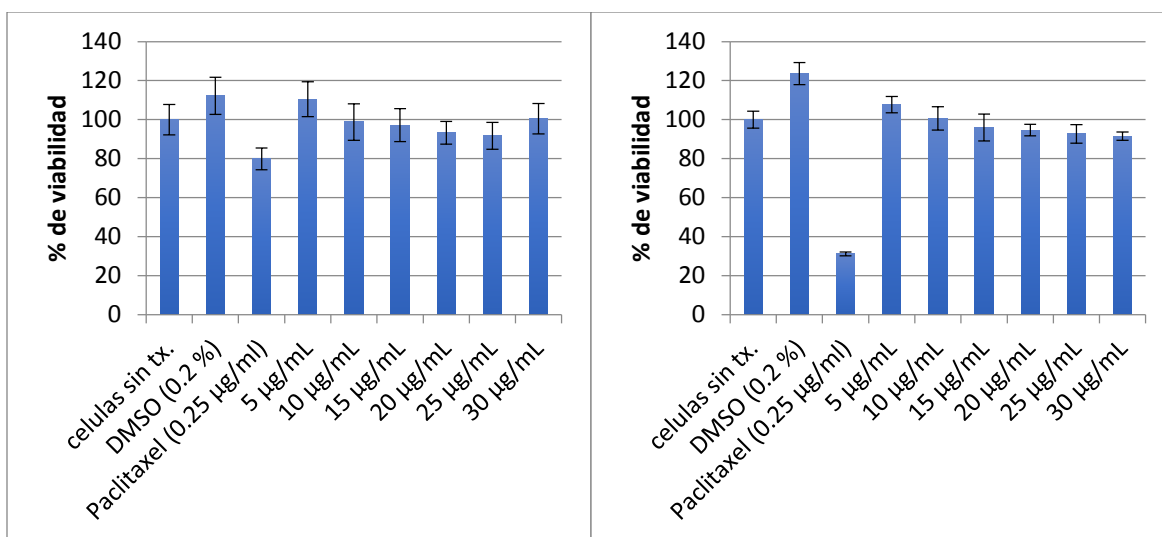


Figura 22 Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de cancerina a 24 y 72 horas.

El extracto de cancerina en etanol (figura 23) a 24 y 72 horas mostró un efecto proliferativo, por lo que no es citotóxico y fue descartado del estudio.

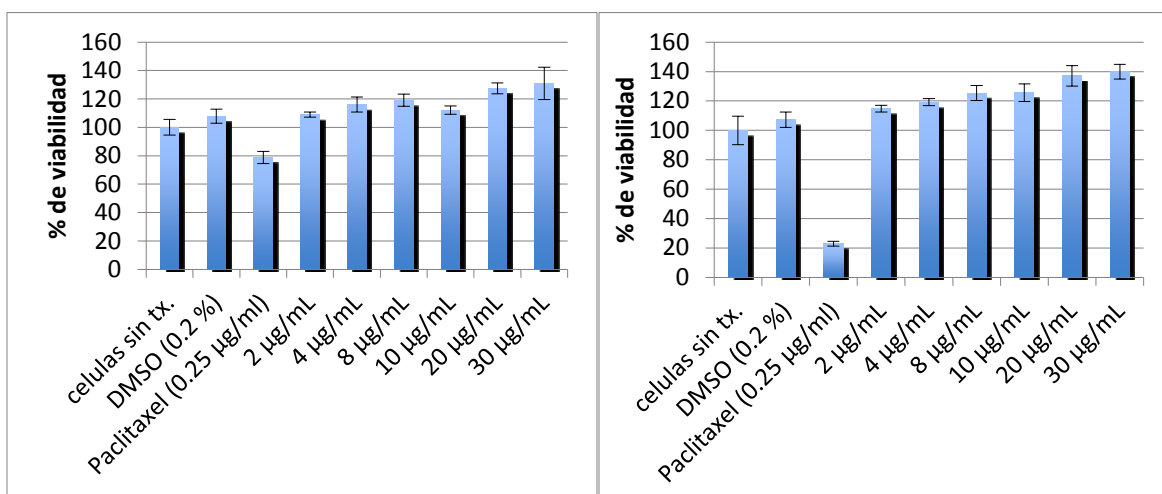


Figura 23. Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de cancerina a 24 y 72 horas.

Por otro lado, el extracto de cancerina en éter de petróleo (figura 24) a 24 horas indujo una disminución en la viabilidad celular para dosis mayores o iguales a 10 µg/mL, este efecto fue incrementado en el tratamiento a 72 horas, en donde la viabilidad celular disminuyó para todas las dosis evaluadas (5-30 µg/mL). Se obtuvieron valores de DE<sub>50</sub> de 13.89 µg/mL para 24 horas y 19.08 µg/mL a 72 horas de tratamiento. Estos valores son adecuados para continuar con el estudio del extracto, ya que presenta potencial para la identificación y desarrollo de compuestos con actividad antineoplásica, por lo que el extracto continuó siendo evaluado de acuerdo a la descripción metodológica. Sin embargo, al observar el gráfico de 72 h, se dedujo que existió un error en las evaluaciones de 5 y 10 µg/mL, por lo que se decidió repetir el ensayo, se realizó nuevamente la extracción, mejorando el procedimiento para retirar una mayor cantidad de goma del extracto, y se probó nuevamente en cultivo celular en tres ensayos independientes con 6 réplicas cada uno, los resultados permitieron descartar el error en las evaluaciones de 5 y 10 µg/mL y

además, se observó una disminución de la DE<sub>50</sub>, siendo ésta de 16.14±3.40 µg/mL a 24 h (figura 25) y de 8.48±0.65 µg/mL a 72 h (figura 26).

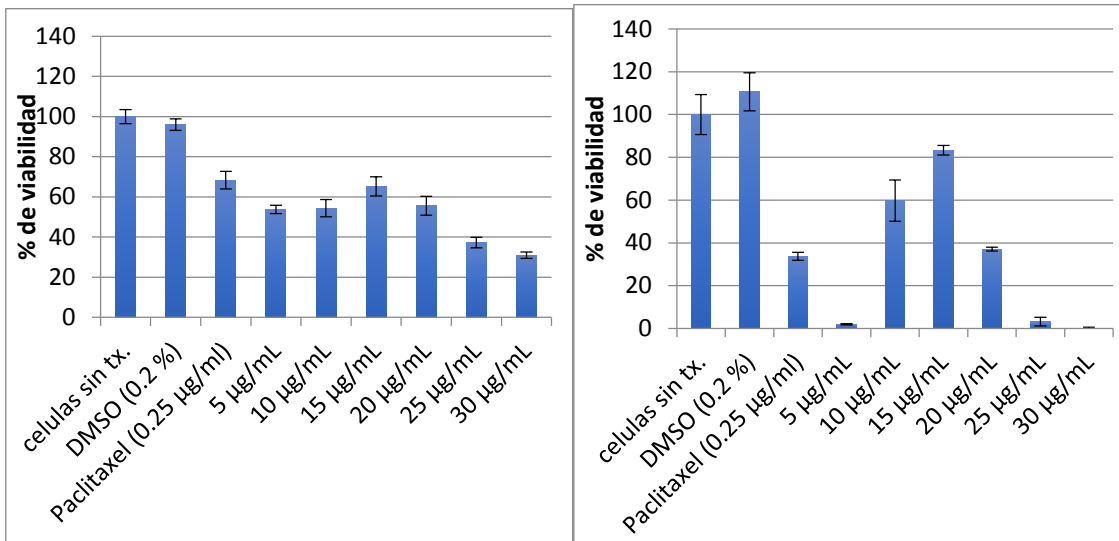


Figura 24 Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 24 y 72 horas.

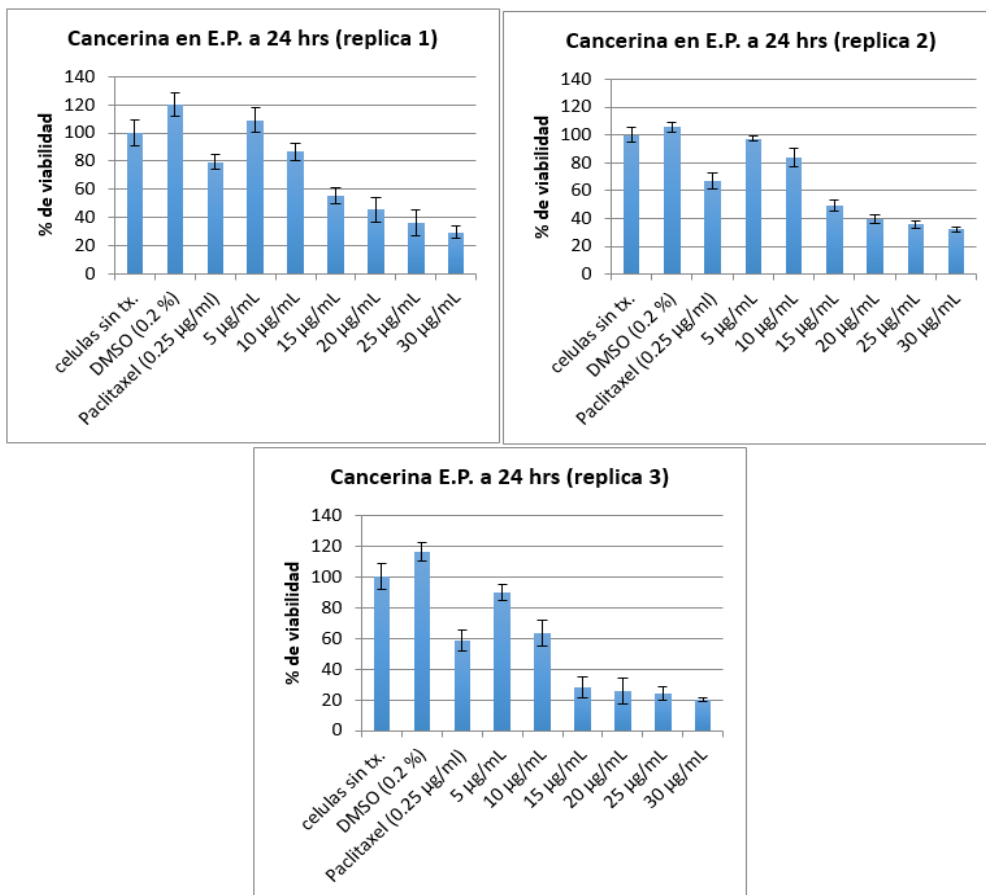


Figura 25 Réplicas del ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 24 horas

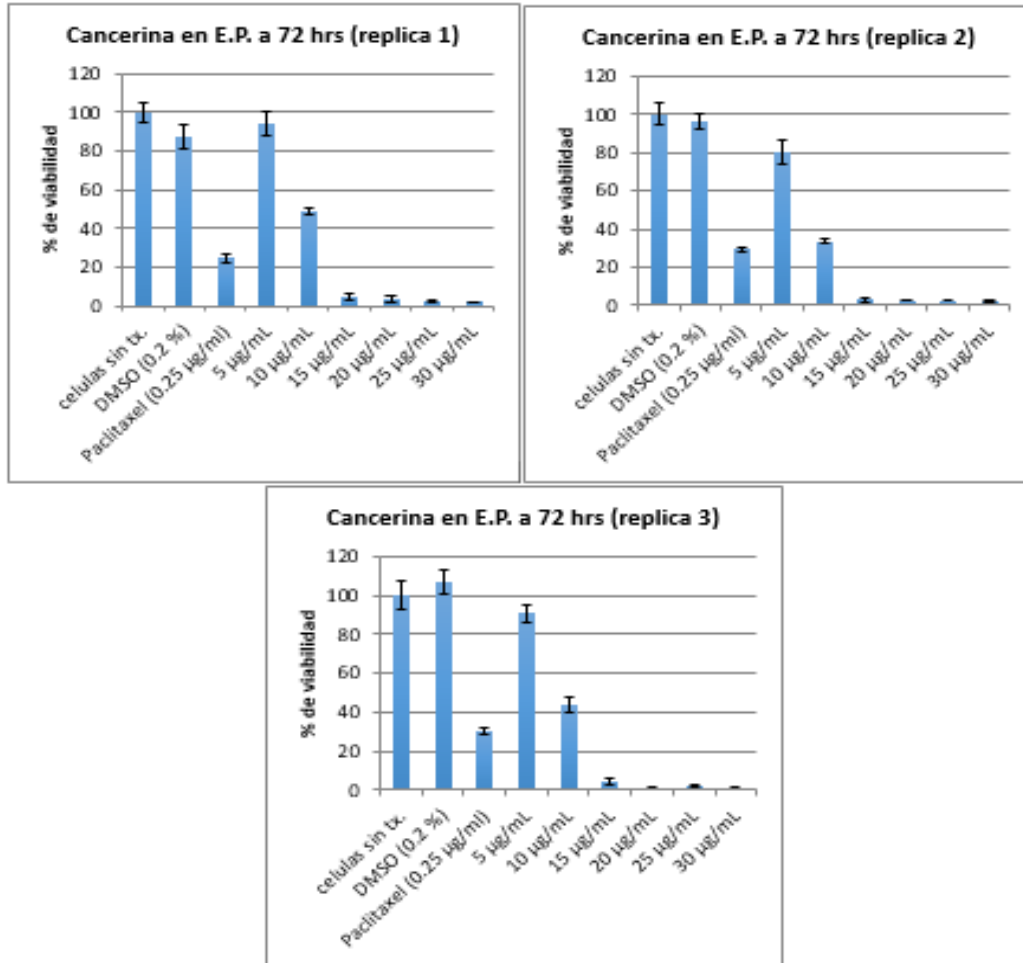


Figura 26 Réplicas del ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de cancerina a 72 horas

El extracto de muicle en agua no mostró actividad citotóxica a 24 h y 72 h de tratamiento (Figura 27). Mientras que el extracto de muicle obtenido en etanol (Figura 28) indujo una ligera disminución de la viabilidad celular para ambos tiempos evaluados, sin embargo, los valores de DE50 para este extracto no lo clasifican como candidato para continuar con el estudio.

