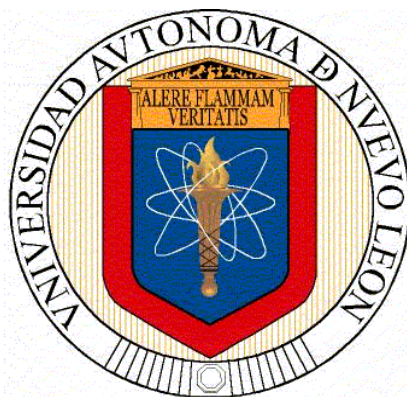


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.)  
Britton & Rose E *Ibervillea sonora* (Watson) CON ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA CONTRA EL LINFOMA  
MURINO L5178Y-R

POR  
QBP MARIO ÁNGEL SAMANIEGO ESCAMILLA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA  
DE PRODUCTOS NATURALES

JULIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose E  
*Ibervillea sonora* (Watson) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA EL LINFOMA  
MURINO L5178Y-R

Por

QBP MARIO ÁNGEL SAMANIEGO ESCAMILLA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación en Química  
de Productos Naturales

Julio, 2016

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose E  
*Ibervillea sonorae* (Watson) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA EL LINFOMA  
MURINO L5178Y-R

Comité de Tesis

---

Dr. Ramiro Quintanilla Licea  
Director

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Secretario

---

Dra. María Julia Verde Star  
Vocal

---

Dra. Azucena Oranday Cárdenas  
Vocal

---

Dra. Catalina Rivas Morales  
Vocal

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose E  
*Ibervillea sonorae* (Watson) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA EL LINFOMA  
MURINO L5178Y-R

Dirección de Tesis

---

Dr. Ramiro Quintanilla Licea  
Director

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Co-Director

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas  
más importantes de mi vida: mis padres,  
familiares y amigos.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su confianza e incondicional apoyo durante toda mi vida.

Al Dr. Ramiro Quintanilla Licea y al Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores por su asesoría para la realización de la presente investigación.

A la Dras. María Julia Verde Star, Azucena Oranday Cárdenas y Catalina Rivas Morales por sus enseñanzas para mi formación en el área de Química de Productos Naturales.

Al Dr. Sergio Galindo Rodríguez por su apoyo para la realización de los espectros de IR-ATR, y al M.C. Sergio García González por sus importantes observaciones.

A los compañeros del Laboratorio de Fitoquímica: Dr. Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez, QBP Isvar Kavim Ángeles Hernández y Dr. Rolando Morado Castillo por sus valiosos consejos, así como a los colegas del Laboratorio de Inmunología y Virología: M.C. Humberto Carlos Hernández Martínez y QBP Enriqueta Monreal Cuevas por su asesoría en la elaboración de las pruebas biológicas.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo a los proyectos PAICYT CN-422-10 y CN-662-11 otorgados al Dr. Ramiro Quintanilla Licea

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a un servidor (No. de CVU: 419801) para la realización de este doctorado.

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS .....	V
NOMENCLATURA .....	XI
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT .....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	4
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 CÁNCER.....	5
4.2 EL ROL DE LAS PLANTAS EN LA MEDICINA MODERNA .....	7
4.3 PLANTAS SELECCIONADAS PARA ESTE ESTUDIO .....	16
4.3.1 <i>Pachycereus marginatus</i> .....	16
4.3.2 <i>Ibervillea sonorae</i> .....	17
4.4 LINFOMA L5178Y-R. ....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
5.1 COLECTA Y EXTRACCIÓN DE PLANTAS EN ESTUDIO. ....	21
5.1.1 Colecta e identificación del material vegetal.....	21
5.1.2 Preparación del material vegetal.....	21
5.1.3 Extracción Soxhlet.....	22
5.1.4 Extracción líquido-líquido.....	23
5.2 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA SOBRE EL LINFOMA L5178Y-R .....	24
5.2.1 Cromatografía en columna de Sílica gel.....	24
5.2.2 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20.....	26
5.2.3 Cromatografía en capa fina (CCF) .....	27
5.2.4 Cristalización.....	29
5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA .....	30
5.3.1 Preparación de Tratamientos .....	30

5.3.2 Linfoma L5178Y-R .....	30
5.3.3 Método de viabilidad celular y evaluación de la actividad citotóxica .....	31
5.4 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO .....	32
5.4.1 Espectroscopía de Infrarrojo.....	32
5.4.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	33
5.4.3 Experimento COSY (Correlation Spectroscopy).....	35
5.4.4 Experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy).....	36
5.5 DETERMINACIÓN DE PUNTO DE FUSIÓN.....	37
6. RESULTADOS .....	38
6.1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS E IDENTIFICACIÓN.....	38
6.2 <i>PACHYCEREUS MARGINATUS</i> .....	38
6.2.1 Extracción consecutiva de <i>Pachycereus marginatus</i> .....	38
6.2.1.1 Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>P. marginatus</i> .....	39
6.2.1.1.1 Columnas 1-10 del extracto hexánico .....	39
6.2.1.1.2 Cristalización de la FSC2 (de columnas 1-10).....	43
6.2.1.1.3 Columna 11. Fraccionamiento de las aguas madres de la FSC2.....	43
6.2.1.1.4 Cristalización de la FSC4 (de columnas 1-10).....	44
6.2.1.1.5 Columna 12. Fraccionamiento de las aguas madres de la FSC4.....	46
6.2.1.1.6 Columna 13. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 12 y aislamiento del compuesto Pm-C2. ....	47
6.2.1.1.7 Columna 14. Fraccionamiento cromatográfico de la FSC5 (de columnas 1-10). ....	49
6.2.1.1.8 Columna 15. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 14 y aislamiento del compuesto Pm-C3. ....	51
6.2.1.1.9 Columna 16. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la columna 14. ....	53
6.2.1.1.10 Columna 17. Fraccionamiento de la FC2 de la columna 16 y aislamiento del compuesto Pm-C4.....	55
6.2.1.1.11 Columna 18. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 16 y aislamiento del compuesto Pm-C5. ....	56
6.2.1.1.12 Columna 19. Primer fraccionamiento cromatográfico de la FSC6 (de columnas 1-10) .....	58
6.2.1.1.13 Columna 20. Fraccionamiento conjunto de la FC2 y FC3 de la columna 19.....	59
6.2.1.1.14 Columna 21. Segundo fraccionamiento cromatográfico de la FSC6 (de columnas 1- 10).....	61
6.2.1.1.15 Columna 22. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 21 .....	62
6.2.1.16 Columna 23. Fraccionamiento cromatográfico de la FC1 de la columna 22 y aislamiento del compuesto Pm-C6. ....	63
6.2.1.2 Fraccionamiento del extracto clorofórmico.....	65



6.2.1.2.1 Columnas 24-31. Fraccionamiento cromatográfico del extracto clorofórmico.....	65
6.2.1.3 Extracto metanólico .....	68
6.2.2 Extracción no consecutiva de <i>Pachycereus marginatus</i> .....	68
6.3 <i>IBERVILLEA SONORAE</i> .....	71
6.3.1 Extracción consecutiva de <i>Ibervillea sonorae</i> .....	71
6.3.2 Extracción no consecutiva de <i>Ibervillea sonorae</i> .....	72
6.3.2.1 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de EtOAc .....	74
6.3.2.1.1 Columna 32.....	74
6.3.2.1.2 Columna 33. Fraccionamiento de la FC3 de la columna 32 y aislamiento del compuesto Is-C1 .....	75
6.3.2.1.3 Columna 34. Fraccionamiento de la FC4 de la columna 32 y aislamiento del compuesto Is-C2 .....	77
6.4 RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS .....	80
6.4.1 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO PM-C1.....	80
6.4.1.1 Análisis de IR-ATR.....	80
6.4.1.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	81
6.4.2 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO PM-C2.....	84
6.4.2.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	85
6.4.2.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	88
6.4.3 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO PM-C3.....	94
6.4.3.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	94
6.4.3.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	96
6.4.4 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO PM-C4.....	100
6.4.4.1 Análisis de IR-ATR.....	100
6.4.4.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	101
6.4.4.3 Análisis espectroscópico del compuesto Pm-C5 .....	103
6.4.4.4 Análisis del espectro de IR/ATR .....	103
6.4.4.5 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	104
6.4.4.6 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	107
6.4.5 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO PM-C6.....	110
6.4.5.1 Análisis de IR/ATR .....	110
6.4.5.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	114
6.4.6 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO IS-C1 .....	119
6.4.6.1 Análisis de IR-ATR.....	119
6.4.6.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	120
6.4.6.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	121
6.4.7 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO IS-C2 .....	126

6.4.7.1 Análisis de IR-ATR.....	126
6.4.7.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H.....	127
6.4.7.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.....	128
6.4.7.4 Análisis de HSQC de Is-C2.....	131
7. DISCUSIÓN .....	135
8. CONCLUSIONES .....	141
9. PERSPECTIVAS .....	143
10. LITERATURA CITADA.....	144
11. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	157