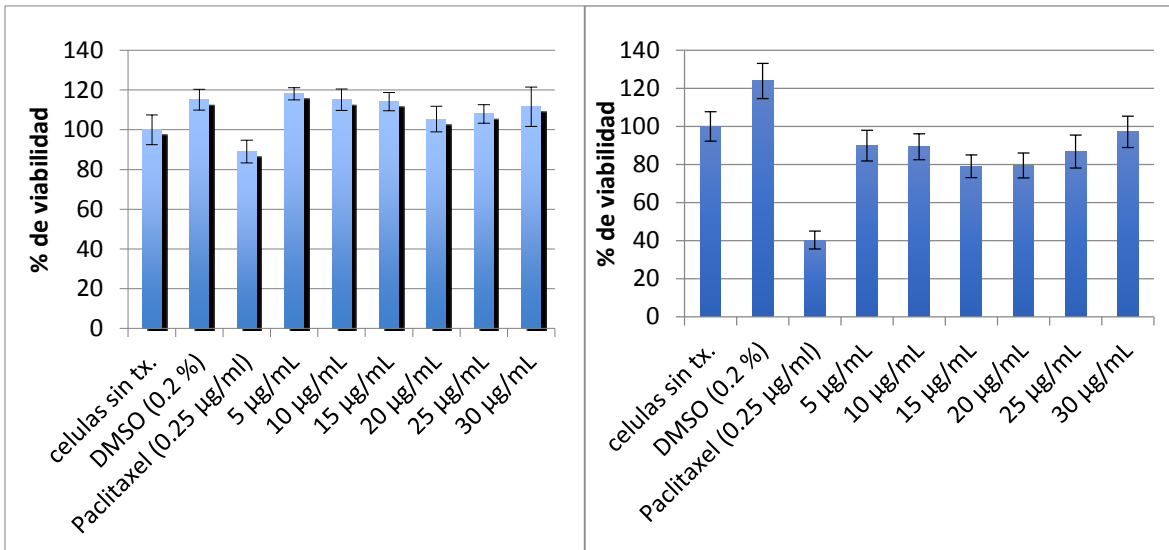


Figura 27. Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de muicle a 24 y 72 horas.

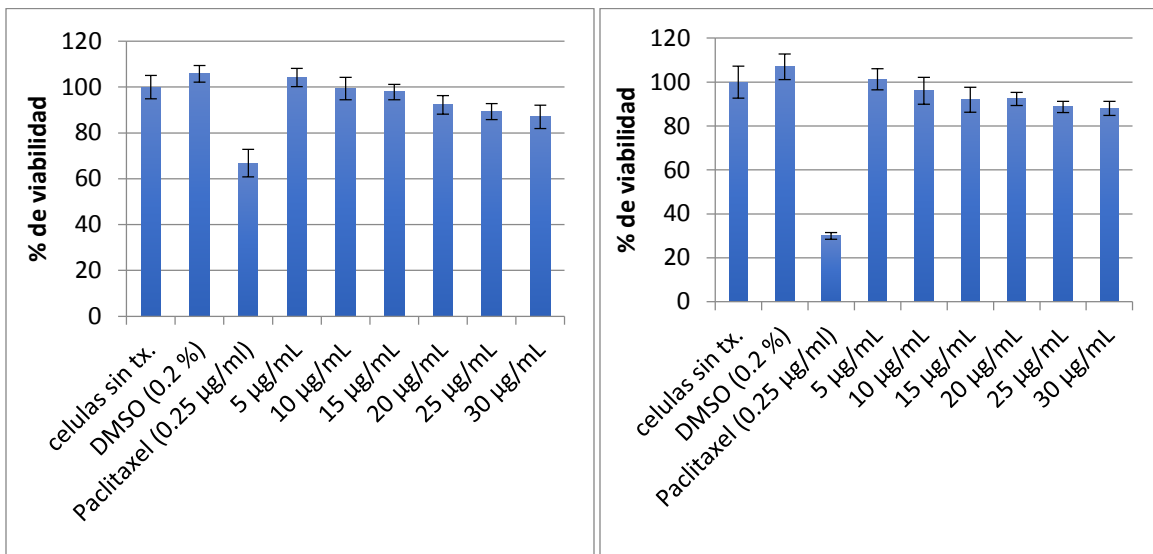


Figura 28. Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de muicle a 24 y 72 horas.

En la figura 29 se presenta el efecto del extracto de muicle en éter de petróleo donde a 24 horas no presenta algún efecto en la viabilidad y a 72 horas hay una ligera disminución en la viabilidad, pero no es suficiente para considerar el extracto como citotóxico.

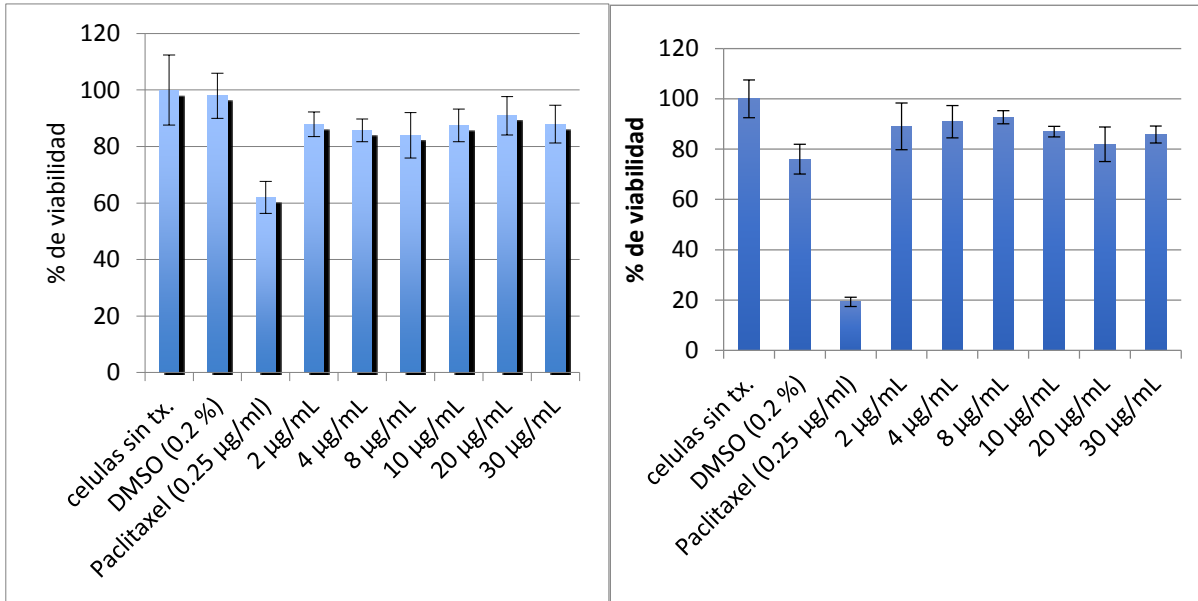


Figura 29. Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de muicle a 24 y 72 horas.

En la figura 30 se observa que no hay efecto del extracto de tejocote en agua a 24 y 72 h en la viabilidad celular, por lo que no se consideró citotóxico, por su parte, los extractos de tejocote en etanol y éter de petróleo (figuras 31 y 32) mostraron un efecto proliferativo acentuado a las 72 h de tratamiento, por lo que fueron descartados del estudio.

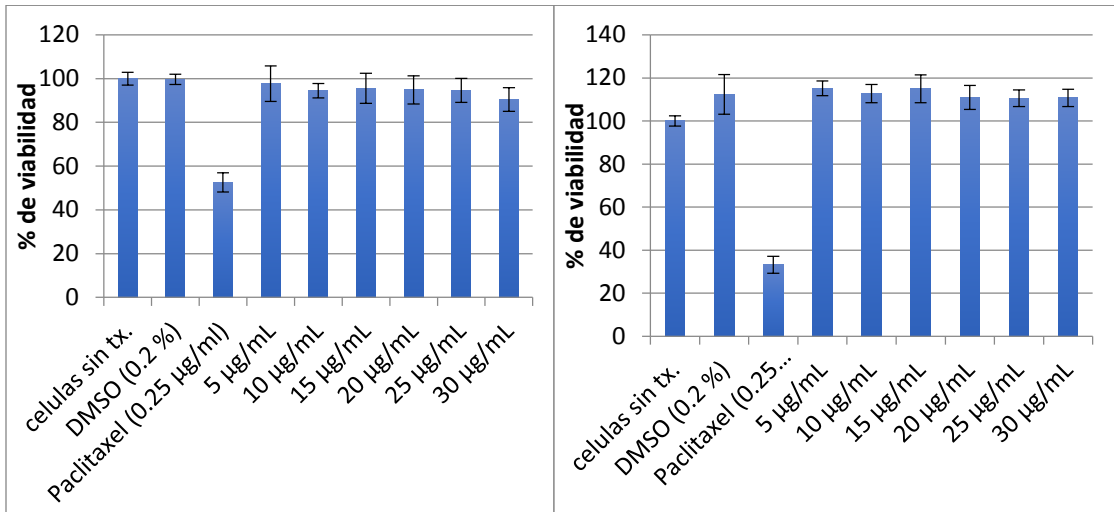


Figura 30. Ensayo de citotoxicidad del extracto en agua de tejocote a 24 y 72 horas.

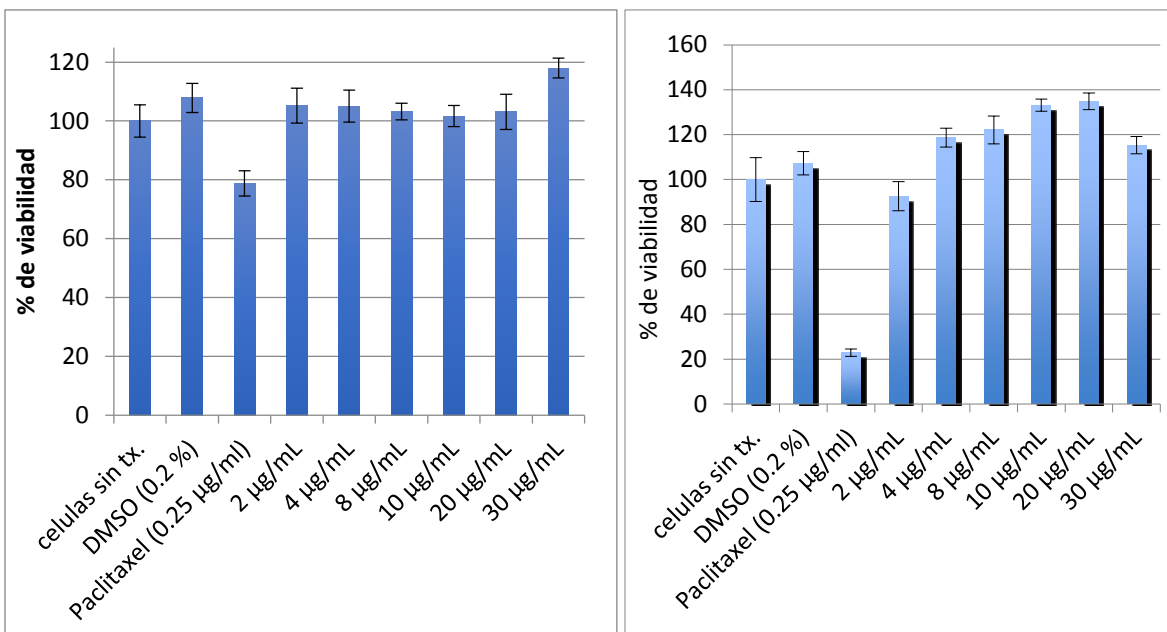


Figura 31 Ensayo de citotoxicidad del extracto en etanol de tejocote a 24 y 72 horas

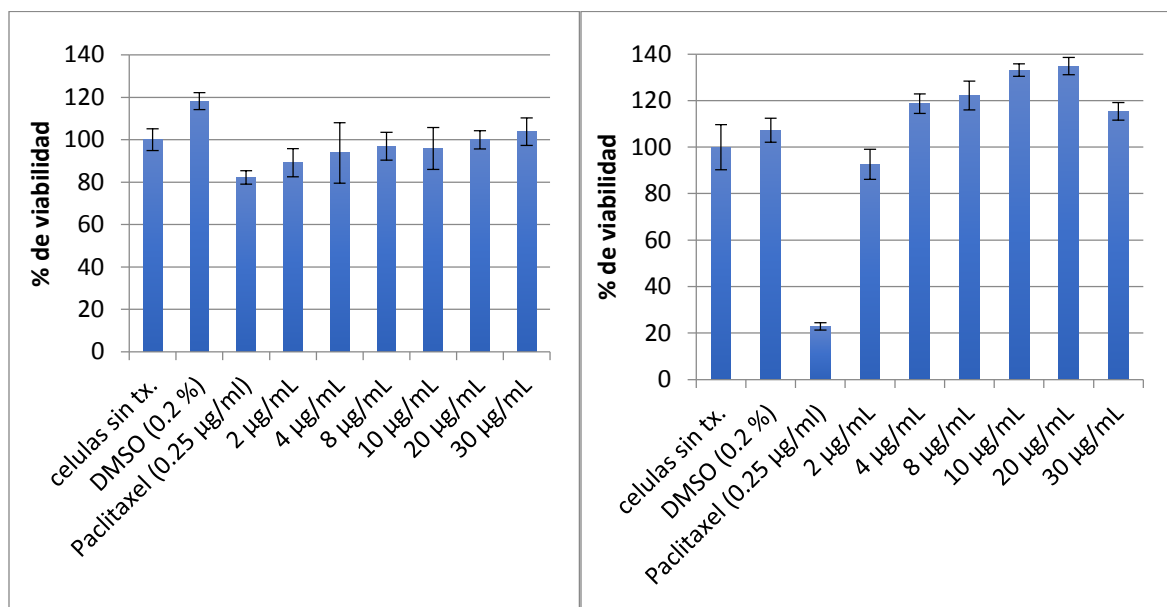


Figura 32. Ensayo de citotoxicidad del extracto en éter de petróleo de tejocote a 24 y 72 horas.

Como resultado se identificó que, de los seis extractos, el extracto de cancerina en éter de petróleo tiene un efecto citotóxico a 24 y 72 horas (tabla 15) por lo tanto, este extracto es candidato al fraccionamiento para la purificación del compuesto activo y para observar si se mejora la actividad citotóxica al separar a los compuestos activos.



Tabla 17 Valores de DE<sub>50</sub> de los extractos a 24 y 72 en la línea celular MDA-MB-231.

Línea celular	Planta	Extracto	DE <sub>50</sub> 24h	DE <sub>50</sub> 72H
MDA-MB-321	Cancerina	Agua	NC	NC.
		Etanol	NC	NC
		Éter de Petróleo	13.89 µg/mL	19.08 µg/mL
	Muicle	Agua	NC	NC
		Etanol	NC	NC
		Éter de Petróleo	NC	NC
	Tejocote	Agua	NC	NC
		Etanol	NC	NC
		Éter de Petróleo	NC	NC

NC: No Citotóxico

#### 4.3 Estandarización de la técnica cromatográfica e identificación de los metabolitos secundarios.

En los ensayos de TLC, para la fase estacionaria se utilizó una placa de sílica gel de 1 cm de ancho por 10 cm de alto; mientras que para la fase móvil se utilizaron varios sistemas con diferentes polaridades como se muestra en la tabla 16.

Tabla 18 Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos de los extractos.

Disolvente	Relación	Numero de manchas Cancerina
Cloroformo	10	-
Cloroformo / Ácido Acético	09:01	-
Cloroformo / Acetona	05:05	-
Cloroformo / Ácido Acético / Éter de petróleo	6:3.5:0.5	++++
Cloroformo / Ácido Acético / Acetato de Etilo	4.5:4.5:1	+++

+: Número de manchas observadas correspondientes a los compuestos químicos





De estos sistemas se eligió el de cloroformo, ácido acético y éter de petróleo para la evaluación del extracto en éter de petróleo de cancerina, en relación 6:3.5:0.5, estos sistemas se siguieron trabajando para mejorar la separación de los componentes del extracto, de acuerdo a la tabla 17.

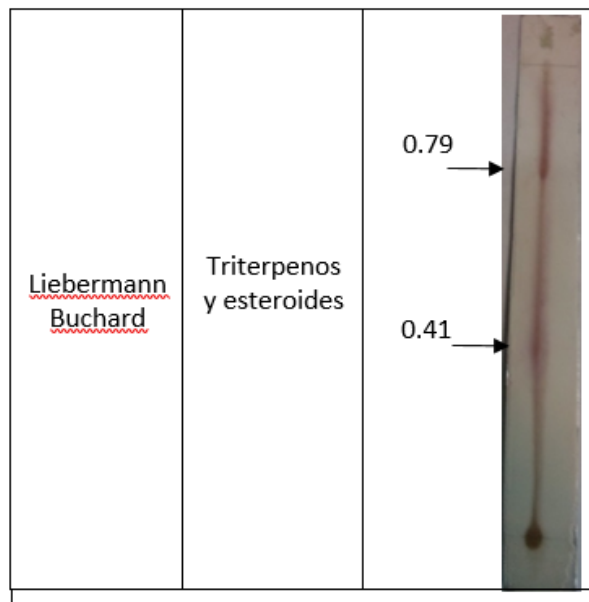
Tabla 19 Sistemas de la fase móvil para separar los compuestos de los extractos de cancerina.

Sistema de disolvente	6:0.5:3.5	07:01:02	5:0.25:4.75	5.75:1:3.25
Cloroformo / Ácido Acético / Éter de petróleo	++++	++++	++++	++++

La fase móvil más apropiada para el extracto cancerina está formada por cloroformo, ácido acético y éter de petróleo a una relación 5.75:1:3.25 (tabla 17). Para la identificación de las familias de compuestos químicos que forman parte de los extractos en éter de petróleo se realizaron ensayos empleando reveladores específicos (tabla 18) y se calculó el Rf.

Tabla 20 Revelamiento fotoquímico del extracto en éter de petróleo de cancerina.

Revelador	Compuesto que identifica	Placas cromatográficas	Revelador	Compuesto que identifica	Placas cromatográficas
		Cancerina			Cancerina
Yodo	Compuestos generales		Reactivo Citrobórico	Flavonoides	
Hidróxido de potasio 5%	Cumarinas volátiles		Vainillina Ácido sulfúrico	Saponinas	



En la tabla 18 se presenta el análisis fitoquímico de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de cancerina en éter de petróleo donde se detectó la presencia de ácidos grasos al observarse manchas de color amarillo con un Rf de 0.55 y 0.86, se observó una coloración amarilla con un Rf de 0.9 para saponinas y se detectó la presencia de triterpenos y esteroides al observarse una mancha de color café y rosa con un Rf de 0.41 y 0.79, en la tabla 19 se muestra un resumen de los resultados de los ensayos del análisis fotoquímico, sin embargo estos ensayos no pueden determinar si se refieren a los mismo metabolitos o son diferentes miembros de estas familias.

Tabla 21 Resultados de los reveladores con la técnica CCF.

Revelador	Molécula	Cancerina
Cristales de Yodo	Ácidos grasos saturados	+
Hidróxido de potasio 5%	Cumarinas volátiles	-
Citroborico	Flavonoides	-
Vainillina Ácido sulfúrico	Saponinas.	+
Liebermann Buchard	Triterpenos y esteroides	+ +

#### 4.5 Cromatografía Preparativa.

Se realizó otra extracción de cancerina en éter de petróleo y el volumen del extracto se redujo hasta 20 mL en estufa de vacío, después se inyectó el extracto en el equipo de Cromatografía Preparativa de la marca Büchi modelo C-660 para llevar a cabo su separación, se utilizó como fase móvil el sistema de cloroformo, ácido acético y éter de petróleo a una relación 5.75:1:3.25 que se obtuvo mediante CCF y se utilizó una columna empacada de sílica gel con un tamaño de partícula menor a 5 $\mu$ m, tamaño de poro de 60 Å, un área superficial específica de 483 m<sup>2</sup>/g, las condiciones de operación fueron a un flujo de 20 mL/min, presión de columna 16 bar, temperatura ambiente y el detector del equipo operó a 428 nm, con una sensibilidad de 5%, la longitud de onda fue seleccionada a partir de los resultados de espectroscopia UV-Vis del extracto de cancerina en éter de petróleo.

La muestra fue inyectada al sistema y se fue incorporando a la fase móvil, la cual era bombeada a un flujo de 20 mL/min, poco a poco la muestra fue ingresando a la columna de gel de sílica donde se llevó a cabo su separación, ésta al salir de la columna continua al detector UV/Vis donde al percibir una variación en la absorbancia el equipo cambia el tubo de cristal de un volumen de 30 ml donde se va colectando, una vez terminado el fraccionamiento con la fase móvil se realizó un lavado a la columna donde se utilizó acetona y metanol, los cuales también fueron colectados.

Con el fraccionamiento se obtuvieron 16 tubos de los cuales los primeros 8 son con la fase móvil de cloroformo, ácido acético y éter de petróleo, del tubo 9, 10 y 11 fueron con el lavado de acetona y los tubos 13, 14, 15 y 16 con el lavado de metanol. Se aplicó la técnica de espectroscopia UV-Vis para obtener los espectros de los tubos con el fin de agrupar aquellos que tuviesen espectros similares, a continuación, se muestra los espectros que se obtuvieron del fraccionamiento (figura 33).

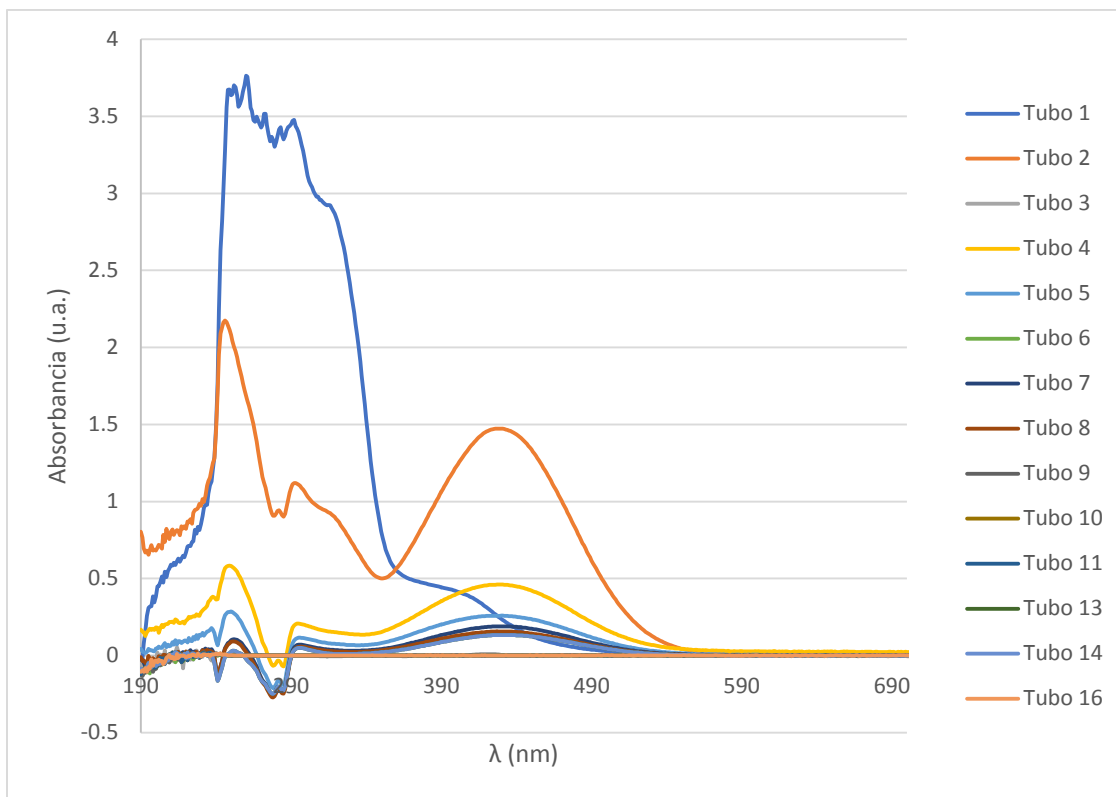


Figura 33. Espectroscopia UV/Vis de las fracciones obtenidas por cromatografía preparativa.

Se analizaron los espectros obtenidos de las fracciones de cancerina y se observó que algunos presentaban similitudes por lo que se tomó la decisión de agruparlos debido a que se puede inferir que espectros similares corresponden a estructuras similares y se obtuvieron cinco fracciones.

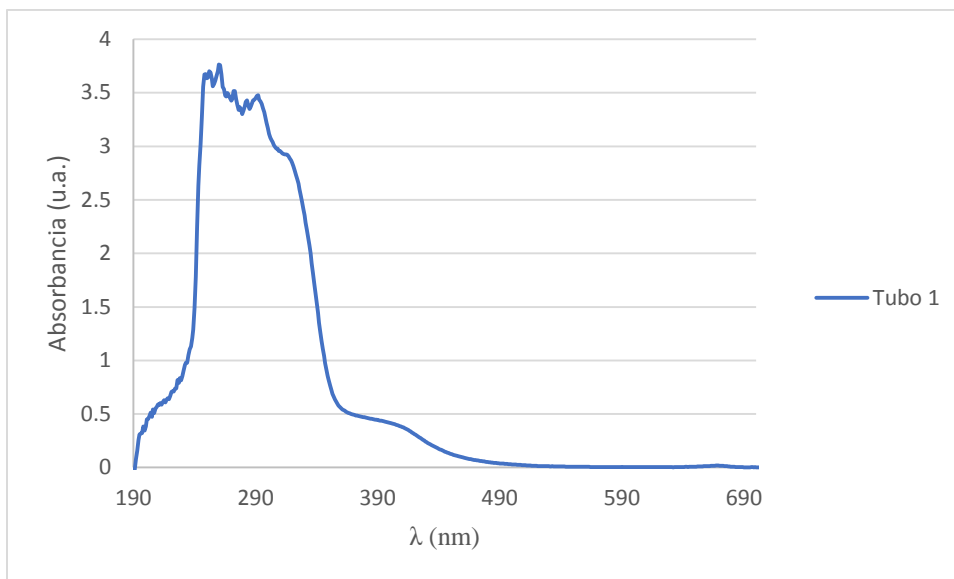


Figura 34. Espectro UV/Vis de la fracción 1 del tubo 1 del extracto de cancerina.

La primera fracción corresponde al tubo 1 obtenido con la fase móvil, este espectro no tiene similitudes con los espectros que le siguen (figura 34). Para este espectro se observó una señal en 275 nm y 400 nm que pueden corresponder a sesquiterpenos (Hernandez, 2013).

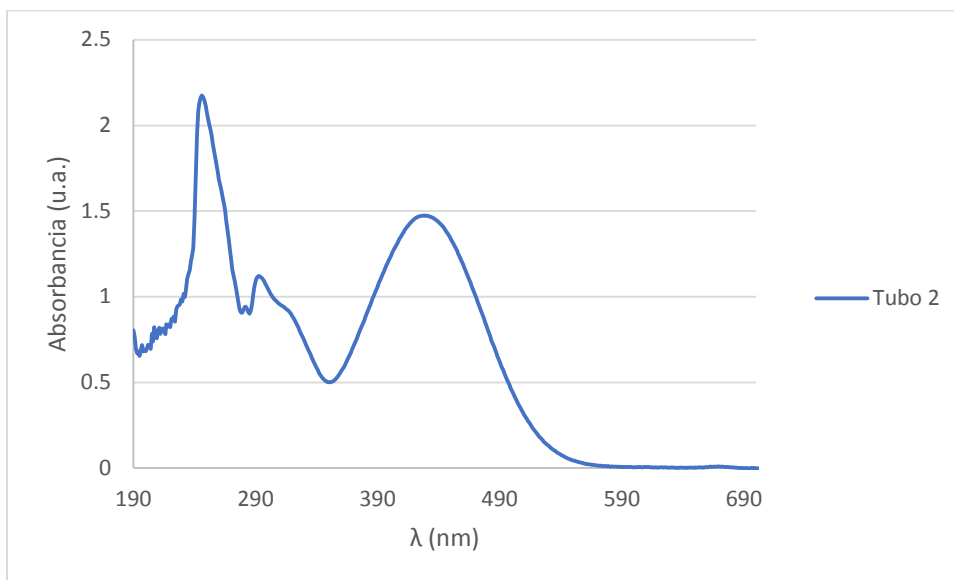


Figura 35. Espectro UV/Vis de la fracción 2 del tubo 2 del extracto de cancerina.

La segunda fracción corresponde al tubo 2 obtenido con la fase móvil (figura 35). En este espectro se observa una señal intensa en 290 nm similar a la de policetidos, después se ven dos señales en 255 nm y 430 nm (Khalid, Friedrichsen, Christensen, El Tahir, & Satti, 2007) que son características de la molécula pristimerina (Khalid, Friedrichsen, Christensen, El Tahir, & Satti, 2007).

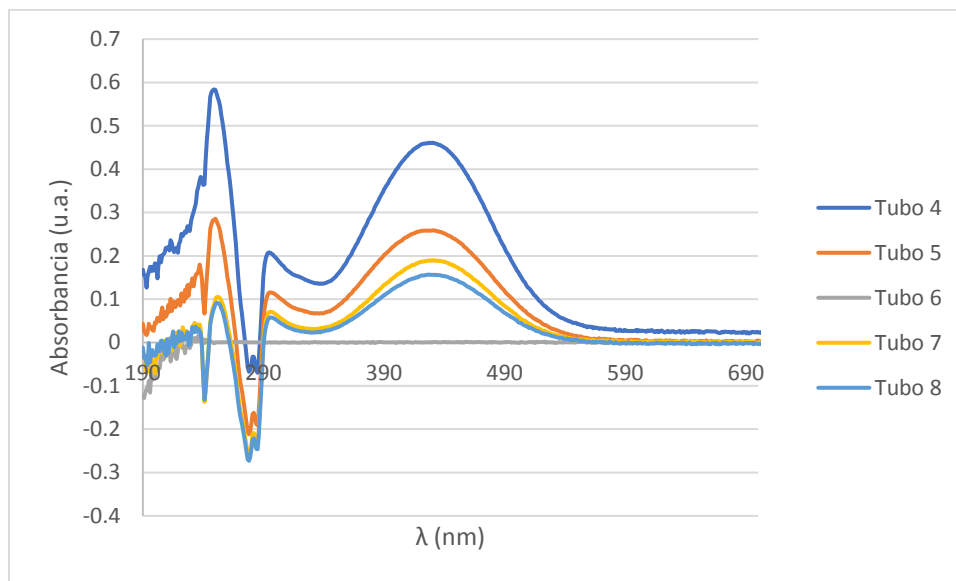


Figura 36. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 4, 5, 6, 7 y 8 del extracto de cancerina.