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Pachycereus marginatus</i> .....	21
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Ibervillea sonora</i> .....	21
Tabla 3. Rendimientos de las FC de las columnas 1-10.....	42
Tabla 4. Rendimientos de las FC de la columna 11.....	44
Tabla 5. Rendimientos de las FC de la columna 12.....	46
Tabla 6. Rendimientos de las FC de la columna 13.....	48
Tabla 7. Rendimientos de las FC de la columna 14.....	50
Tabla 8. Rendimientos de las FC de la columna 15.....	52
Tabla 9. Rendimientos de las FC de la columna 16.....	54
Tabla 10. Rendimientos de las FC de la columna 17.....	55
Tabla 11. Rendimientos de las FC de la columna 18.....	57
Tabla 12. Rendimientos de las FC de la columna 19.....	58
Tabla 13. Rendimientos de las FC de la columna 20.....	60
Tabla 14. Rendimientos de las FC de la columna 21.....	61
Tabla 15. Rendimientos de las FC de la columna 22.....	62
Tabla 16. Rendimientos de las FC de la columna 23.....	64
Tabla 17. Rendimientos de las FSC de las columnas 24-31.....	67
Tabla 18. Rendimientos de las fracciones de la columna 32.....	75
Tabla 19. Rendimientos de las fracciones de la columna 33.....	76
Tabla 20. Rendimientos de las fracciones de la columna 34.....	78
Tabla 21. Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup> H del compuesto <b>Pm-C1</b> .....	82
Tabla 22. Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup> H del compuesto <b>Pm-C2</b> .....	86
Tabla 23. Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto <b>Pm-C2</b> .....	88
Tabla 24. Resumen de señales de <sup>13</sup> C y DEPT-135 de <b>Pm-C2</b> .....	90
Tabla 25. Resumen de señales de los espectros de <sup>13</sup> C-RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC del compuesto <b>Pm-C2</b> .....	93
Tabla 26. Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup> H del compuesto <b>Pm-C3</b> .....	95

Tabla 27. Comparación de señales de los espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 entre <b>Pm-C2</b> y <b>Pm-C3</b> .....	97
Tabla 28. Resumen de señales de los espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135 y HSQC del compuesto <b>Pm-C3</b> .....	99
Tabla 29. Resumen de señales de $^{13}\text{C}$ -RMN de <b>Pm-C4</b> .....	103
Tabla 30. Resumen de señales del espectro de $^1\text{H}$ del compuesto <b>Pm-C5</b> .....	105
Tabla 31. Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto <b>Pm-C5</b> .....	106
Tabla 32. Resumen de señales de los espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN y HSQC del compuesto <b>Pm-C5</b> .....	109
Tabla 33. Resumen de señales del espectro de $^1\text{H}$ del compuesto <b>Pm-C6</b> .....	113
Tabla 34. Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto <b>Pm-C6</b> .....	114
Tabla 35. Resumen de señales de $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135 y HSQC de <b>Pm-C6</b> .....	119
Tabla 36. Resumen de señales de $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 de <b>Is-C1</b> .....	124
Tabla 37. Comparación de las señales de $^{13}\text{C}$ -RMN de <b>Is-C1</b> con las del compuesto <b>3</b> descrito por Jacobs <i>et al.</i> .....	126
Tabla 38. Resumen de señales de $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 de <b>Is-C2</b> .....	131
Tabla 39. Resumen de acoplamientos entre las señales de carbonos e hidrógenos del compuesto <b>Is-C2</b> .....	134

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de productos naturales utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos: morfina (1), artemisinina (2), silimarina (3) y capsaicina (4).....	8
Figura 2. Principales ejemplos de especies vegetales fuente de agentes anticancerígenos. ....	9
Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos Paclitaxel (5) y Docetaxel (6), productos naturales anticancerígenos aislados de plantas del género <i>Taxus</i> . ....	10
Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos Vincristina (7), Vinblastina (8), Vindesina (9), Vinorelbina (10) y Vinflunina (11) sustancias derivadas de <i>Catharanthus roseus</i> y actualmente utilizadas en la terapia anticancerígena. ....	11
Figura 5. Topotecán (9) e Irinotecán (10), dos análogos del alcaloide camptotecina, aislada de <i>Camptotheca acuminata</i> .....	12
Figura 6. Estructuras químicas de los compuestos Etopósido (14) y Tenipósido (15), derivados anticancerígenos de la Podofilotoxina, aislada de la planta <i>Podophyllum peltatum</i> . ....	13
Figura 7. Estructura química de la Colchicina (16), producto natural anticancerígeno aislado de la planta <i>Colchicum autumnale</i> .....	14
Figura 8. Estructuras químicas de sustancias actualmente bajo investigación para tratamiento contra el cáncer: Flavopiridol (17), Homoharringtonina (18), $\beta$ -lapachona (19), Combretastatina A4 (20). ....	15
Figura 9. Estructuras químicas de sustancias aisladas del cactus <i>Pachycereus marginatus</i> : Pilocereína (21) y dos alcaloides isoquinolínicos (22, 23). Cabe señalar que (21) y (22) también se han aislado de <i>Lophocereus schottii</i> . ....	17
Figura 10. Estructura química de la Kinoína A (21), Kinoína B (22), Kinoína C (23) y Kinoína D (24), cucurbitacinas aisladas de <i>Ibervillea sonora</i> . ....	19
Figura 11. Células del linfoma murino L5178Y-R suspendidas en medio RPMI 1640. Vista con aumento “40x” .....	20
Figura 12. Extractor Soxhlet .....	23
Figura 13. Rotavapor “Büchi” R-3000 .....	23
Figura 14. Componentes de una columna cromatográfica de Sílica gel.....	25
Figura 15. Componentes de la columna cromatográfica de Sephadex .....	27
Figura 16. Desarrollo de una CCF dentro de una cuba cromatográfica. ....	28

Figura 17. Una misma cromatoplaca expuesta a diferentes técnicas de revelado: A la izquierda, con luz UV 254/365 nm; al centro, con vapores de yodo; a la derecha, con un rocío de cloruro de cobalto seguido de calentamiento.....	29
Figura 18. Espectro de IR-ATR. ....	33
Figura 19. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN. ....	34
Figura 20. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN. ....	35
Figura 21. Espectro de COSY. ....	36
Figura 23. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos crudos de <i>P. marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	39
Figura 24. CCF de las FC de las 10 columnas del extracto hexánico de <i>P. marginatus</i> . Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> al 100% (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	41
Figura 25. CCF de las FSC del extracto hexánico de <i>P. marginatus</i> . Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> al 100% (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	42
Figura 26. Porcentaje de citotoxicidad de las FSC del extracto hexánico de <i>Pachycereus marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).....	42
Figura 27. CCF de FC de la columna 11. Eluente: CHCl <sub>3</sub> 100% (10 mL). Revelador: Iodo sublimado.....	44
Figura 28. CCF del sólido Pm-C1 (aplicación izquierda) con sus aguas madres (aplicación derecha) Eluente: CHCl <sub>3</sub> 100% (10 mL). Revelador: Iodo sublimado .....	45
Figura 29. Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C1 de <i>Pachycereus marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	45
Figura 30. CCF de las FC de la columna 12. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9.8:0.8 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	46
Figura 31. CCF de las FC de la columna 13. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9.8:0.8 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	48
Figura 32. Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C2 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	49
Figura 33. CCF de las FC de la columna 14. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	50
Figura 34. Porcentaje de citotoxicidad de las FC de la columna 14 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres	

réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). .....	50
Figura 35. CCF de las FC de la columna 15. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	52
Figura 36. Porcentaje de citotoxicidad de Pm-C3 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	53
Figura 37. CCF comparativa entre Pm-C2 y Pm-C3. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	53
Figura 38. CCF de las FC de la columna 16. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	54
Figura 39. CCF de las FC de la columna 17. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> . ....	55
Figura 40. Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C4 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	56
Figura 41. CCF de las FC de la columna 18. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> . ....	57
Figura 42. Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C5 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	57
Figura 43. CCF de las FC de la columna 19. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	58
Figura 44. Porcentaje de citotoxicidad de las FC2-4 de la columna 19 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ....	59
Figura 45. CCF de las FC de la columna 19. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	60
Figura 46. CCF de las FC de la columna 21. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	61
Figura 47. CCF de las FC de la columna 22. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	63
Figura 48. CCF de las FC de la columna 23. Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: luz UV 254/ 366 nm .....	64

Figura 49. Porcentaje de citotoxicidad de Pm-C6 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). .....	65
Figura 50. CCF de las FC de las 8 columnas del extracto clorofórmico de <i>P. marginatus</i> . Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 6:4 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado. ....	66
Figura 51. CCF de las FSC del extracto clorofórmico de <i>P. marginatus</i> . Eluente empleado: CHCl <sub>3</sub> -EtOAc 6:4 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.....	67
Figura 52. Porcentaje de citotoxicidad de las FSC del extracto clorofórmico de <i>Pachycereus marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).....	67
Figura 53. Porcentaje de citotoxicidad del extracto metanólico crudo y sus particiones de <i>P. marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).....	70
Figura 54. Porcentaje de citotoxicidad de los precipitados derivados del extracto crudo no consecutivo y sus particiones de <i>P. marginatus</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). ..	70
Figura 55. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos crudos de <i>I. sonorae</i> así como el precipitado clorofórmico sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). .....	71
Figura 56. Porcentaje de citotoxicidad del extracto metanólico crudo y sus particiones de <i>I. sonorae</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).....	73
Figura 57. Porcentaje de citotoxicidad de los precipitados derivados de <i>I. sonorae</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). .....	73
Figura 58. CCF de las FC de la columna 32. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> .....	75
Figura 59. CCF de las fracciones de la columna 33. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> .....	76
Figura 60. Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Is-C1 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media + error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas,	



comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado). .....	77
Figura 61. CCF de las fracciones de la columna 34. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> .....	78
Figura 62. CCF de las fracciones de la columna 34. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador: CoCl <sub>2</sub> .....	78
Figura 63. Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C1.....	80
Figura 64. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN sin ampliar del compuesto Pm-C1 en CDCl <sub>3</sub> .....	81
Figura 65. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto Pm-C1 en CDCl <sub>3</sub> .....	82
Figura 66. Espectro de IR del compuesto Pm-C2. ....	84
Figura 67. Espectro de <sup>1</sup> H del compuesto Pm-C2 en CDCl <sub>3</sub> . ....	85
Figura 68. Espectro de COSY del compuesto Pm-C2 en CDCl <sub>3</sub> . ....	87
Figura 69. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto Pm-C2 en CDCl <sub>3</sub> . ....	88
Figura 70. Espectro de DEPT-135 del compuesto Pm-C2 en CDCl <sub>3</sub> .....	89
Figura 71. Espectro de HSQC del compuesto Pm-C2.....	91
Figura 72. Espectro ampliado (1H: 3-5.5 ppm; 13C: 10-65 ppm) de HMBC del compuesto Pm-C2.....	91
Figura 73. Espectro ampliado (1H: 0-1.4 ppm; 13C: 0-80 ppm) de HMBC del compuesto Pm-C2.....	92
Figura 74. Espectro de <sup>1</sup> H del compuesto Pm-C3 en CDCl <sub>3</sub> . ....	94
Figura 75. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto Pm-C3 en CDCl <sub>3</sub> . ....	96
Figura 76. Espectro de DEPT-135 del compuesto Pm-C3 en CDCl <sub>3</sub> .....	97
Figura 77. Espectro de HSQC del compuesto Pm-C3.....	98
Figura 78. Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-2.5 ppm; 13C: 0-80 ppm) del compuesto Pm-C3.....	99
Figura 79. Estructura del compuesto Pm-C2 y Pm-C3, Lofenol.....	100
Figura 80. Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C4. ....	100
Figura 81. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN sin ampliar del compuesto Pm-C4 en CDCl <sub>3</sub> .....	101
Figura 82. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto Pm-C4 en CDCl <sub>3</sub> .....	102
Figura 83. Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C5 .....	103
Figura 84. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN sin ampliar del compuesto Pm-C5 en CDCl <sub>3</sub> .....	104
Figura 85. Espectro de COSY del compuesto Pm-C5 en CDCl <sub>3</sub> . ....	106
Figura 86. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto Pm-C5 en CDCl <sub>3</sub> .....	107
Figura 87. Espectros de HSQC del compuesto Pm-C5. A la izquierda, espectro general; a la derecha, espectro ampliado en el área de 1H: 0-2.5 ppm, 13C: 0-60 ppm. ....	108
Figura 88. Estructura del compuesto Pm-C5, β-sitosterol.....	110
Figura 89. Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C6. ....	110
Figura 90. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN sin ampliar del compuesto Pm-C6. ....	111
Figura 91. Espectro de <sup>1</sup> H ampliado (12.5-8.5 ppm) del compuesto Pm-C6.....	112
Figura 92. Espectro de COSY ampliado del compuesto Pm-C6.....	113
Figura 93. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN sin ampliar del Pm-C6. ....	114

Figura 94. Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN ampliado (0 – 50 ppm) del Pm-C6.....	115
Figura 95. Espectro de DEPT-135 sin ampliar del Pm-C6.....	116
Figura 96. Espectro de DEPT-135 ampliado (0-35 ppm) del Pm-C6.....	116
Figura 97. Espectro de HSQC del compuesto Pm-C6.....	117
Figura 98. Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-2.5 ppm; 13C: 0-40 ppm) de Pm-C6. ....	118
Figura 99. Estructura del compuesto Pm-C6, ácido palmítico. ....	119
Figura 100. Espectro de IR/ATR del compuesto Is-C1.....	119
Figura 101. Espectro general de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto Is-C1 en DMSO-d6. ....	120
Figura 102. Espectro general de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Is-C1 en DMSO-d6. ....	121
Figura 103. Espectro de DEPT-135 del compuesto Is-C1 en DMSO-d6. ....	122
Figura 104. Espectro de HSQC sin ampliar del compuesto Is-C1. ....	124
Figura 105. Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-3.5 ppm; 13C: 0-40 ppm) del compuesto Is-C1. ....	124
Figura 106. Compuesto 3, un derivado de Cucurbitacina B y posible estructura base de Is-C1. ....	126
Figura 107. Espectro de IR/ATR del compuesto Is-C2.....	126
Figura 108. Espectro general de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto Is-C2 en DMSO-d6. ....	127
Figura 109. Espectro general de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Is-C2 en DMSO-d6. ....	128
Figura 110. Espectro general de DEPT-135 del compuesto Is-C2 en DMSO-d6. ....	129
Figura 111. Espectro de HSQC sin ampliar del compuesto Is-C2. ....	131
Figura 112. Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-4.5 ppm; 13C: 0-50 ppm) del compuesto Is-C2. ....	132
Figura 113. Posible estructura base de Is-C2. ....	134

## NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATR	Reflectancia Total Atenuada (Attenuated Total Reflectance)
br	Ancho (Broad)
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
cel/mL	Células por mililitro
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
cm	Centímetros
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a la menos 1
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CoCl <sub>2</sub>	Cloruro de cobalto
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Días
d (mult.)	Doblete

dd (mult.)	Doble doblete
DEPT	Transferencia de Polarización Aumentada sin Distorsión (Distortionless Enhancement Polarization Transfer)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic acid)
δ	Desplazamiento Químico
EtOAc	Acetato de etilo
eV	Electrón Volt
FC	Fracción Colectiva
FSC	Fracción Súper Colectiva
g	Gramos
g/mL	Gramos por mililitro
h	Horas
H	Hidrógeno
HMBC	Correlación de Enlace Múltiple Heteronuclear (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Coherencia Cuántica Múltiple Heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
L	Litros
m	Metros

m (mult.)	Multiplete
M.C.	Maestro en Ciencias
MeOH	Metanol
min	Minutos
mg/mL	Miligramos por mililitro
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mult.	Multiplicidad
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
$R_f$	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medio de cultivo)
s (mult.)	Singulete
SFB	Suero Fetal Bovino
t (mult.)	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

El cáncer es un padecimiento de carácter global que constituye una de las primeras causas de muerte en el mundo; es el causante de alrededor del 13 % de todas las muertes. Su distribución mundial, su ascendente incidencia, costosos tratamientos y severos efectos secundarios de los mismos nos obligan a buscar nuevas alternativas que coadyuven a las terapias anticancerígenas ya existentes. Entre esas alternativas se ha optado por el uso de extractos naturales ya que son fuente de numerosos productos efectivos contra diversas enfermedades, incluido el cáncer. El objetivo de la presente investigación fue la de evaluar la actividad citotóxica de dos plantas endémicas de México, el cactus *Pachycereus marginatus* y la cucurbitácea *Ibervillea sonora*, contra la línea celular de cáncer murino L51578Y-R, así como de aislar las sustancias químicas responsables de dicha actividad. 522 g de material vegetal de *P. marginatus* y 136 g de *I. sonora* fueron utilizados. Ambas plantas fueron sometidas a una extracción Soxhlet consecutiva con solventes de polaridad creciente (*n*-hexano, cloroformo y metanol) y a una extracción no consecutiva únicamente con metanol. Todos los extractos crudos del cactus demostraron una notable y similar actividad, aproximadamente 90 % desde 3.9 µg/ml. Los extractos de *I. sonora* demostraron cierta citotoxicidad, siendo el extracto clorofórmico el más activo, 60 % a 7.8 µg/ml. Producto de un fraccionamiento biodirigido de éstos extractos se lograron aislar e identificar los siguientes compuestos: de *Pachycereus marginatus*, Lofenol (66 % a 62.5 µg/ml), β-sitosterol (61 % a 62.5 µg/ml) y ácido palmítico (86 % a 62.5 µg/ml); de *Ibervillea sonora*, cucurbitacina 1 (56 % a 125 µg/ml) y cucurbitacina 2 (90 % a 125 µg/ml). Los resultados de este trabajo revelan el potencial de estas plantas como fuentes de productos anticancerígenos así como también contribuyen al conocimiento fitoquímico de las mismas.