La fracción tres se constituyen de los tubos 4, 5, 6, 7 y 8 obtenidos de la fase móvil (figura 36). En estos espectros se aprecia una ligera señal en 240 nm, después un pico intenso en 250 nm que es característico de los policetidos, después dos señales en 300 nm y 435 nm que podrían ser sesquiterpenos (Hernandez, 2013) o señales características de pristimerina (Khalid, Friedrichsen, Christensen, El Tahir, & Satti, 2007).

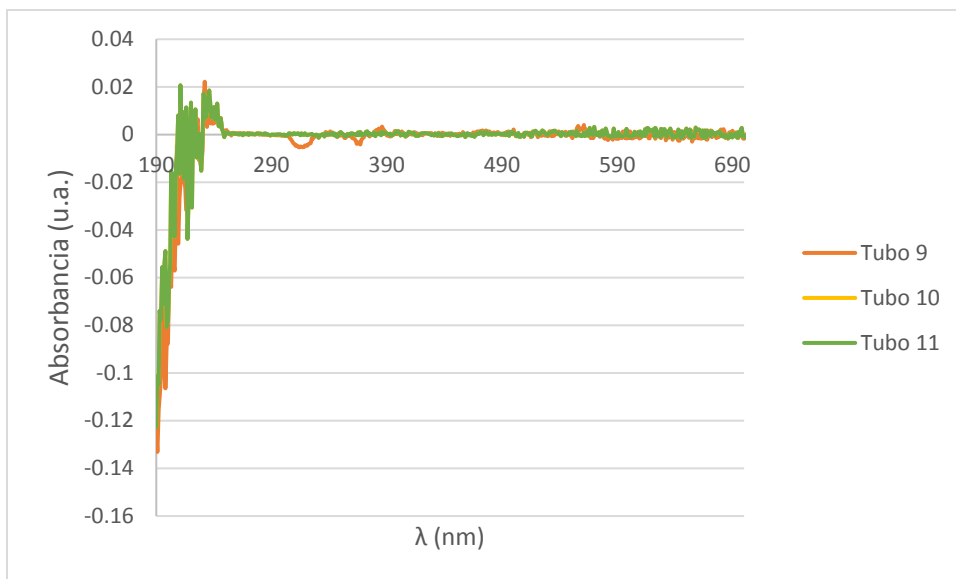


Figura 37. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 9, 10 y 11 del extracto de cancerina.

Para la fracción 4 se tomaron los tubos 9, 10 y 11 que se obtuvieron del lavado de acetona (figura 37), en este espectro no se puede visualizar una señal característica de alguna molécula, esto se puede deber a la mezcla que hubo entre la fase móvil y la acetona, ya que el blanco que se usó para los estudios de UV-Vis no tuvo la misma proporción.

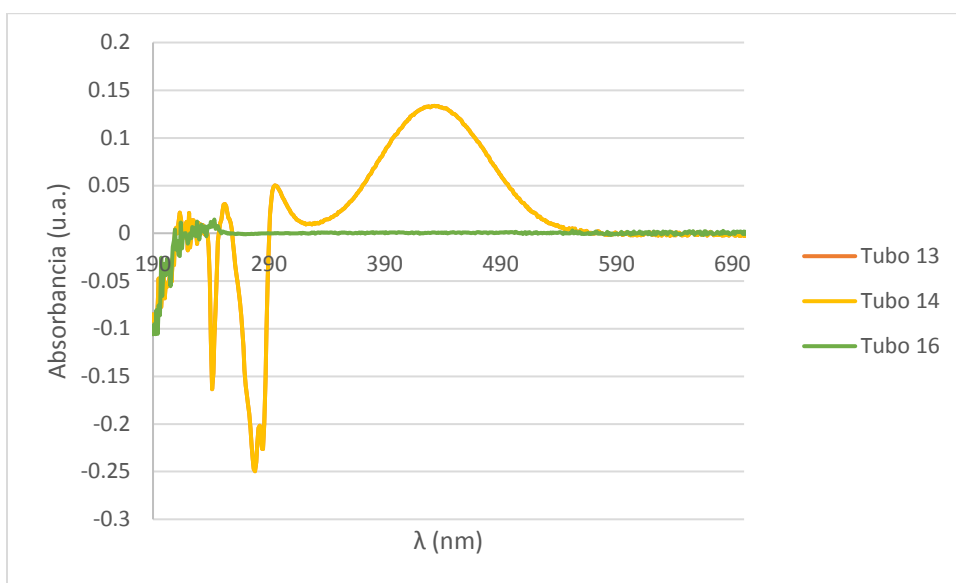


Figura 38. Espectro UV/Vis de la fracción 3 de los tubos 13, 14 y 16 del extracto de cancerina.



La fracción cinco está compuesta por los tubos 13, 14, 15 y 16 que se obtuvieron del lavado de metanol (figura 38), en este espectro se aprecian señales en 240 nm que podría pertenecer a policetidos (Alvarado, 2015) y otras señales en 330 nm y 440 nm que son de sesquiterpenos (Hernandez, 2013).

El peso obtenido en las fracciones del extracto de cancerina en éter de petróleo se presenta en la tabla 20.

*Tabla 22 Pesos de las fracciones del extracto de cancerina en éter de petróleo.*

<b>FRACCIÓN</b>	<b>TUBOS</b>	<b>PESO</b>
<b>C1</b>	1	208 mg
<b>C2</b>	2	136.8 mg
<b>C3</b>	4, 5, 6, 7 y 8	24.2 mg
<b>C4</b>	9, 10 y 11	114.8 mg
<b>C5</b>	13, 14 y 16	10 mg

#### 4.6 Ensayo de citotoxicidad de las fracciones del extracto de cancerina.

Se evaluó el efecto de las fracciones del extracto de cancerina en éter de petróleo sobre la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. El ensayo cuenta con tres controles, el primero son células sin tratamiento, el segundo células con DMSO al 0.2%, esta proporción no alcanza concentraciones citotóxicas y tercero fue paclitaxel al 0.25 µg/mL como control positivo, el cual es un medicamento antineoplásico ya conocido y es utilizado en la quimioterapia de cáncer de mama (Klauber, Paragi, Flynn, Hamel, & D'Amato, 1997).

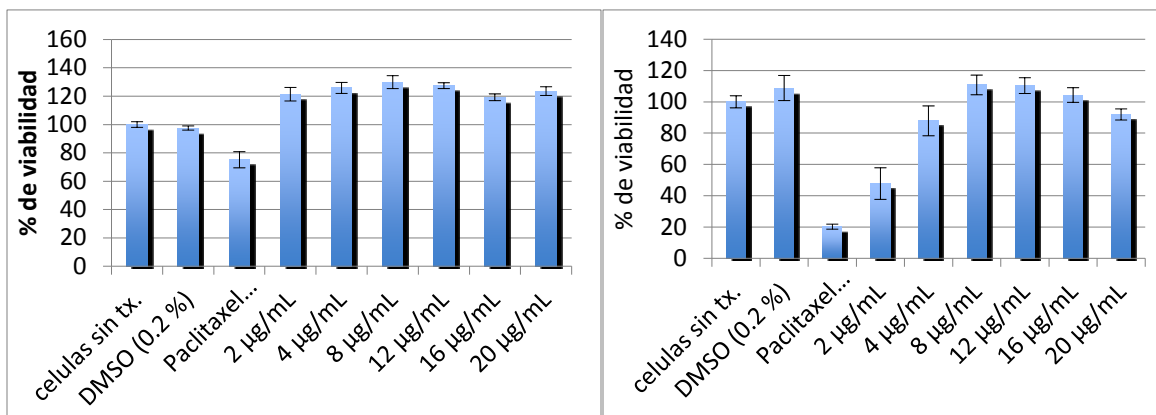


Figura 39. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C1 a 24 y 72 horas.

La fracción C1 (figura 39) presenta un efecto proliferativo a 24 horas, mientras que a las 72 horas en la concentración de 2 µg/mL hay una disminución de la viabilidad en las células este efecto va decreciendo mientras la concentración va aumentando, hasta una concentración de 12 µg/mL en donde empieza a disminuir ligeramente la viabilidad, esta fracción no presentó citotoxicidad.

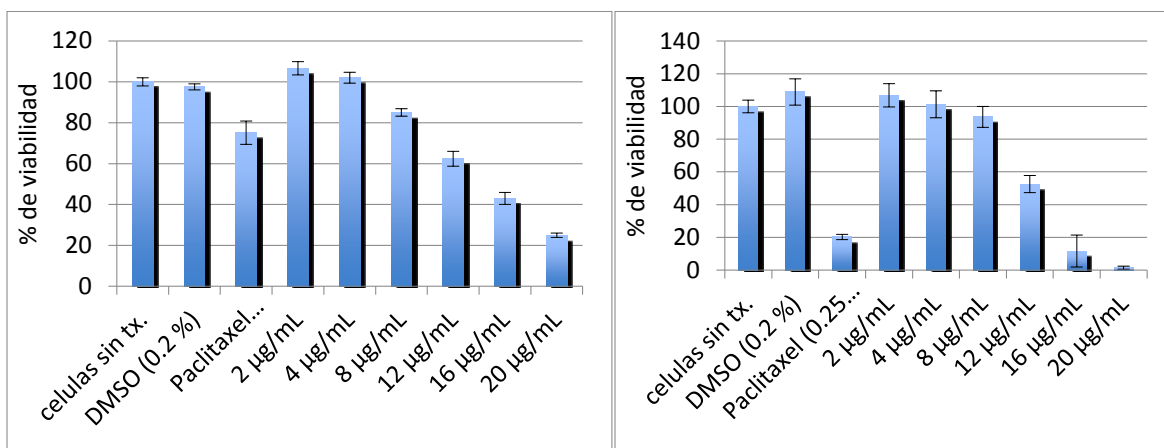


Figura 40. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C2 a 24 y 72 horas.

Para la fracción C2 (figura 40) la viabilidad celular decreció mientras la concentración aumentó, se aprecia un efecto citotóxico con una  $DE_{50}$  de 14.72 µg/mL a 24 h, mientras que a 72 horas el comportamiento se repite con una  $DE_{50}$  de 12.06 µg/mL.

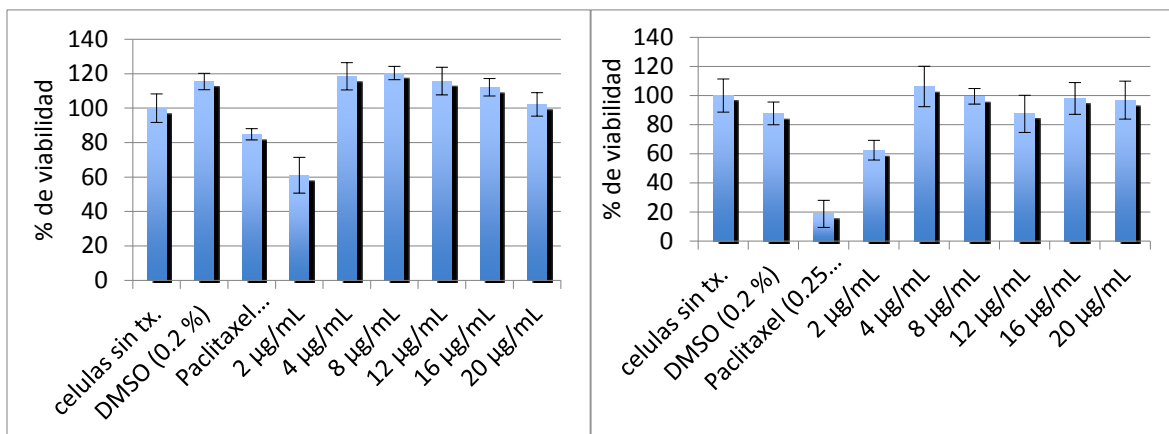


Figura 41. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C3 a 24 y 72 horas.

Para la fracción C3 (figura 41) a 24 horas se aprecia un efecto proliferativo en las células y a 72 horas no se aprecia un efecto en la viabilidad celular, esta fracción no presentó citotoxicidad.

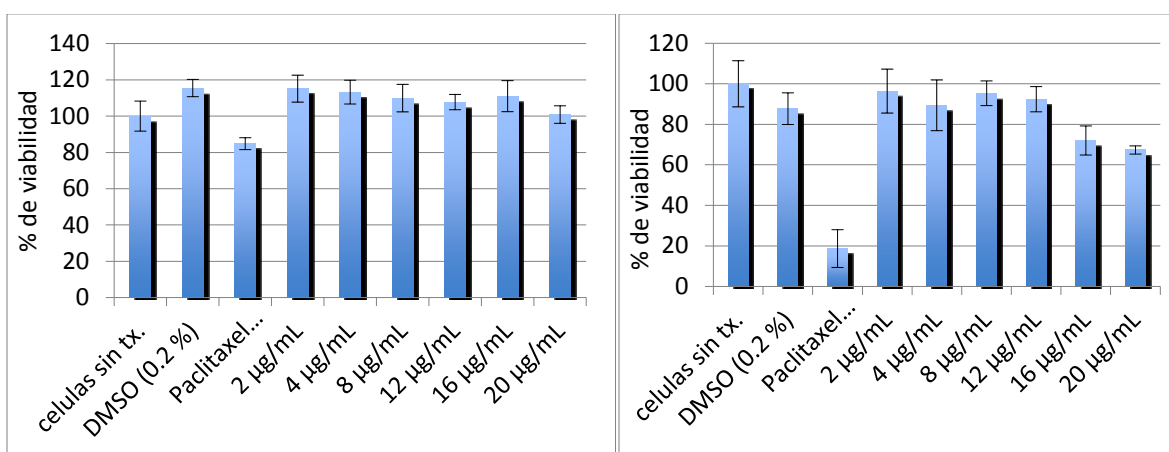


Figura 42. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C4 a 24 y 72 horas.

Por otro lado, la fracción C4 (figura 42) a 24 horas no mostró un efecto sobre la viabilidad celular, mientras que a 72 no afectó en la viabilidad entre las concentraciones 2 µg/mL y 12 µg/mL, posterior mente la viabilidad decreció ligeramente, sin embargo, su valor de  $DE_{50}$  es alto en comparación con los valores de  $DE_{50}$  del extracto crudo, por lo que este efecto no fue suficiente para considerar a la fracción con actividad citotóxica.