## ABSTRACT

Cancer is a worldwide disease that is one of the leading causes of death; it is responsible for about the 13 % of all deaths. Its global distribution, rising incidence, expensive treatments and severe side effects of these force us to have to look for new alternatives that contribute to the existing anticancer therapies. Among these alternatives we can find the use of natural extracts since they have been a source of numerous products effective against various diseases, including cancer. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic activity of two endemic plants of Mexico, the cactus *Pachycereus marginatus* and the cucurbit *Ibervillea sonora*, against murine cancer cell line L51578Y-R, as well as to isolate the substances responsible for such activity. 334 g of *P. marginatus* and 2g of *I. sonora* were used. Both plants were subjected to a Soxhlet extraction with solvents of increasing polarity (n-hexane, chloroform and methanol) and to a non-consecutive extraction using only methanol. All the crude extracts of the cactus showed a remarkably and similar activity, approximately 90% at 3.9 µg/ml. The extracts of *I. sonora* exhibited some cytotoxicity, being the chloroform extract the most active, 70% at 7.8 µg/ml. Through a bioassay-guided fractionation of these extracts we were able to isolate and identify the following compounds: from *Pachycereus marginatus*, Lophenol (66 % at 62.5 µg/ml), β-sitosterol (61 % at 62.5 µg/ml) and palmitic acid (86 % at 62.5 µg/ml); from *Ibervillea sonora*, cucurbitacin 1 (56 % at 125 µg/ml) and cucurbitacin 2 (90 % at 125 µg/ml). The results of this study show the potential of these plants as sources of anticancer products as well as contribute to the phytochemical knowledge thereof.

## 1. INTRODUCCIÓN

A través de las épocas el ser humano ha aprovechado la naturaleza para satisfacer diversas necesidades tales como alimentación, construcción de refugios, producción de perfumes, usos ornamentales he incluso para el tratamiento de numerosas enfermedades.

El empleo de plantas con fines curativos representa la forma más antigua de medicación, siendo aprovechada a lo largo del planeta por antiguas civilizaciones como la china, egipcia, griega y culturas prehispánicas (Halberstein, 2005). Esta tradición prevalece hasta nuestros días y ha forjado la base de la medicina moderna. Es así que aproximadamente el 50% de los fármacos usados actualmente provienen de productos naturales, de los cuales el 25% son de origen vegetal (Gurib-Fakim, 2006).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, representando el 13 % de todas las muertes en el mundo (OMS, 2015). México no es la excepción y en este país el cáncer representa la tercera causa de muerte, siendo el de próstata y mama los más recurrentes (Secretaria de Salud de México, 2015). Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el año 2013 se registraron en México 73,426 defunciones a causa de esta enfermedad.



Debido a que el cáncer es un padecimiento mundial, que no distingue sexo o edad y que además los costos de sus tratamientos son excesivamente elevados, los científicos se ven obligados a descubrir nuevas alternativas que coadyuven o sustituyan a las terapias anticancerígenas actuales.

México es un país megadiverso, es decir, es una nación con una riqueza biológica enorme, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial en cuanto a diversidad vegetal se refiere (CONABIO, 2015). Esto lo convierte en un país con un enorme potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de distintas enfermedades.

El propósito del presente estudio es el de evaluar la actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R de extractos de dos plantas endémicas de México, *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora*, además de realizar un fraccionamiento biodirigido de los mismos con el objetivo de aislar y elucidar la estructura de los compuestos responsables de dicha actividad.

## 2. HIPÓTESIS

Los extractos *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora* poseen compuestos químicos con actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la citotoxicidad contra la línea celular de cáncer murino L5178Y-R de los extractos derivados de las plantas *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora*, así como aislar e identificar los compuestos bioactivos.

#### 3.2 Objetivos particulares

1. Obtener diversos extractos orgánicos a partir del material vegetal de las plantas *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora*.
2. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos obtenidos en contra de la línea murina L5178Y-R.
3. Realizar un fraccionamiento mediante cromatografía en columna de los extractos que presenten la mayor citotoxicidad.
4. Evaluar la actividad citotóxica contra L5178Y-R de las fracciones obtenidas para continuar con un fraccionamiento biodirigido.
5. Aislar, purificar y elucidar la estructura química de los compuestos que exhiban actividad citotóxica mediante técnicas espectroscópicas como son espectroscopia de IR, RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT, HMBC, HMQC) así como espectrometría de masas.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí. Las células cancerígenas, en lugar de crecer y morir como lo haría una célula normal, aumentan en tamaño y número descontroladamente consiguiendo, en algunos casos, esparcirse a los tejidos adyacentes y formar nuevos tumores, fenómeno conocido como metástasis. El principal medio por el cual se puede diseminar el cáncer es por vía sanguínea y linfática; las células cancerígenas se desprenden del tumor y entran a estos torrentes, esto les permite invadir órganos distantes (Qian *et al.*, 2001). Existen muchos tipos diferentes de cáncer, pudiendo formarse en casi cualquier órgano o tejido, como el pulmón, el colon, los senos, la piel, los huesos o el tejido nervioso. El origen de algunos tipos de cáncer es aún desconocido, sin embargo, se sabe que en general las principales causas son debido a factores genéticos, malos hábitos alimenticios, fumar tabaco, infecciones microbianas y/o virales, así como exposiciones a radiación o a sustancias químicas presentes en el medio ambiente.

Entre las diferentes estrategias para combatir el cáncer se encuentran la cirugía, radioterapia, inmunoterapia, trasplante de células de la médula ósea y la quimioterapia, es decir, el uso de compuestos químicos capaces de impedir la proliferación de las células cancerosas.

Estadísticamente hablando el cáncer es de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en ese mismo año (OMS, 2015). En los Estados Unidos de América se habían reportado 14.5 millones de habitantes con algún tipo de cáncer para enero del 2014 y se estima que casi 600,000 personas morirán en el 2015 de esta misma enfermedad (American Cancer Society, 2015). En México las cifras tampoco son muy alentadoras. En nuestro País se detectan más de 128,000 nuevos casos por año de personas con esta patología (Secretaría de Salud, 2015)

Otro de los grandes inconvenientes es que los actuales tratamientos contra esta enfermedad son excesivamente costosos. En los Estados Unidos las deudas han sido tan cuantiosas que en el año 2007 el 69.1% de los pacientes en tratamiento se veían obligados a llegar a la bancarrota personal (Siddiqui y Rajkumar, 2012).

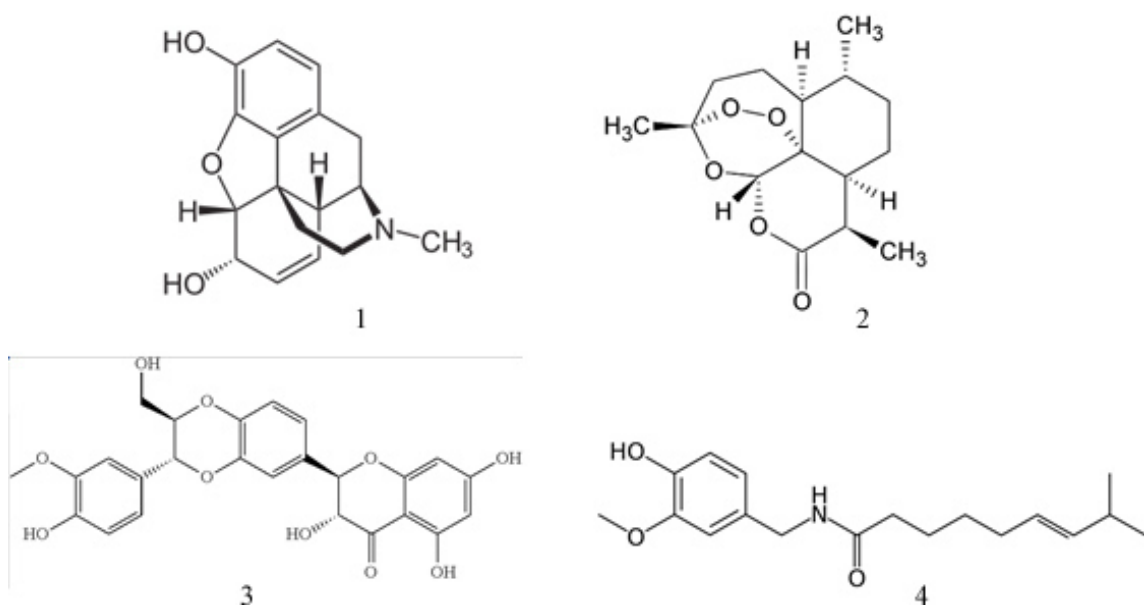
Debido a que la quimioterapia sistémica continúa siendo uno de los principales métodos de tratamiento contra el cáncer, existe una clara necesidad de descubrir nuevos agentes clínicamente eficaces. La ascendente frecuencia y distribución mundial de esta enfermedad sin hacer distinción de género o edad motiva a los investigadores a buscar nuevas alternativas para el tratamiento contra el cáncer.

## 4.2 El rol de las plantas en la medicina moderna

Las plantas con propiedades curativas han tenido una participación importante a través de los años en la historia de la humanidad y, aún hoy en día, son básicas en la práctica sistemática de la medicina tradicional de diferentes regiones en el mundo (Ahmad *et al.*, 2006). Estas son capaces de sintetizar una amplia variedad de componentes químicos que son indispensables para realizar importantes funciones biológicas, además de que las utilizan como mecanismo de defensa contra depredadores como insectos, hongos y mamíferos herbívoros.

La contribución de éstas en la farmacología moderna ha sido muy significativa; aproximadamente el 30 % de los fármacos utilizados actualmente en países industrializados provienen de las plantas o son derivados de éstas (Newman y Cragg, 2007, 2012).

Ejemplos de drogas derivadas de vegetales y de amplio uso hasta incluso el día de hoy se muestran en la figura 1: la morfina (**1**) (*Papaver somniferum*), el primer producto natural comercial utilizado para fines terapéuticos; la artemisinina (**2**) (*Artemisia annua*), una lactona antimalarial; la silimarina (**3**) (*Silybum marianum*), componente utilizado para el tratamiento de padecimientos hepáticos; la capsaicina (**4**) (*Capsicum annuum*), sustancia utilizada como analgésico y antioxidante (Veeresham, 2012).



**Figura 1.** Estructuras químicas de productos naturales utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos: morfina (1), artemisinina (2), silimarina (3) y capsaicina (4).

Para el tratamiento o prevención específicamente del cáncer los productos naturales también han demostrado poseer un potencial enorme. Aunque esta enfermedad ha estado presente en la humanidad desde sus inicios, ha sido difícil identificar su diagnóstico en textos antiguos, es por eso que el entendimiento y tratamiento el cáncer ha sido lento, sin embargo, la identificación y desarrollo de compuestos de origen natural y sus derivados han contribuido enormemente a este proceso en los últimos años. De diversas especies vegetales (Figura 2) se han conseguido aislar agentes antitumorales, entre los que destacan *Taxus brevifolia*, *Catharanthus roseus*, *Camptotheca acuminata*, *Podophyllum petatum*, entre otras (Nobili *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Principales ejemplos de especies vegetales fuente de agentes anticancerígenos.

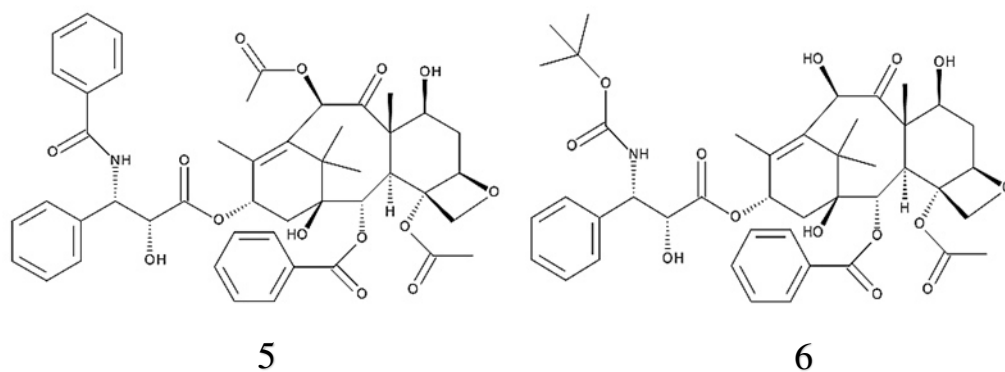
Más del 30 % de los fármacos actualmente en uso, entre ellos los anticancerígenos, son productos naturales o derivados de éstos (Newman y Cragg, 2007, 2012). En 2008, de 225 fármacos derivados de productos naturales en diferentes estados de desarrollo clínico, 86 estaban siendo probados contra cáncer (Harvey, 2008).

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos ha aprobado la producción comercial de siete compuestos de origen vegetal para su uso terapéutico como anticancerígenos (Taylor, 2000). Estos son:

Paclitaxel (5), comercialmente llamado Taxol, inicialmente extraído de la corteza de *Taxus brevifolia* y que ha sido uno de los compuestos vegetales más significativos para



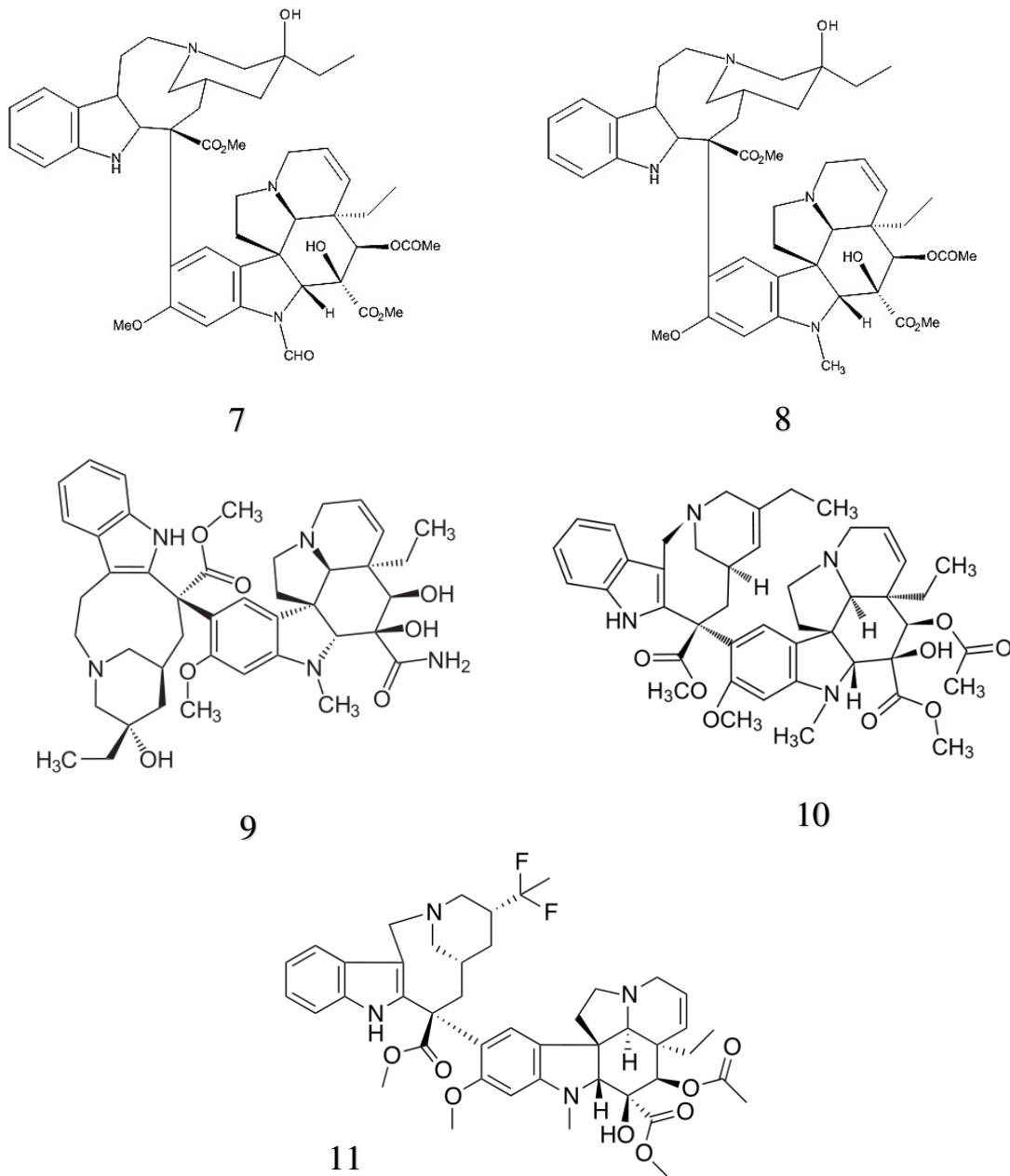
el tratamiento de tumores malignos. Docetaxel (**6**), un taxano semisintético derivado del 10-deacetilbaccatina III que, a su vez, es obtenido del árbol del tejo europeo, *Taxus baccata*. Ambos son usados para el tratamiento de carcinomas de ovario y de pecho (Sandler *et al.*, 2006) y carcinomas de la vejiga, cervix, pulmón y ovarios (Tannock *et al.*, 2004), respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Estructuras químicas de los compuestos Paclitaxel (5) y Docetaxel (6), productos naturales anticancerígenos aislados de plantas del género *Taxus*.