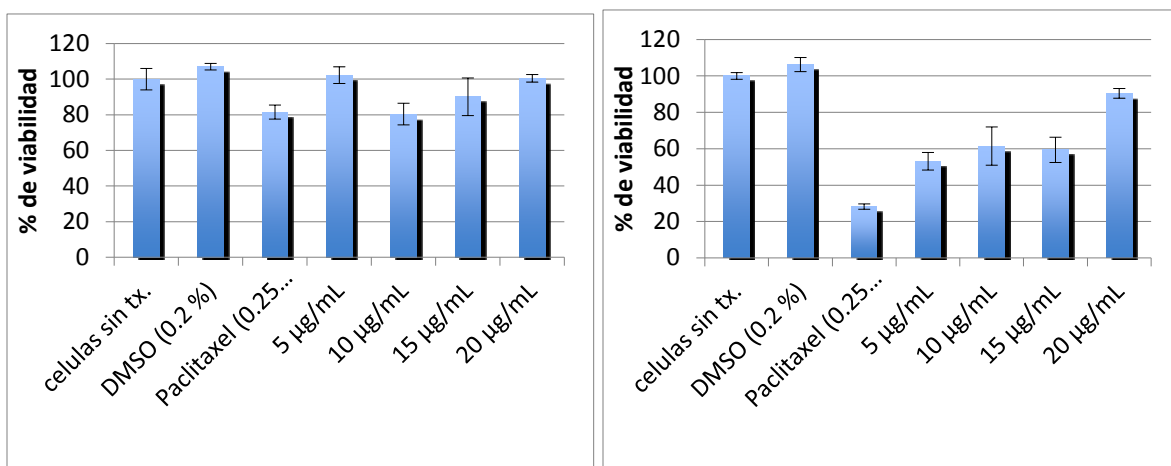


Figura 43. Ensayo de citotoxicidad de la fracción C5 a 24 y 72 horas.

Para la fracción C5 (figura 43) a 24 horas no se apreció un efecto en la viabilidad celular y a 72 horas hay una disminución en la viabilidad celular en 5 µg/mL este efecto va disminuyendo mientras la concentración va aumentando hasta 20 µg/mL, serán necesarios futuros ensayos para determinar a qué se debe este comportamiento, sin embargo, se descartó que la fracción presentara efectos citotóxicos.

Tabla 23 Valores de DE<sub>50</sub> de las fracciones a 24 y 72 en la línea celular MDA-MB-231

Línea celular	Fracción	DE <sub>50</sub> 24h	DE <sub>50</sub> 72H
MDA-MB-321	C1	NC	NC
	C2	14.72 µg/mL	12.06 µg/mL
	C3	NC	NC
	C4	NC	NC
	C5	NC	NC

#### 4.7 Análisis de la fracción de cancerina C2 con efecto citotóxico.

El análisis fotoquímico del extracto de cancerina en éter de petróleo dio positivo a saponinas, triterpenos y esteroides, por lo cual se realizó un ensayo colorimétrico a la fracción C2 para los metabolitos que se detectaron en el extracto crudo.

Tabla 24 Resultado de los ensayos colorimétricos de la fracción C2.

Revelador	Metabolito secundario	Fracciones C2
Espuma	Saponinas.	++
Liebermann-Buchard		
Rosenthaler		
Liebermann Buchard	Triterpenos	+
	Esteroides	-

La reacción de Lieberman Buchard dio positivo para triterpenos, donde se observó una coloración café, pero no dio positivo para esteroides, la reacción de Rosenthaler dio una coloración violeta, lo cual indica la presencia de saponinas triterpenoides, mientras que la prueba de espuma no dio positivo para saponinas con azúcares (tabla 25). En conclusión, en la fracción C2 se demuestra la presencia de moléculas de la familia de las saponinas, en específico de las saponinas triterpenoides o triterpenoides que son sapogeninas ácidas (figura 44).

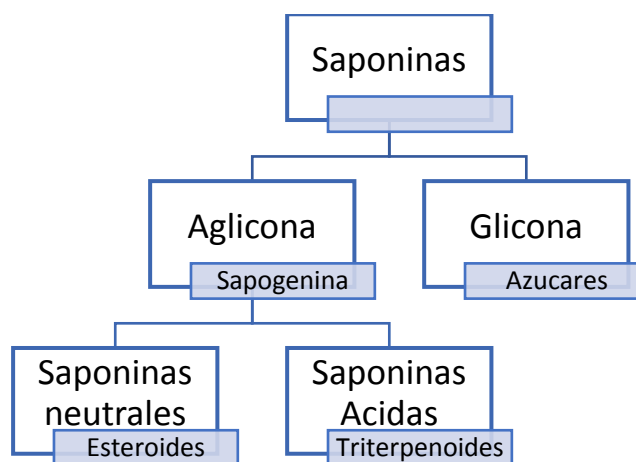


Figura 44. Clasificación de la familia de las saponinas.

Algunos triterpenos o saponinas triterpenoides que se han identificado en *Hippocratea excelsa* Kunth o *Semialarium mexicanum* (Miers) Menega (Gonzalo, Amilcar, Padilla, Toscano, & Quijano, 2005) son 29-hidroxifriedelan (1), miricadiol (2), pristimerina (3), tingenona (4), 29-hidroxiglutinol (5), dzununcanona (6) y xuxarina (7) (figura 45).

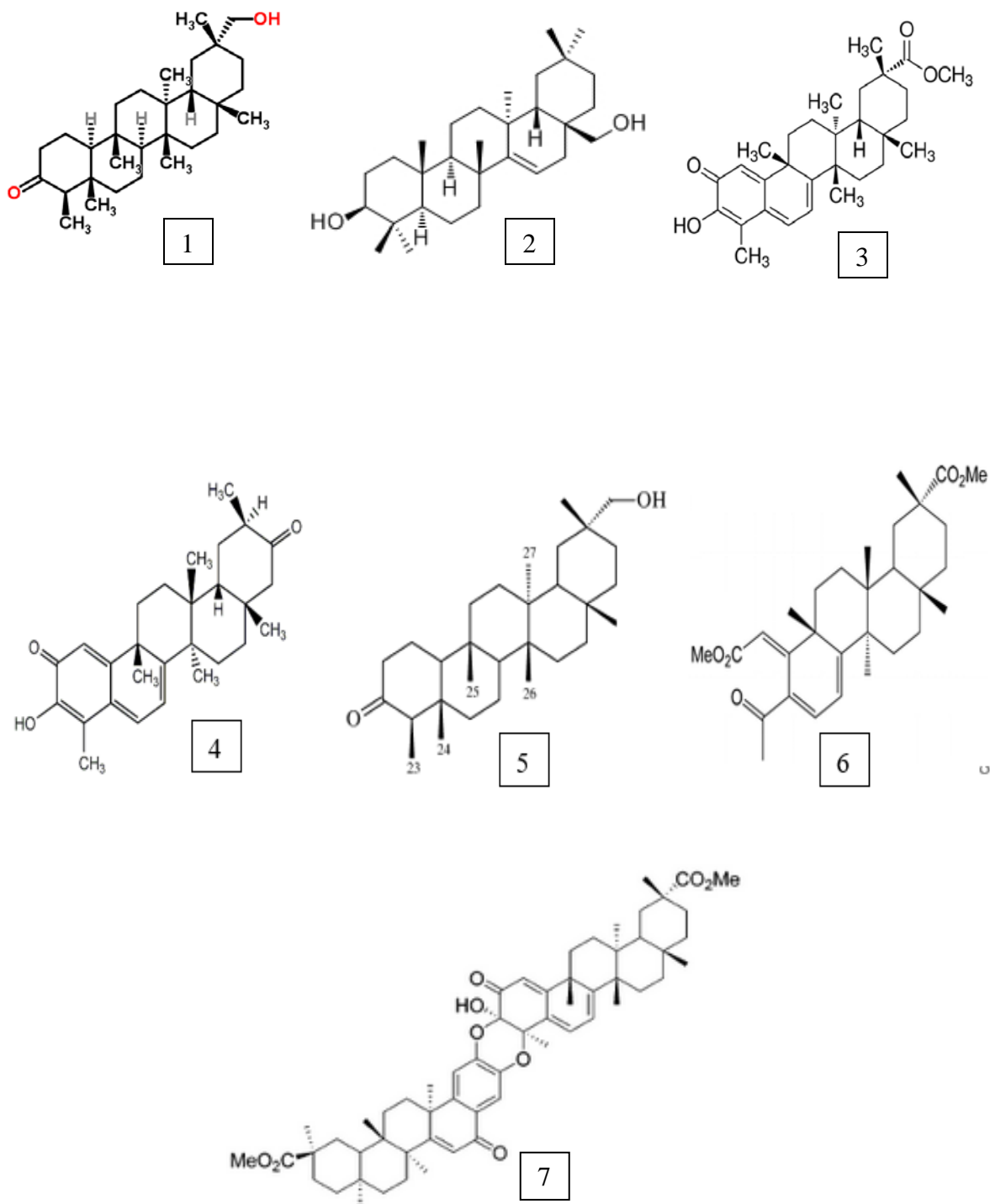


Figura 45 Triterpenos identificados en *Hippocratea excelsa* Kunth.

Pristimerina (3) es un triterpenoide natural y se ha aislado de *Celastrus* y *Maytenus* que pertenecen a la familia *Celastraceae* y se ha demostrado que la pristimerina tiene actividad antiinflamatoria y puede inhibir la proliferación de células tumorales mediante la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B y el ciclo celular (Li, Wang, & Jiang, 2012). Otras de estas moléculas como 29-hidroxifriedelan (1) se han reportado que miembros de la familia de los friedelanes presentan actividad citotóxica en la línea celular HeLa con una DE<sub>50</sub> de 21.6  $\mu$ g/mL y 17.6  $\mu$ g/mL (Wang, Zhang, & Pan, 2007) y dzununcanone (6) que es un derivado de pristimerina (Rejón, y otros, 2007).

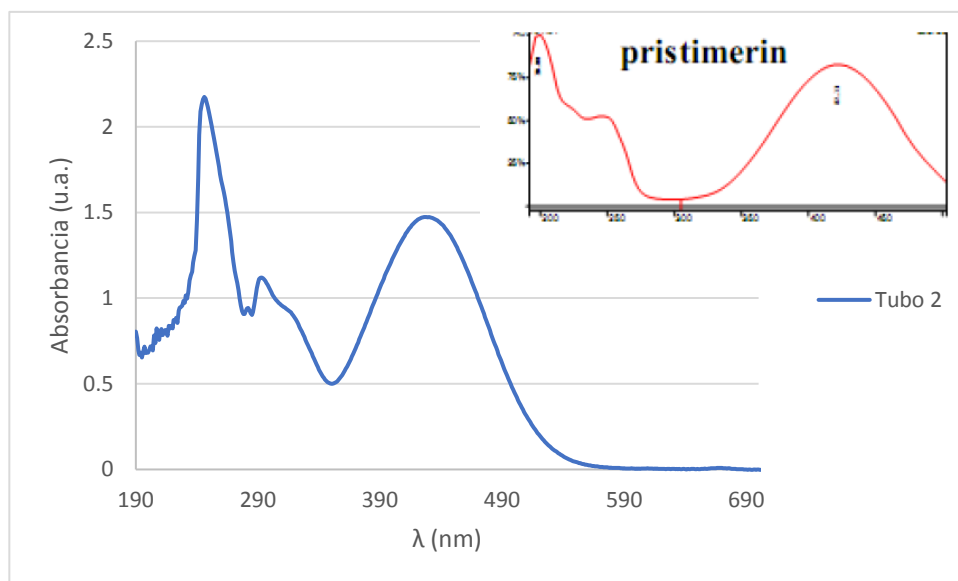


Figura 46 Espectroscopia UV-Vis de la fracción C2.

El análisis del espectro UV-Vis de C2 permitió observar tres señales a 250 nm, 298 nm y 430 nm, dos de las cuales son características del espectro de pristimerina (255 nm y 425 nm) (Khalid, Friedrichsen, Christensen, El Tahir, & Satti, 2007), ambos espectros tienen un comportamiento muy similar (figura 46).

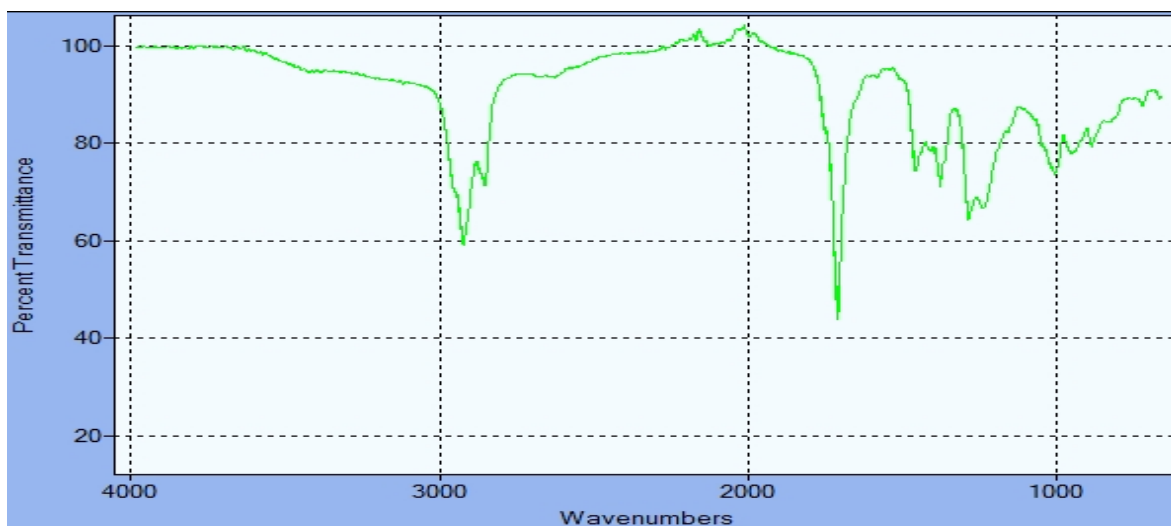


Figura 47 Espectrofometría FT-IR de la fracción C2.

En el espectro FT-IR de la fracción de cancerina C2 (figura 47) se encontraron bandas características de absorción en  $3117\text{ cm}^{-1}$  (hidroxilo),  $2952\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$  estiramiento asimétrico),  $2867\text{ cm}^{-1}$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$  estiramiento asimétrico),  $1711\text{ cm}^{-1}$  (grupo carbonilo),  $1605\text{ cm}^{-1}$  (Carbonilo conjugado del sistema de quinona metileno),  $1752\text{ cm}^{-1}$  (ciclohexanona),  $1411\text{ cm}^{-1}$  (aromático),  $1287\text{ cm}^{-1}$  y  $1240\text{ cm}^{-1}$  (fenoles),  $1112\text{ cm}^{-1}$  (alcohol secundario),  $954\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclobutano),  $1088\text{ cm}^{-1}$  y  $1021\text{ cm}^{-1}$  (derivado de ciclohexano) y  $1073\text{ cm}^{-1}$  (alcohol primario) (ver tabla 24).



Tabla 25 Señales de la espectrofotometría FT-IR de la fracción C2.