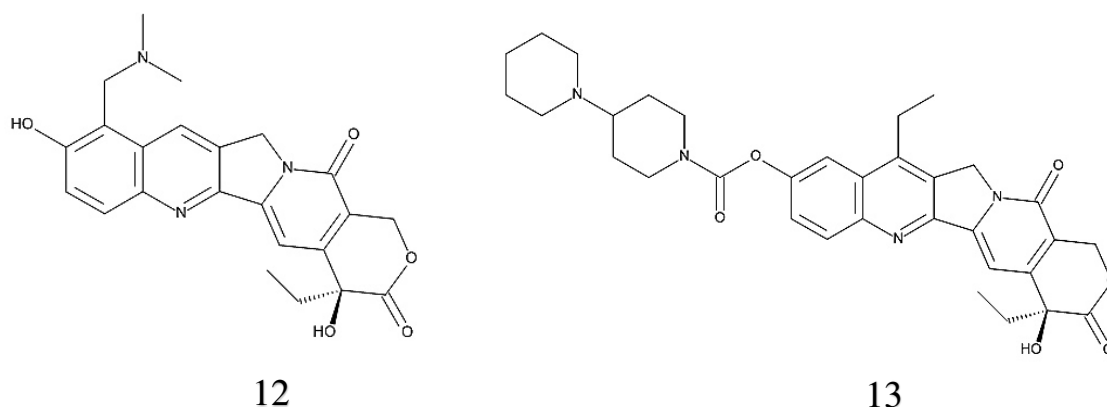
Vincristina (**7**) y Vinblastina (**8**), Figura 4, son alcaloides aislados de la “Teresita”, *Catharanthus roseus* (antes llamada *Vinca rosea*). Extractos de esta especie poseen diversos efectos terapéuticos incluyendo actividad antitumoral. Otros alcaloides derivados de esta especie y que también han demostrado actividad anticancerígena son la Vindesina (**9**), Vinorelbina (**10**) y Vinflunina (**11**), esta última recientemente sintetizada y actualmente aprobada en Europa para su uso médico (Moudi *et al.*, 2013). El principal mecanismo de acción de estas sustancias es mediante su interacción con las tubulinas, la ruptura de los microtúbulos (estructuras indispensables en el proceso de división celular)

y, subsecuentemente, la detención de la división de las células cancerígenas (Singla *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Estructuras químicas de los compuestos Vincristina (7), Vinblastina (8), Vindesine (9), Vinorelbina (10) y Vinflunina (11) sustancias derivadas de *Catharanthus roseus* y actualmente utilizadas en la terapia anticancerígena.

Topotecán (**12**) e Irinotecán (**13**) son análogos semisintéticos del alcaloide quinolínico camptotecina (Figura 5), encontrado en la corteza del árbol chino *Camptotheca acuminata*. Estos han tenido un enorme éxito en las terapias actuales contra el cáncer (Adams, 2006). Topotecán es usado para el tratamiento de cáncer de ovario y de cáncer pulmonar (Schellens *et al.*, 1996). Irinotecán se usa para el tratamiento del cáncer metastásico colorectal (Cunningham *et al.*, 2004).

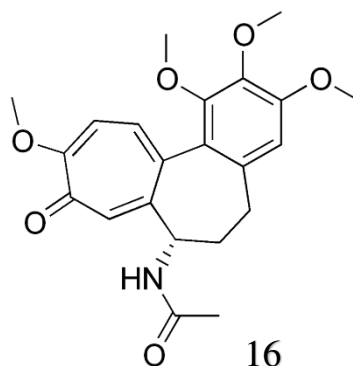


**Figura 5.** Topotecán (9) e Irinotecán (10), dos análogos del alcaloide camptotecina, aislada de *Camptotheca acuminata*.

Etopósido (**14**) y Tenipósido (**15**) son derivados glucosídicos de la podofilotoxina, sustancia aislada de la planta india *Podophyllum peltatum*. Ambos compuestos (Figura 6) son similares en cuanto a su mecanismo de acción y espectro de actividad antitumoral. Etopósido y Tenipósido estabilizan la unión entre la topoisomerasa II y el ADN, evitando la reunión de las hebras rotas de ADN y así, la condensación correcta de los cromosomas, lo que finalmente conlleva a muerte celular (Thakur, 2011).

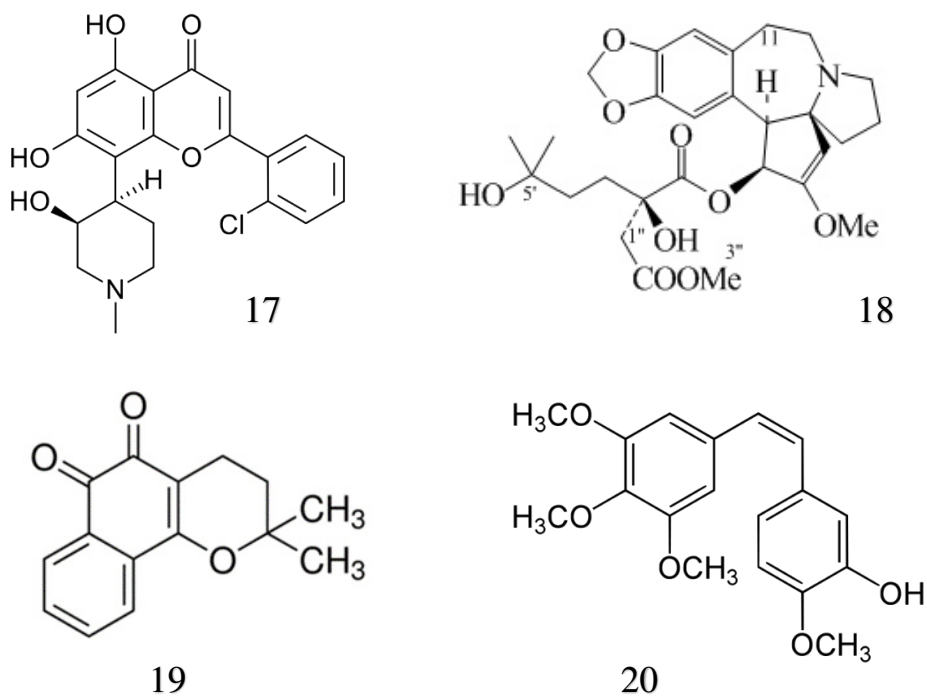


Colchicina (**16**) es un alcaloide soluble en agua obtenido de la planta *Colchicum autumnale* (Figura 7). El compuesto bloquea o suprime la división celular inhibiendo la mitosis (Borisy y Taylor, 1967; Tseng *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Estructura química de la Colchicina (16), producto natural anticancerígeno aislado de la planta *Colchicum autumnale*.

Otros ejemplos de compuestos derivados de plantas actualmente bajo investigación contra el cáncer se muestran en la Figura 8. El Flavopiridol (**17**), una flavonona sintética derivada del alcaloide Rohitukina, aislado de las hojas y corteza de *Amoora rohituka*; Homoharringtonina (**18**), un alcaloide aislado del árbol chino *Cephalotaxus harringtonia* y que su eficacia contra varias leucemias ha sido comprobada;  $\beta$ -Lapachona (**19**), una quinona obtenida de la corteza del árbol de lapacho, *Tabebuia avellanedae*; Combretastatina A4 (**20**), aislada del tallo del árbol sudafricano *Cobretum caffreum* (Nobili *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Estructuras químicas de sustancias actualmente bajo investigación para tratamiento contra el cáncer: Flavopiridol (17), Homoharringtonina (18),  $\beta$ -lapachona (19), Combretastatina A4 (20).

Como se puede apreciar, a pesar del progreso tecnológico y científico en el área de química combinatoria, los fármacos aislados de especies vegetales siguen teniendo una enorme contribución en el descubrimiento de nuevos medicamentos anticancerígenos. Las plantas son una atractiva fuente de nuevos compuestos bioactivos debido a la gran diversidad química que se encuentra en millones de especies establecidas en diferentes ecosistemas (Jones y Firn, 1991).

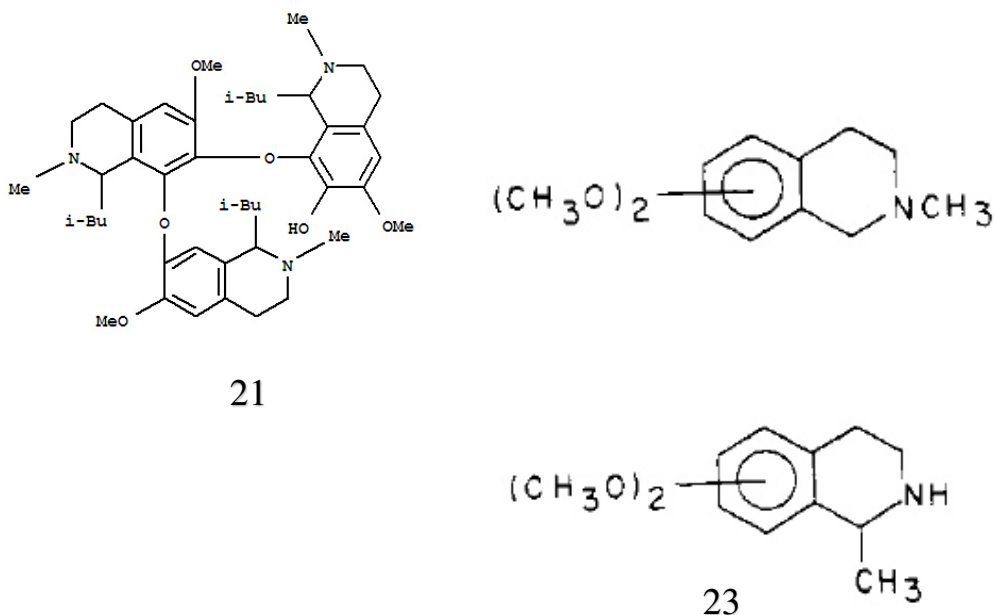
### 4.3 Plantas seleccionadas para este estudio

#### 4.3.1 *Pachycereus marginatus*

Popularmente conocido como “órgano” y “chilayo”, es una especie fanerógama perteneciente a la familia Cactaceae. Es endémica de Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla en México. Se trata de un cactus columnar, simple o poco ramificado, de 3 a 5 m de altura, por 8 a 15 (20) cm de diámetro, de color verde oscuro. Puede desarrollar de 4 a 7 Costillas, elevadas, anchas, con arista delgada. Esta especie crece en los ambientes más áridos, donde las precipitaciones anuales son menores a 600 mm. La planta es usada frecuentemente por la población rural para formar setos vivos usados como cercas de habitaciones, parcelas, corrales y huertos. La flor y el fruto son comestibles y con los tallos se prepara una tintura usada para teñir el pelo dando una intensa coloración negra (Bravo-Holis, 1978). La corteza es utilizada para padecimientos relacionados con riñones y vejiga, cuando hay “mal de orina”, en forma de cataplasmas que se colocan a la altura de las regiones afectadas. Se prepara agua de uso para curar el malestar posterior a la ingestión de bebidas alcohólicas y para problemas de cirrosis hepática. En caso de fatiga intensa la corteza se coloca bajo las plantas de los pies (Arias-Toledo *et al.*, 2000).

*Pachycereus marginatus* posee una estrecha relación filogenética con *Lophocereus schottii* (Hartmann *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2005), una especie que, según la creencia popular, entre sus múltiples propiedades se encuentra la de curar el cáncer estomacal (BDMTM-Ls, 2015). Además, de *P. marginatus* se han aislado dos alcaloides que también se encuentran en *L. schottii* (Figura 9): Pilocereína (**21**) (Djerassi *et al.*, 1954) y un alcaloide isoquinolínico parcialmente elucidado (**22**) (Unger y Cooks, 1980). Asimismo,

Unger y Cooks también identificaron parcialmente otro alcaloide de *P. marginatus* (23) (Figura 9).



**Figura 9.** Estructuras químicas de sustancias aisladas del cactus *Pachycereus marginatus*: Pilocerina (21) y dos alcaloides isoquinolínicos (22, 23). Cabe señalar que (21) y (22) también se han aislado de *Lophocereus schottii*.

En cuanto a actividad biológica de *P. marginatus* no existe ningún reporte científico al respecto.

#### 4.3.2 *Ibervillea sonorae*

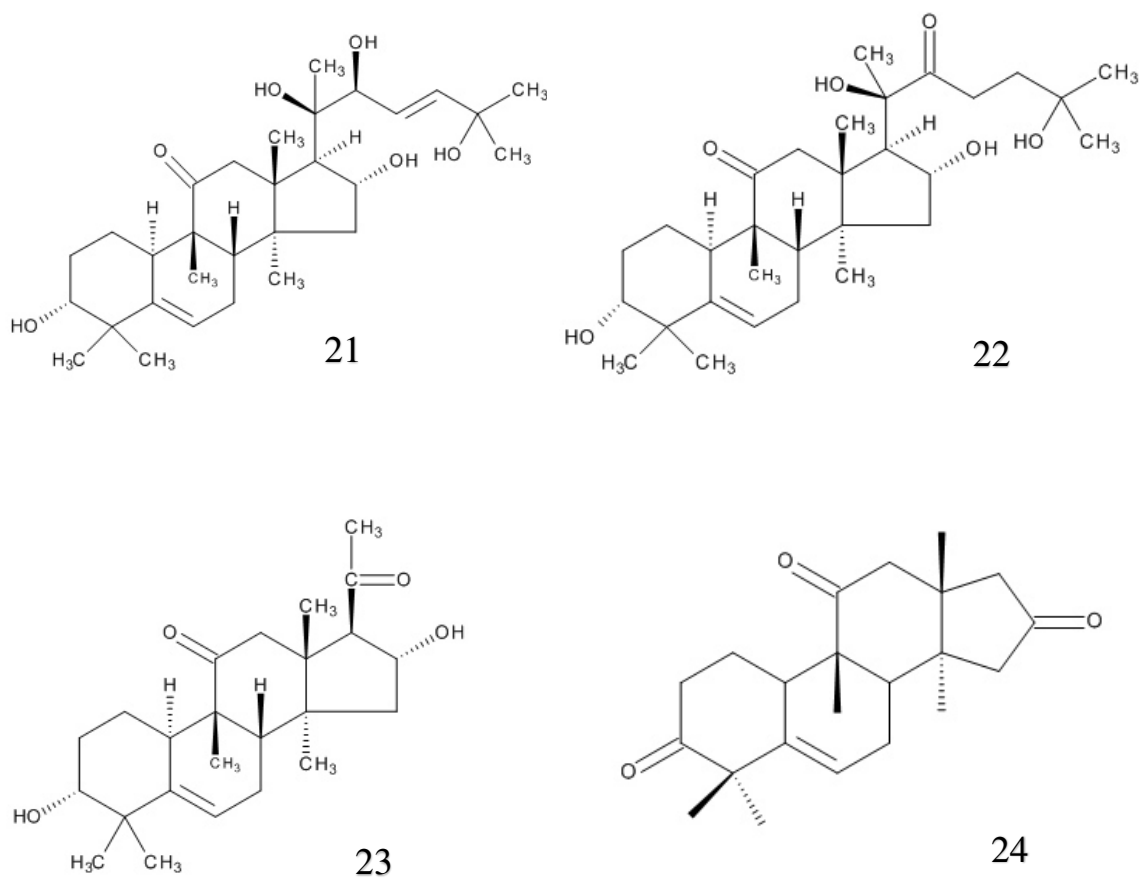
Conocida popularmente como wareque o guareque es una planta dioica perenne que pertenece a la familia Cucurbitacea y se encuentra distribuida en los estados de Sonora y Sinaloa. En Sonora su raíz tuberosa es ampliamente utilizada como antirreumático,



antidiabético, para el tratamiento de problemas del corazón e incluso para el tratamiento del cáncer (Lira y Caballero, 2002).

Su actividad antidiabética es respaldada por diversas investigaciones. El extracto acuoso de la raíz de esta planta estimula la captación de glucosa de los preadipocitos mediante la vía independiente de PI3K (Zapata-Bustos *et al.*, 2014). Extractos diclorometánicos de la raíz exhibieron una notable actividad hipoglicémica en ratones previamente diabetizados con aloxano (Alarcon-Aguila *et al.*, 2005). Además, extractos acuosos de la raíz de *I. sonorae* redujeron los niveles de glicemia y triglicéridos en ratones previamente sometidos a una dieta alta en grasas (Rivera-Ramírez *et al.*, 2011). Por otro lado, el extracto acuoso de la raíz reveló una considerable actividad citotóxica sobre la línea de cáncer mamario humano T47D (Vega-Avila *et al.*, 2009).

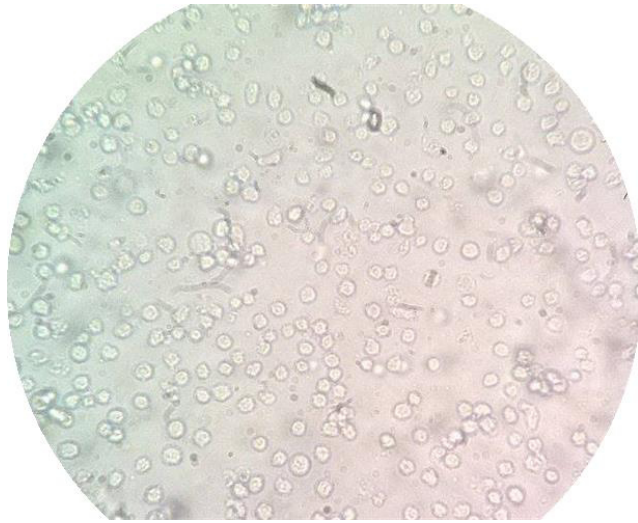
De *I. sonorae* se ha identificado la presencia de diversos compuestos: cetonas, alcoholes, alcanos, alquenos, ésteres, compuestos aromáticos, amidas, éteres y ácidos grasos (Morales y Siles, 2013). Además, se han logrado aislar algunas sustancias puras, destacando las cucurbitacinas Kinoina A (**21**), Kinoina B (**22**), Kinoina C (**23**) y Kinoina D (**24**) mostradas en la Figura 10 (Weckert *et al.*, 1993; Jardón *et al.*, 2014; Achenbach *et al.*, 1993).



**Figura 10.** Estructura química de la Kinoina A (21), Kinoina B (22), Kinoina C (23) y Kinoina D (24), cucurbitacinas aisladas de *Ibervillea sonora*.

#### 4.4 Linfoma L5178Y-R.

El tumor de L5178Y-R es una línea celular derivada de un linfoma que surgió en un ratón hembra DBA/2 tratado con 3-metilcolantreno y se ha mantenido por pases *in vivo* en su hospedero singénico (Figura 11). Las células son resistentes a Rayos X, pero sensibles a radiación UV, además son sensibles a fármacos antineoplásicos por lo que son ideales para evaluaciones de actividad citotóxica (Beer *et al.*, 1984; Boyd y Paul, 1995).