Intervalo (cm <sup>-1</sup> )	Especie química	Señal (cm <sup>-1</sup> )	
3200-2300	OH (H- enlace)	<b>3117</b>	
2855	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2867, 2854	
2925	-CH <sub>2</sub> estiramiento asimétrico	2923	
1725-1705	Éster carbonilo	<b>1711</b>	
1600	Carbonilo conjugado del sistema de quinona metileno	<b>1605</b>	
1726-1700	Ciclohexanona (vibración de tijera)	1752	
1500-1400	Aromático	1411	
1475-1425	-CH <sub>2</sub> -C=O (sistema de anillo pequeño)	1458	
1240-1130	Fenoles	1287, 1240	
1120-1030	Alcohol Secundario	1112	
1000-960	Derivado de Ciclobutano (vibración de anillo)	954	
1005-925	Derivado de Ciclohexano (vibración de anillo)	1008	
1055-1000		1021	
1380	-CH <sub>3</sub> estiramiento asimétrico	1378	
1075-1000	Alcohol Primario	1073	
1170, 1155	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (vibración del esqueleto)	1160	
840-790		828	
770-735S	1:2 disustituido (4 Hidrógenos libres)	755, 738	
900-860M	1:3 disustituido	(1 Hidrógeno libre)	887
810-750S		(3 Hidrógenos libres)	---
860-800S	1:4 y 1:2:3:4 sustituido (2 Hidrógenos libres)	840	
800-770S	1:2:3 trisustituido (3 Hidrógenos libres)	774	
900-860M	1:3:5 trisustituido (1 Hidrógeno libre)	---	
865-810S		---	
730-675S		723, 667	

El espectro de FT-IR de C2 tiene señales características de la molécula de pristimerina, las cuales son 3117 cm<sup>-1</sup> (3370 cm<sup>-1</sup> hidroxilo), 1711 cm<sup>-1</sup> (1735 cm<sup>-1</sup> éster carbonilo) y 1605 cm<sup>-1</sup> (carbonilo conjugado del sistema de quinona metileno) (Khalid, Friedrichsen, Christensen, El Tahir, & Satti, 2007) (figura 48).

En la figura 49 y 50 se presentan las moléculas dzununcanona y 29-hidroxifriedelan respectivamente, en las cuales se relacionaron con las señales que se obtuvieron de la espectrofotometría FT-IR de la fracción C2 (tabla 23).

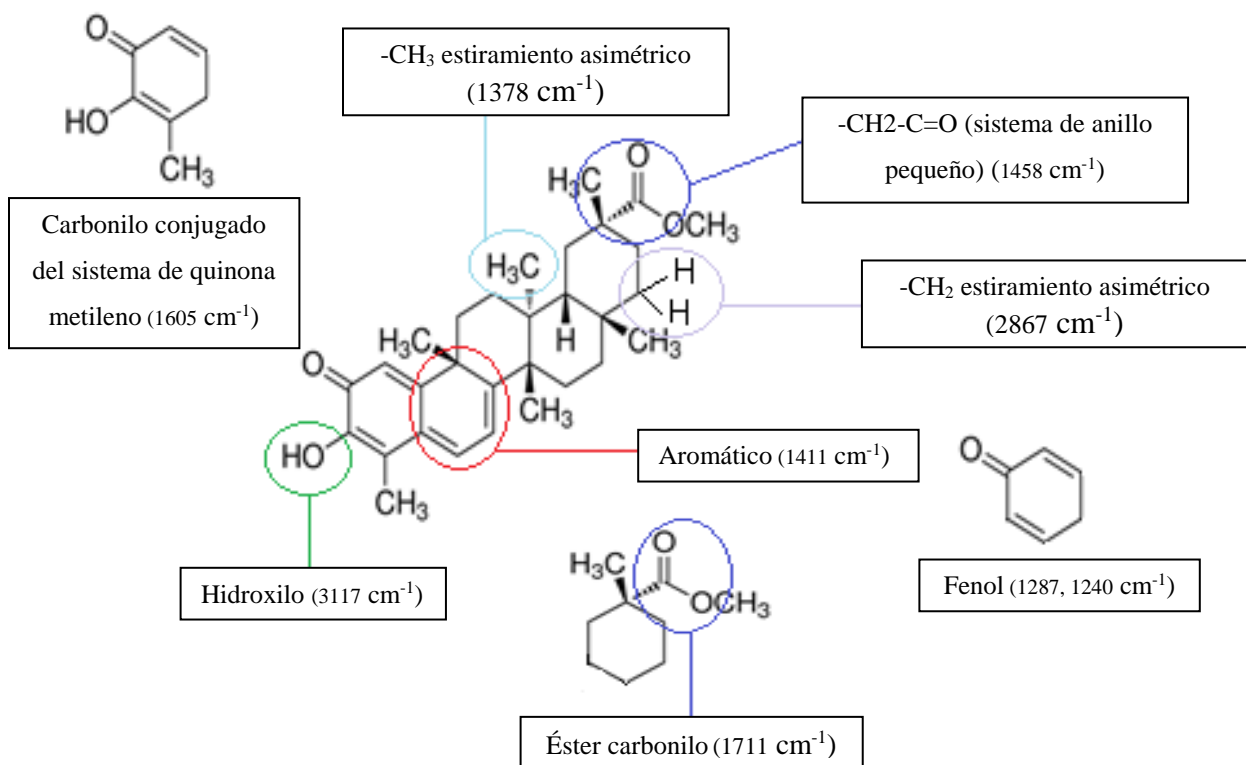


Figura 48 Molécula de pristimerina con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR.

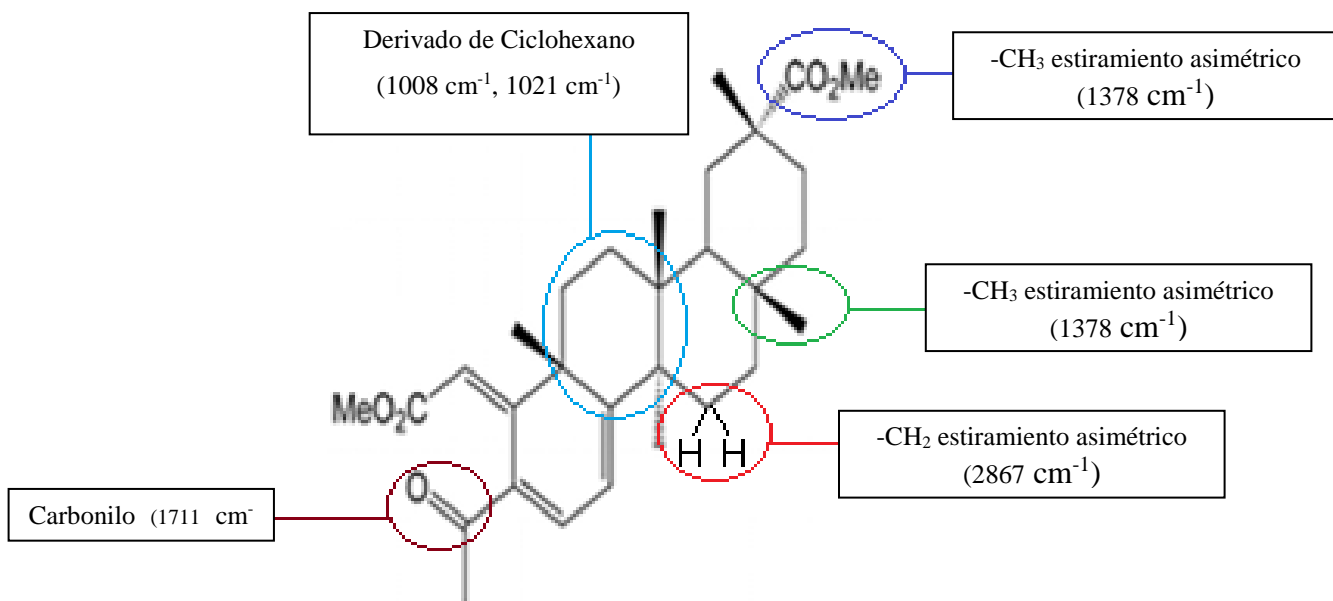


Figura 49 Molécula de dzununcanona con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR.

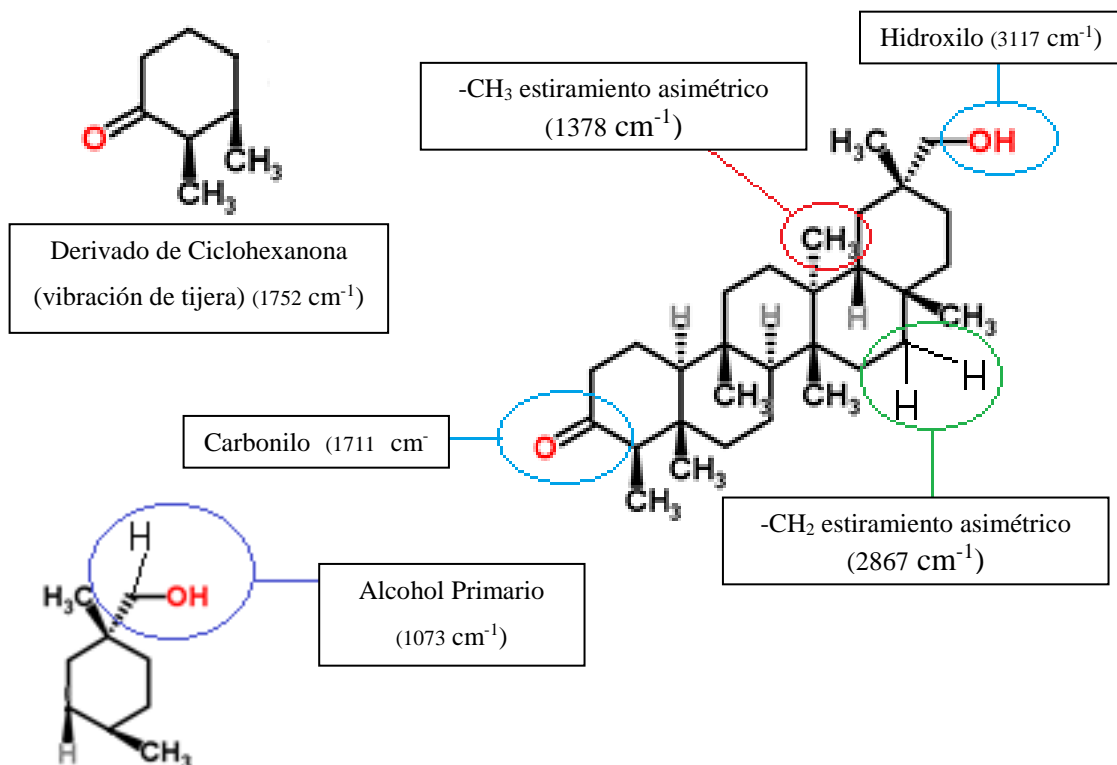


Figura 50 Molécula de 29-hidroxifriedelan con grupos identificados en la espectroscopia FT-IR

La fracción C2 en los ensayos de colorimetría demostró la presencia de moléculas de la familia de saponinas triterpenoides o triterpenos, también se observaron señales características en los espectros UV-Vis y FT-IR, relacionadas con la molécula de pristimerina, posteriormente la fracción C2 se analizó en el equipo de HPLC-DAD en donde se hizo un barrido en el espectro UV-Vis y se utilizó una fase de 85:15 acetonitrilo y agua al 5% de ácido acético a un flujo de 1 mL/min, un volumen de inyección de 2  $\mu\text{L}$ , el equipo se calibró a diferentes longitudes de onda, las cuales fueron 200 nm, 300 nm 400 nm, 430 nm, 500 nm y 600 nm, la muestra se preparó a una concentración de 1.8 mg/mL.

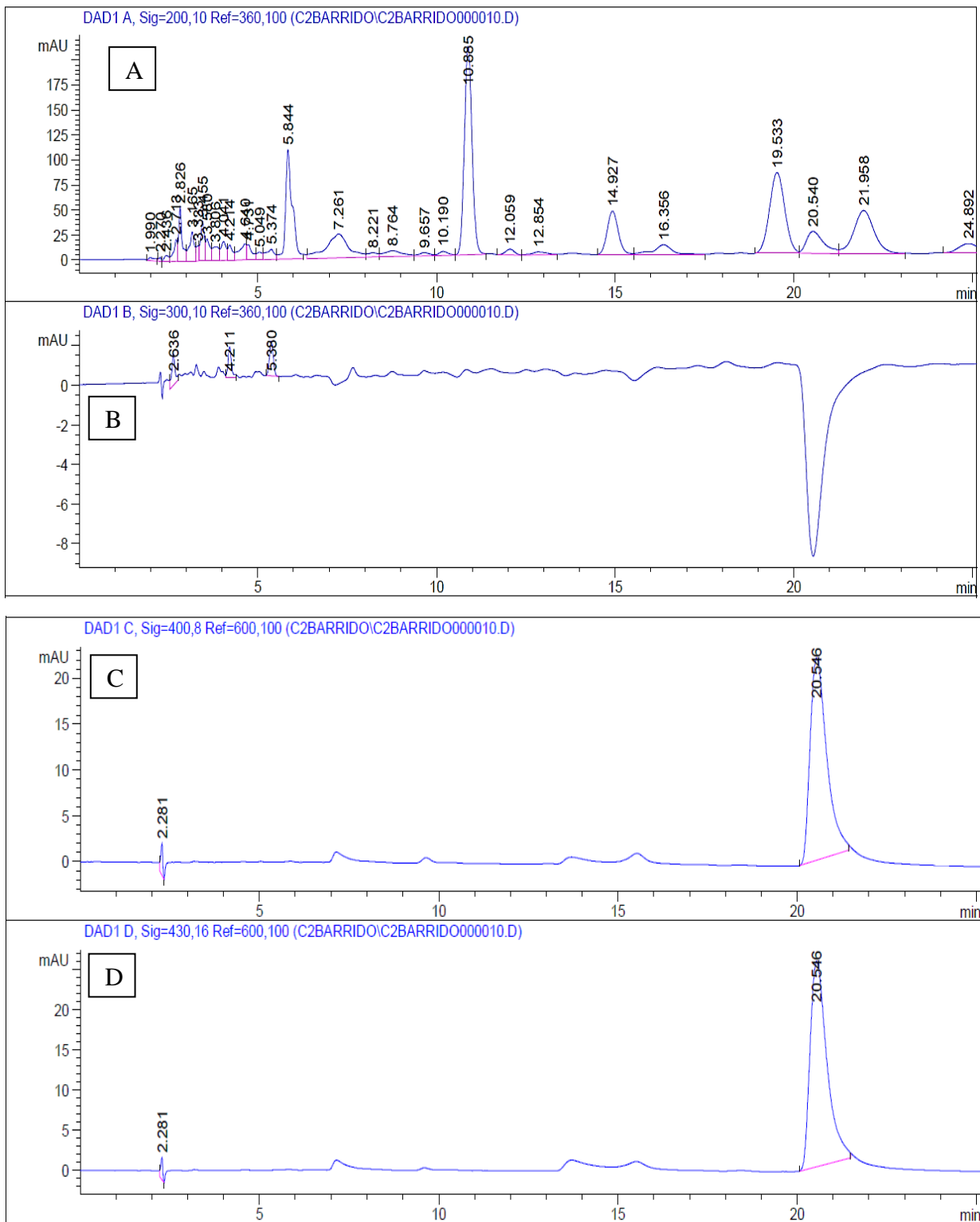


Figura 51 Cromatograma de la fracción C2 mediante HPLC-DAD a diferentes longitudes

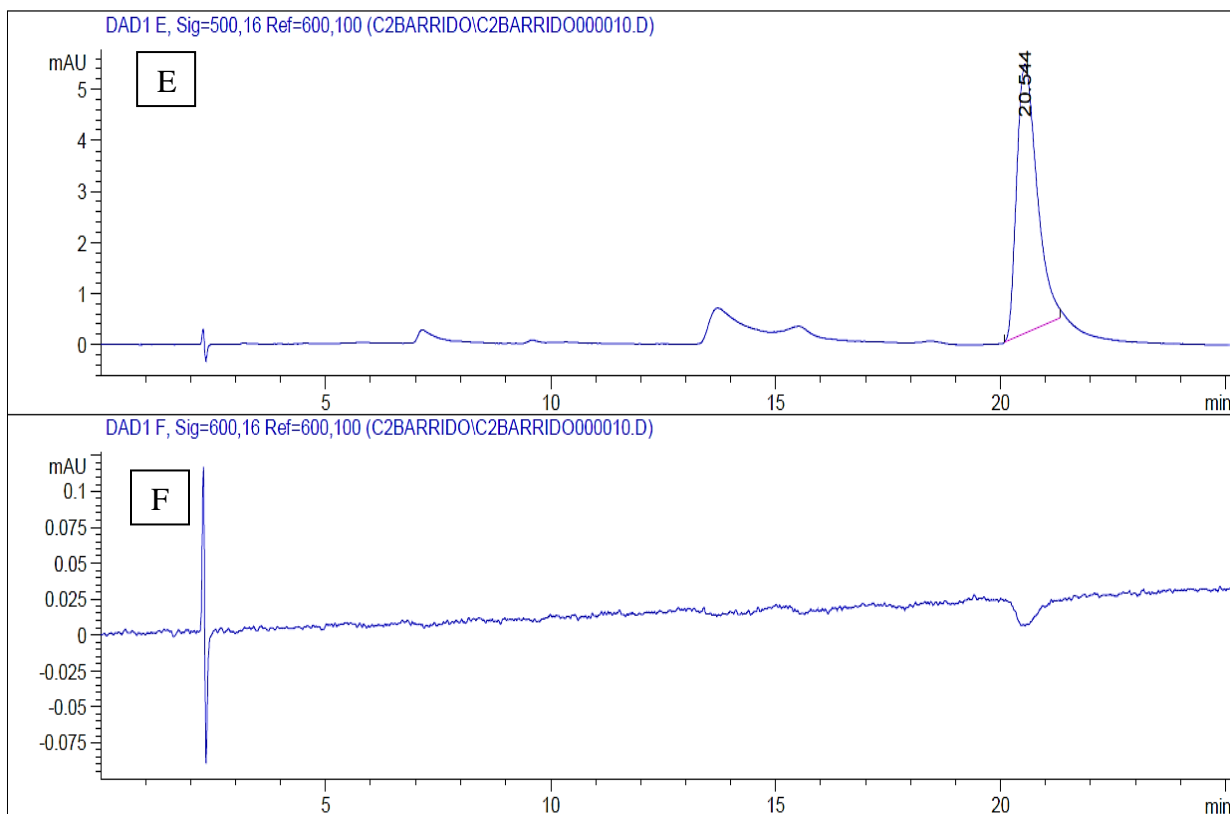


Figura 51.1 Cromatograma de la fracción C2 mediante HPLC-DAD a diferentes longitudes de onda

En la figura 51 se muestran los cromatogramas de la fracción C2 a diferentes longitudes de onda, de las cuales las longitudes de 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, y 600 nm, son para abarcar el espectro UV-Vis y la longitud de onda de 430 nm se utilizó para identificar la molécula de pristimerina (Macedo, Pereira, Castro, Boldrin, & Furlan, 2010). En el cromatograma de 200 nm (A) y 300 nm (B) se puede apreciar una gran variedad de señales a diferentes tiempos de retención, en los cromatogramas de 400 nm (C), 430 nm (D) y 500 nm (E) se observó una señal intensa con un tiempo de retención de 20.54 minutos y en los cromatogramas de 400 nm (C) y 430 nm (D) una señal débil con un tiempo de retención en 2.28 minutos, en el cromatograma a 600 nm (F) no se observa alguna señal.

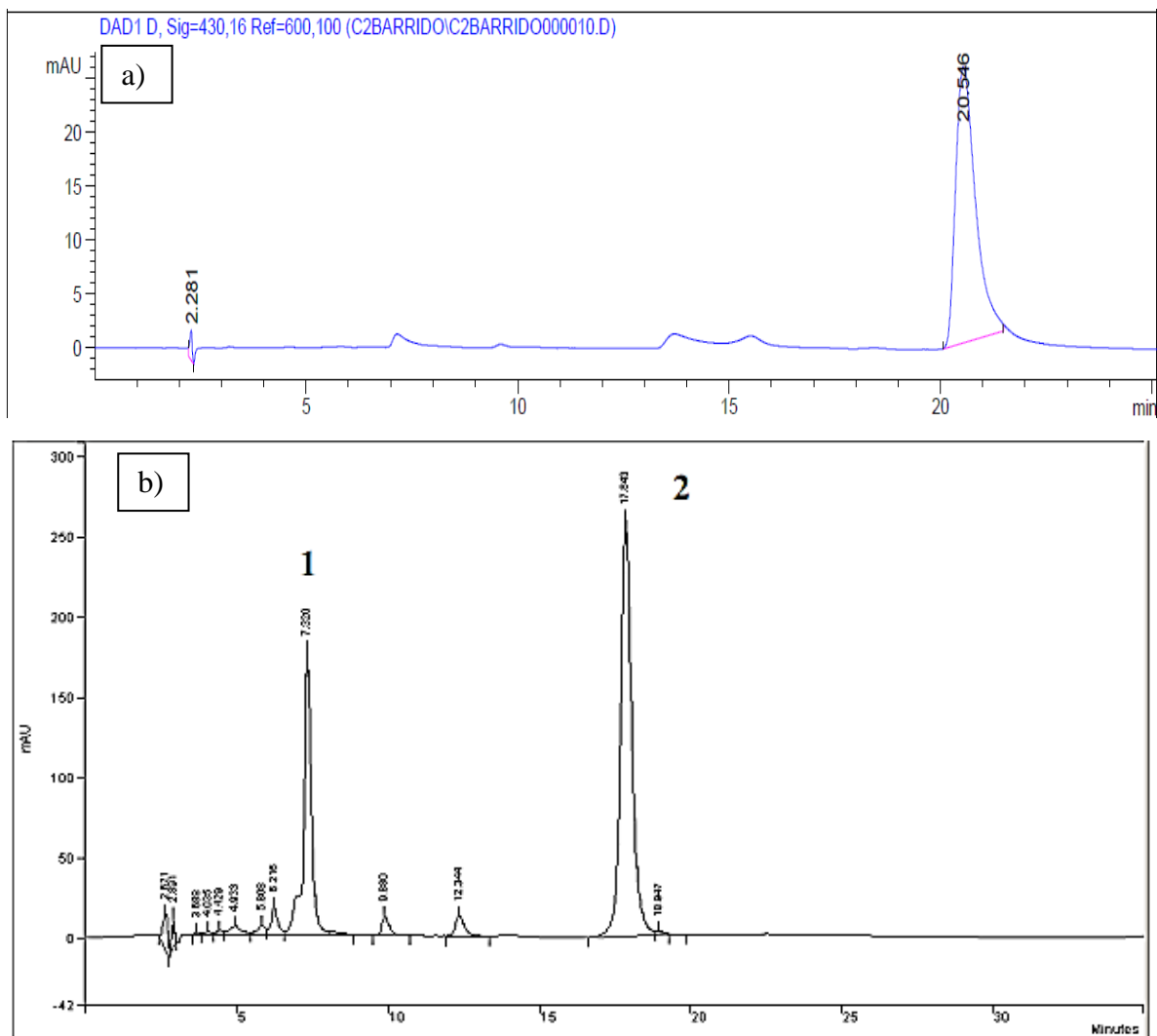


Figura 52. Cromatografías de la fracción C2 y de pristimerina

En la figura 52, el cromatograma a) corresponde a la fracción C2, a una longitud de onda de 430 nm donde se observa una señal a un tiempo de retención de 20.54 minutos, el cromatograma b) corresponde a una evaluación en HPLC-DAD de un extracto obtenido de la raíz de *Maytenus ilicifolia* (Macedo, Pereira, Castro, Boldrin, & Furlan, 2010) bajo las mismas condiciones de operación empleadas para el análisis de la fracción C2 de cancerina, estas son: fase móvil de 85:15 acetonitrilo, agua al 5% de ácido acético y un flujo de 1 mL/min, donde se identificaron dos picos, el pico 1 pertenece a un triterpeno llamado maytenina con un tiempo de retención de 7.32 minutos, el pico 2 pertenece a pristimerina con un tiempo de retención de 17.8 minutos, en donde, el desplazamiento de los picos se

puede deber al carácter químico de las muestras, debido a estos resultados, se puede decir que el pico presente en la cromatografía a) con tiempo de retención de 20.54 minutos probablemente corresponde a la molécula pristimerina

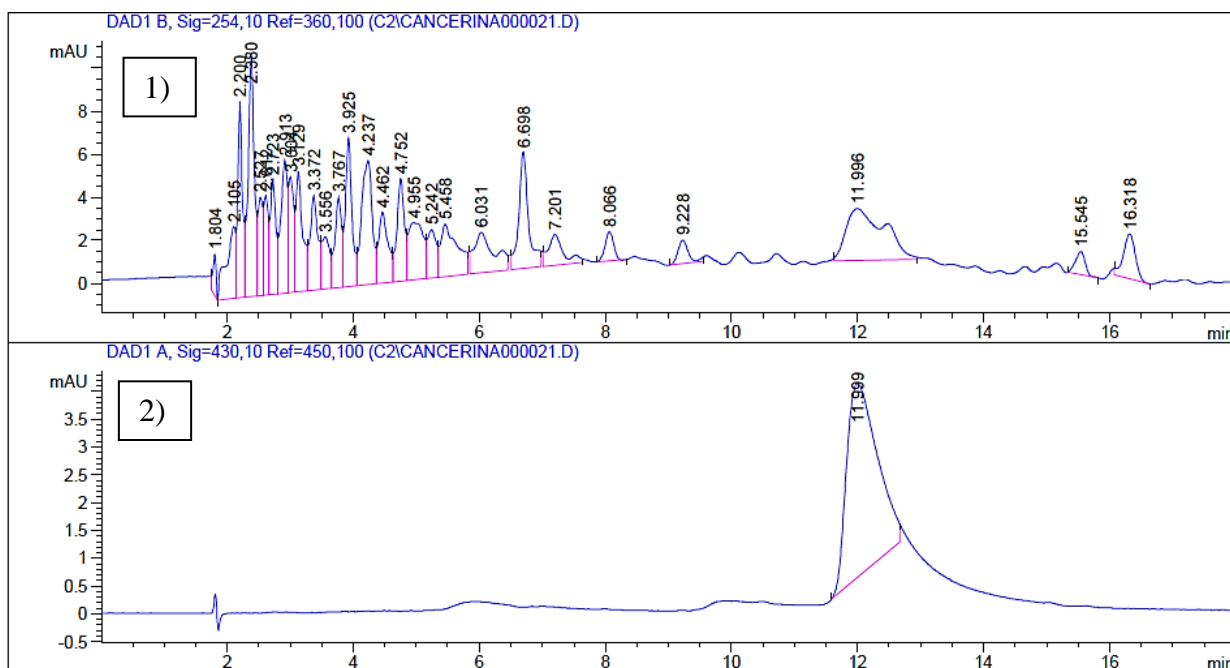


Figura 53 Cromatografía de la fracción C2 en HPLC-DAD

La fracción C2 se siguió trabajando (figura 53), se analizó la señal a 20.54 min en el equipo de HPLC-DAD con un volumen de inyección de 2  $\mu$ L, en donde se utilizaron las señales UV-Vis en 254 nm y 430 nm, las cuales se utilizan para la identificación de la molécula pristimerina, también se empleó una rampa para modificar la fase móvil, en la tabla 25 se muestra la proporción de la fase móvil entre acetonitrilo y agua al 5% de ácido acético. La muestra se preparó a una concentración de 1.8 mg/mL.

Tabla 26 Rampa para modificar la fase móvil en la cromatografía de C2.

Tiempo (min)	Agua al 5% de ácido acético	Acetonitrilo	Flujo (mL/min)
0	15	85	0.5
8	10	90	0.5
11	3	97	0.5

Como se observa en el cromatograma 1) a los 11.99 minutos se aprecian dos picos que empatan en tiempo de retención con la señal de 11.99 minutos en el cromatograma 2), que tiene una base ancha, el ensanchamiento de este pico se puede deber a la presencia de dos moléculas cuya química es similar, estas moléculas pueden ser pristimerina y su derivado dzununcanona de acuerdo con la bibliografía (Gonzalo, Amilcar, Padilla, Toscano, & Quijano, 2005).



## 5. CONCLUSIONES.

La evaluación citotóxica de los extractos acuoso, etanólico y en éter de petróleo de cancerina, muicle y tejocote en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 permitió observar que sólo el extracto en éter de petróleo de cancerina presenta actividad citotóxica, tomando como criterio las recomendaciones del NCI.

En el análisis fitoquímico de los metabolitos secundarios presentes en el extracto en éter de petróleo de cancerina, se detectó la presencia ácidos grasos, saponinas, triterpenos y esteroides.

Haciendo uso de la técnica de cromatografía en capa fina se encontró que para el extracto en éter de petróleo de cancerina, la fase móvil que presentó una mejor resolución fue la de cloroformo, ácido acético y éter de petróleo a una relación 5.75:1:3.25; haciendo uso de ésta fase móvil, se llevó a cabo su fraccionamiento con el equipo de cromatografía preparativa, en donde se obtuvieron cinco fracciones, las cuales fueron probadas en línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, la fracción C2 presentó actividad citotóxica con valores de  $DE_{50}$  de 13.89  $\mu\text{g/mL}$  para 24 horas y 19.08  $\mu\text{g/mL}$  a 72 horas de tratamiento.

Se analizó la fracción C2 mediante ensayos de colorimetría, dando positivo para triterpenos (reacción de Lieberman Buchard), saponinas triterpenoides (sapogeninas ácidas, reacción de Rosenthaler).

Al aplicar la técnica espectroscópica UV-Vis a la fracción C2 se observaron tres señales a 250 nm, 298 nm y 430 nm, dos de las cuales, son características del espectro de pristimerina (255 nm y 425 nm), saponina triterpenoide que se ha identificado en cancerina y que presenta actividad anticáncer.

En la técnica espectrofotométrica FT-IR de la fracción C2 se identificaron señales características de la molécula de pristimerina, las cuales son: 3117  $\text{cm}^{-1}$  (3370  $\text{cm}^{-1}$  hidroxilo), 1711  $\text{cm}^{-1}$  (1735  $\text{cm}^{-1}$  éster carbonilo) y 1605  $\text{cm}^{-1}$  (carbonilo conjugado del sistema de quinona metileno) y otros triterpenoides previamente identificados en cancerina.

En la técnica cromatográfica HPLC-DAD se obtuvo una señal a 430 nm con un tiempo de retención de 20.54 minutos, que fue relacionado con la molécula pristimerina y su derivado dzununcanona.

El efecto citotóxico presente en los extractos de cancerina en éter de petróleo y en la fracción C2 se le puede atribuir, entre otras moléculas, al triterpeno pristimerina y su derivado dzununcanona. La fracción obtenida es candidata para la obtención futura de metabolitos con actividad antineoplásica.

## 6. REFERENCIAS.

- ACS. (2016). *American Cancer Society*. Recuperado el 2017 de enero de 16, de Breast Cancer: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>
- Alvarado, K. G. (Mayo de 2015). Caracterización química de los flavonoides presentes en *Ficus Citrifolia* Mill. Quito, Ecuador.
- Antman, K., Ayash, L., Elías, A., Wheeler, C., Hunt, M., Eder, J., . . . Frei, E. (1992). A Phase II Study of High-Dose Cyclophosphamide, Thiotepa, and Carboplatin With Autologous Marrow Support in Women With Measurable Advanced Breast Cancer Responding to Standard-Dose Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 10(1), 10-110.
- Avila, E. V., Serna, A. E., Aguilar, F. A., & Lezama, R. V. (2009). Cytotoxic Activity of Four Mexican Medicinal Plants. *Proc.West. Pharmacol.*, 78-82.
- Basmadjian, C., Zhao, Q., Bentouhami, B., Djehal, A., Nebigil, C. G., Johnson, R. A., . . . Désaubry, L. G. (2014). Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in Chemistry*.
- Bassiouni, Y., & Faddah, L. (2012). Nanocarrier-Based Drugs: The Future Promise for Treatment of Breast Cancer. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(05), 225-232.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Elsevier*, 839-851.
- BreastCancer. (23 de junio de 2015). *BreastCancer.org*. Recuperado el 2017 de enero de 29, de Medicamentos de quimioterapia: <http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/quimioterapia/medicamentos>
- Buchanan, B. B., Grusissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (Segunda ed.). Wiley.
- Buhaescu, I., & Izzedine, H. (2007). Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. *Elsevier*, 575–584.
- Carmichael, J., Possinger, K., Phillip, P., Beykirch, M., Kerr, H., Walling, J., & Harris, A. L. (1995). Advanced Breast Cancer: A Phase II Trial With Gemcitabine. *American Society of Clinical Oncology*, 2731-2736.
- Castro, A. A., Domínguez, F., Morales, J. Z., & Álvarez, C. C. (2015). Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *Journal of Ethnopharmacology*, 335-354.
- Cell Biolabs INC. (2016). Obtenido de MDA-MB-231/GFP Cell Line: <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mda-231-cell-line.pdf>

- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *National Institute of Health*, 32(1-2), 35-48.
- CONABIO. (1995). *CONABIO*. Recuperado el 7 de febrero de 2017, de *Crategus pubescens*: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/59-rosac1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/59-rosac1m.pdf)
- CONABIO. (1998). *CONABIO*. Recuperado el 7 de Febrero de 2017, de *Hippocratea uniflora*: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6033649.pdf>
- Cooper, R., & Nicola, G. (2015). *Natural Products Chemistry. Sources, separations and structures*. (Primera ed.). CRC Press.
- Corona, M. L. (2013). Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilios phipps*. *Tesis para obtener el Título de Químico farmacéutico biólogo*. Santiago de Querétaro, Querétaro, México.
- Correã, G. M., & Alcântara, A. F. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(1), 220-238.
- Cortes, J., O'Shaughnessy, J., Loesch, D., Blum, J. L., Vahdat, L. T., Petrakova, K., . . . Twelves, C. (2011). Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *The Lancet*.
- Cruz, N. G. (Mayo de 2015). Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante in vitro de extractos polares de *Justicia spicigera* y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios. *Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos*. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- de Costa, S. M., Montenegro, M. A., Arregui, T., de Pinto, M. S., Nazareno, M. A., & de Mishima, B. L. (2003). Caracterización de acelga fresca de Santiago del Estero (Argentina). Comparación del contenido de nutrientes en hoja y tallo. Evaluación de los carotenoides presentes. *Ciênc. Technol.*, 33-37.
- de la Vega, H. A., García, É. R., González, D. M., Figueroa, J. B., León, J. L., Martínez, H. M., & Valero, V. (2014). Biomarcadores del cáncer de mama vs firmas genómicas: hacia la búsqueda de una terapia personalizada. *Revista Mexicana de Mastología*, 4(1), 9-17.
- de Sousa, G. F., Wlodarczky, S. R., & Monteiro, G. (2014). Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4).

- de Ugaz, O. S. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Debnath, J., Muthuswamy, S. K., & Brugge, J. S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grow in three-dimensional basement membrane cultures. *Academic Press*, 256-268.
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., . . . Bhat, H. K. (2008). Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *National Institutes of Health*, 581-591.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach* (Tercera ed.). Wiley.
- DOF. (9 de junio de 2011). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado el 17 de enero de 2017, de Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php)
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *National Institutes of Health*, 495-516.
- Esteva, J. F., Valero, V., Booser, D., Guerra, L. T., Murray, J. L., Pusztai, L., . . . Hortobagyi, G. N. (2002). Phase II Study of Weekly Docetaxel and Trastuzumab for Patients With HER-2–Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1800-1808.
- Fernandez, M. V., Morales, J. B., & Angeles, G. (1998). ESTUDIO ANATOMICO DE HIPPOCRATEA EXCELSA HBK. (HIPPOCRATEACEAE). *Acta Botánica Mexicana*, 7-21.
- Flores, A. C., Villela, G. M., Cervantes, J. C., Camacho, G. V., Orozco, C. F., & Ojeda, A. G. (2008). Tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado. Comparación de dos esquemas a base de docetaxel-epirrubicina versus 5-fluoracilo epirrubicina-ciclofosfamida. *Cirugía y Cirujanos*, 23-28.
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Elsevier Inc.*
- García, J. S., Pérez, M. L., Gonzalez, J. G., Noyde, B. A., Soto, M. L., Menéndez, M. R., . . . Viamontes, N. M. (2009). Cyclophosphamide and Methotrexate as a Metronome chemotherapy used in patients with progressing metastatic breast cancer. *Revista Cubana de Medicina*, 48(2).
- Gary, C. D. (2009). *Química Analítica* (Sexta ed.). Mc Graw Hill.

- Gautam , M. K., Xiangshan, Z., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes. *Cancer Biology & Therapy.*, 955-960.
- Gonzalo, J. R., Amilcar, R. G., Padilla, N. M., Toscano, A., & Quijano, L. (2005). Triterpenoids from *Hippocratea excelsa*. The crystal structure of 29-hydroxytaracerol. *Z. Naturforsch.*, 577-584.
- Hande, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica*, 173-184.
- Hassan, M., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *ONCOLOGY REPORTS*, 24, 1121-1131.
- Hernandez, J. V. (Abril de 2013). *Cuantificación de sesquiterpenlactonas provenientes de la hoja de Calea Urticifolia (Juanislama) recolectadas en el periodo de enero a junio de 2012*. San Alvdador, El Salvador.
- Herrera, N. J., Herrera, F. J., Dehesa, Z. A., Cetto, A. A., Heinrich, M., & Plasencia, C. P. (2016). Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 391–402.
- Hinojosa, W. E., Quiróz, A. M., Álvarez, I. R., Castañeda, P. E., Villarreal, M., & Taketa, A. C. (2014). Anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of methanolic extracts of five different populations of *Hippocratea celastroides* collected in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1156–1163.
- IMSS. (2015). *Cáncer de Mama*. Recuperado el 17 de enero de 2017, de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>
- INEGI. (2016). “*ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (18 DE OCTUBRE)*”. Aguascalientes: INEGI.
- Invitrogen. (2015). *Cell Culture Basics*. (L. Technologies., Ed.) Gibco. Recuperado el 22 de enero de 2017, de [CellCultureBasics: http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf](http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf)
- Jin, W., Wu, L., Liang, K., Liu, B., Lu, Y., & Fan, Z. (2003). Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 185-191.
- Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular*. México: Mc Graw Hill Education.
- Khalid, S. A., Friedrichsen, G. M., Christensen, S. B., El Tahir, A., & Satti, G. M. (2007). Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (lam.) Exell. *ResearchGate*, 129-134.

- Klauber, N., Paragi, S., Flynn, E., Hamel, E., & D'Amato, R. J. (1997). Inhibition of Angiogenesis and Breast Cancer in Mice by the Microtubule Inhibitors 2-Methoxyestradiol and Taxol. *CANCER RESEARCH*, 81-86.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, j., Alnemri, E., Baehrecke, E., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 3-11.
- Kumar, D., Arya, V., Bhat, V. A., Ahmad, N., & Prasad, D. N. (2012). The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(5), 1187-1200.
- Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 107(7).
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, B. A., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7).
- Li, H., Wang, Y. R., & Jiang, Z. (2012). Pristimerin Inhibits Breast Cancer Cell Migration by Up-regulating Regulator of G Protein Signaling 4 Expression. *Asian Pacific journal of cancer prevention*.
- Liberman, A. C., Druker, J., Refojo, D., & Arzt, E. (2008). Mecanismos Moleculares de Acción de algunas Drogas Inmunosupresoras. *Medicina*, 68, 455-464.
- Macedo, V. d., Pereira, D. d., Castro, I. C., Boldrin, M. Z., & Furlan, M. (2010). Evaluation of Antioxidant Capacity and Synergistic Associations of Quinonemethide Triterpenes and Phenolic Substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, 6956-6973.
- McMaster, M. C. (2005). *LC/MS a Practical user's guide*. United States of America: Wiley-Interscience.
- Menendez, J. A., Colomer, R., & Lapu, R. (2004). Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine®)-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells. *ONCOLOGY REPORTS*, 411-422.
- Miele, E., Spinelli, G., Miele, E., Tomao, F., & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 99–105.
- Misset, J.-L., di Palma, M., Delgado, M., Plagne, R., Chollet, P., Fumoleau, P., . . . Mathé, G. (1996). Adjuvant Treatment of Node-Positive Breast Cancer With Cyclophosphamide, Doxorubicin, Fluorouracil, and Vincristine Versus Cyclophosphamide, Methotrexate and Fluorouracil: Final Report After a 16-Year Median Follow-Up Duration. *American Society of Clinical Oncology*, 1136-1145.

- MJH. (2016). *Medicine Johns Hopkins*. Recuperado el 17 de enero de 2017, de Breast Center:  
[http://www.hopkinsmedicine.org/breast\\_center/breast\\_cancers\\_other\\_conditions/invasive\\_ductal\\_carcinoma.html](http://www.hopkinsmedicine.org/breast_center/breast_cancers_other_conditions/invasive_ductal_carcinoma.html)
- Muñiz, E. E., Palomo, G. G., & Vega, L. (2012). Natural products: New anticancer agents derived from plants. *Current Topics in Toxicology*, 8.
- NCI. (11 de Julio de 2016). *National Cancer Institute*. Recuperado el 16 de enero de 2017, de Metastatic Cancer: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>
- Newmann, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.
- Osborne, K. C., & Schiff, R. (2013). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *National Institutes of Health*, 233-247.
- Osborne, K. C., Hobbs, K., & Trent, J. M. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111-128.
- O'Shaughnessy, J., Miles, D., Vukelja, S., Moiseyenko, V., Ayoub, J.-P., Cervantes, G., . . . Leonard, R. (2002). Superior Survival With Capecitabine Plus Docetaxel Combination Therapy in Anthracycline-Pretreated Patients With Advanced Breast Cancer: Phase III Trial Results. *American Society of Clinical Oncology*, 20(12), 2812-2823.
- Ouyang, L., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B., & Bao, J. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45, 487-498.
- PAHO. (2014). *Organización Panamericana de la Salud*. Recuperado el 18 de enero de 2017, de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_co](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_co)
- Pérez, A. H., Bah, M., Alvarado, C. I., Cruz, J. R., Molina, J. R., Molina, A. R., & Luna, J. C. (2014). Aortic Relaxant Activity of *Crataegus gracilior* Phipps and Identification of Some of Its Chemical Constituents. *Molecules*, 19.
- Pothier, J. (2000). *Thin-Layer (Planar) Chromatography*. Recuperado el 14 de febrero de 2017, de NATURAL PRODUCTS:  
[https://www.thevespiary.org/library/Files\\_Uploaded\\_by\\_Users/Sedit/Chemical%20Analysis/Encyclopedia%20of%20Separation%20Science/Level%20III%20-%20Practical%20Applications/NATURAL%20PRODUCTS%20-%20Thin-Layer%20\(Planar\)%20Chromatography.pdf](https://www.thevespiary.org/library/Files_Uploaded_by_Users/Sedit/Chemical%20Analysis/Encyclopedia%20of%20Separation%20Science/Level%20III%20-%20Practical%20Applications/NATURAL%20PRODUCTS%20-%20Thin-Layer%20(Planar)%20Chromatography.pdf)
- Rejón, G. M., Espadas, A. P., Puc, R. M., Rivera, R. C., Bazzocchi, I. L., Diaz, J. I., & Quijano, L. (2007). Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, 70, 863-865.



- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*.
- Santos, K. G., Cordero, V. M., Rodríguez, A. H., Torres, E. G., Cabral, F. G., & Rodríguez, S. S. (2012). Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *iMedPub Journals*, 8(1:1).
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation*. Humana Press.
- Shahi, K., & Manga, P. P. (2007). Subtios clínicos y genéticos de cáncer de mama: individualización del tratamiento. *Anales de Medicina Interna*, 24(12), 569-570.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2000). *Principios de análisis instrumental*. Mc Graw Hill.
- Swathi, G., Srividya, A., Ajitha, A., & Rao, V. M. (2015). Review on: Flash Chromatography. *World Journal of Pharmacy and pharmaceutical sciences*, 281-296.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., . . . Noguchi, S. (2009). Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Cancer Therapy: Clinical*, 15(12).
- Thomas, E. S., Gomez, H., Li, R. K., Chung, H.-C., Fein, L. E., Chan, V. F., . . . Roché, H. H. (2007). Ixabepilone Plus Capecitabine for Metastatic Breast Cancer Progressing After Anthracycline and Taxane Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 25(33).
- Vargas , N. B., & de la Rosa, C. G. (2016). *Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos*. Ciudad de México: UAM.
- W. Stewart, B., & P. Wild, C. (2014). *World Cancer Report* . Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Wang, K.-W., Zhang, H., & Pan, Y.-J. (2007). Novel triterpenoids from *Microtropus triflora* with antitumor activities. *Helvetica Chimica Acta*, 90, 277-281.
- WHO. (2013). *World Health Organization*. Recuperado el 22 de noviembre de 2006, de Cancer: <http://www.who.int/topics/cancer/>
- WHO. (2016). *World Health Organization*. Recuperado el 15 de enero de 2017, de Cancer: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- WHO. (2016). *World Health Organization*. Recuperado el 17 de enero de 2017, de Cáncer de mama: prevención y control: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>