**Figura 11.** Células del linfoma murino L5178Y-R suspendidas en medio RPMI 1640. Vista con aumento “40x”

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Colecta y extracción de plantas en estudio.

#### 5.1.1 Colecta e identificación del material vegetal.

*Pachycereus marginatus* fue comercialmente adquirido en el Mercado Juárez, en el centro de Monterrey, mientras que *Ibervillea sonora* fue colectada en terrenos del municipio de Ahome, estado de Sinaloa. Posterior a la colecta, se preparó una muestra para herbario de cada una de las especies. Las muestras fueron identificadas y depositadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Pachycereus marginatus*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Género	<i>Pachycereus</i>
Especie	<i>marginatus</i>

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Ibervillea sonora*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Ibervillea</i>
Especie	<i>sonora</i>

### 5.1.2 Preparación del material vegetal

Una vez colectadas e identificadas, las plantas se prepararon para su posterior extracción. La parte a usar de *P. marginatus* fue el tallo; de *I. sonorae*, la raíz. Las plantas fueron lavadas, cortadas y secadas, esto último aplicando luz de lámpara de 90 watts y así producir un calor constante de 40°C. A lo largo del proceso de secado, mismo que duró aproximadamente 3 días, se desechaba el material contaminado por hongos. El material completamente seco se molió empleando un molino manual.

### 5.1.3 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet es un método de extracción líquido-sólido ampliamente utilizado en la extracción de metabolitos de plantas. Este sistema consta de un matraz colector, una cámara de extracción y un condensador (Figura 12). Su principal ventaja es que se trata de un proceso continuo, dado que el solvente deja el matraz como vapor y es condensado en la cámara de extracción para extraer el material vegetal en forma constante, antes de volver al matraz colector mediante el sistema de sifón. El método es práctico, sin embargo, presenta la desventaja de que, como requiere calentar el solvente a su punto de ebullición, puede causar daño a compuestos termolábiles además de formación de artefactos (Seidel, 2006). Ambas plantas fueron sometidas a dos distintos tipos de extracción Soxhlet: una extracción consecutiva con solventes de polaridad creciente (*n*-hexano, cloroformo y metanol) y una extracción no consecutiva usando únicamente metanol. Se utilizaron 600 mL por extractor de cada solvente durante 40 h. Al finalizar la extracción se filtró la solución de cada extracto utilizando filtros “Whatman” y mediante el uso de un Rotavapor “Büchi” R-3000 (Figura 13) se llevaron a sequedad.



**Figura 12.** Extractor Soxhlet



**Figura 13.** Rotavapor “Büchi” R-3000

#### 5.1.4 Extracción líquido-líquido

Los extractos metanólicos derivados de la extracción no consecutiva fueron sometidos a una extracción líquido-líquido con *n*-hexano y acetato de etilo como solventes de partición, basándose en la metodología reportada por Pérez-Castorena *et al.* (2006).

El residuo metanólico original se redisolvió en 200 mL de metanol y se vertió en un embudo de separación tipo Squibb de 250 mL de capacidad. A continuación, se agregaron 200 mL de hexano, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la formación de las dos fases inmiscibles para posteriormente recuperar la fase hexánica. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones más (600 mL de hexano en total). La fase hexánica se concentró bajo presión reducida y se determinó peso y rendimiento del residuo obtenido. El residuo metanólico se concentró hasta obtener un volumen de 30 mL, los cuales fueron disueltos en 170 mL de agua destilada. Esta mezcla se trasvasó nuevamente en el embudo junto con 200 mL de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la formación

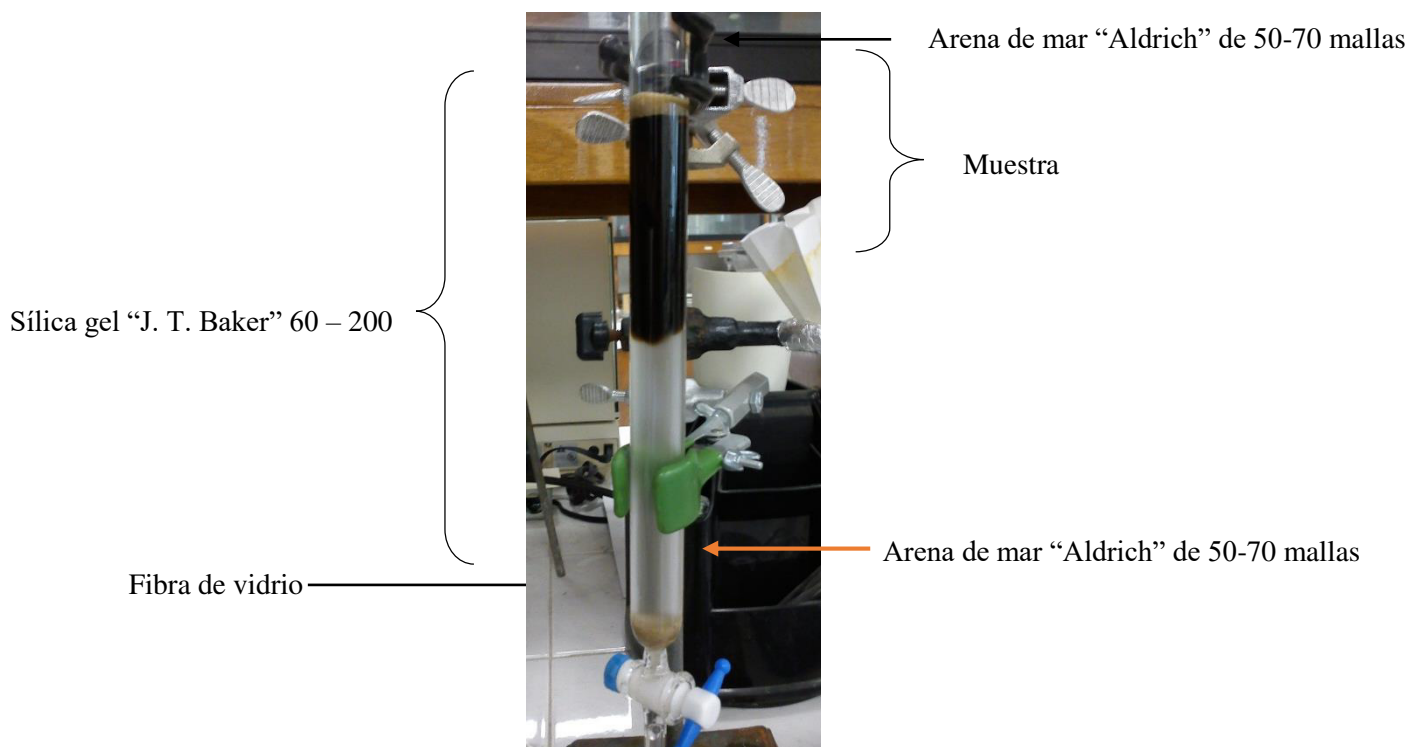
de las dos fases inmiscibles para finalmente recuperar la fase de acetato de etilo. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones más (600 mL de acetato de etilo en total). La fase de acetato de etilo se concentró bajo presión reducida y se determinó peso y rendimiento del residuo obtenido. Estas particiones junto con los extractos crudos producto de la extracción consecutiva fueron sometidas a las pruebas biológicas descritas más adelante. El residuo metanólico/acuoso de las extracciones no consecutivas no se tomaron en cuenta para dichas pruebas.

## 5.2 Aislamiento de compuestos con actividad citotóxica sobre el linfoma L5178Y-R

### 5.2.1 Cromatografía en columna de Sílica gel

La cromatografía en columna con sílica gel es una técnica que permite la separación de mezclas de compuestos orgánicos mediante el mecanismo de adsorción. Existen dos componentes principales en este proceso, la fase estacionaria (en este caso sílica gel) y la fase móvil (solvente). La fase móvil pasa a través de la fase estacionaria mediante el efecto de la gravedad y debido a la resistencia de la fase estacionaria empaquetada en la columna el flujo no es muy rápido. El proceso puede ser isocrático, donde la fase móvil permanece de la misma composición durante todo el experimento, o por gradientes. La elución por gradiente consiste en una secuencia de diferentes eluentes que, en el caso de la sílica gel, va aumentando su polaridad. El analito fluirá dependiendo de su afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria, reteniéndose menos los compuestos poco polares y eluyendo más lentamente aquellos que posean mayor polaridad. Las alícuotas recolectadas, llamadas fracciones, se analizan mediante cromatografía en capa fina para evaluar su pureza y mezclar aquellas de composición similar (Houghton y Raman, 1998).

Para la implementación de esta técnica se emplearon columnas de vidrio de 40 cm de largo por 2 cm de diámetro (Figura 14), ideales para muestras de entre 1 y 2 g. Como fase estacionaria se utilizó Sílica gel “J. T. Baker” de 60-200 mallas, 20 g de sílica por cada gramo de muestra aproximadamente. Como fase móvil se emplearon todos o algunos de los siguientes solventes orgánicos: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Los solventes y gradientes empleados se especifican en la sección de resultados.



**Figura 14.** Componentes de una columna cromatográfica de Sílica gel

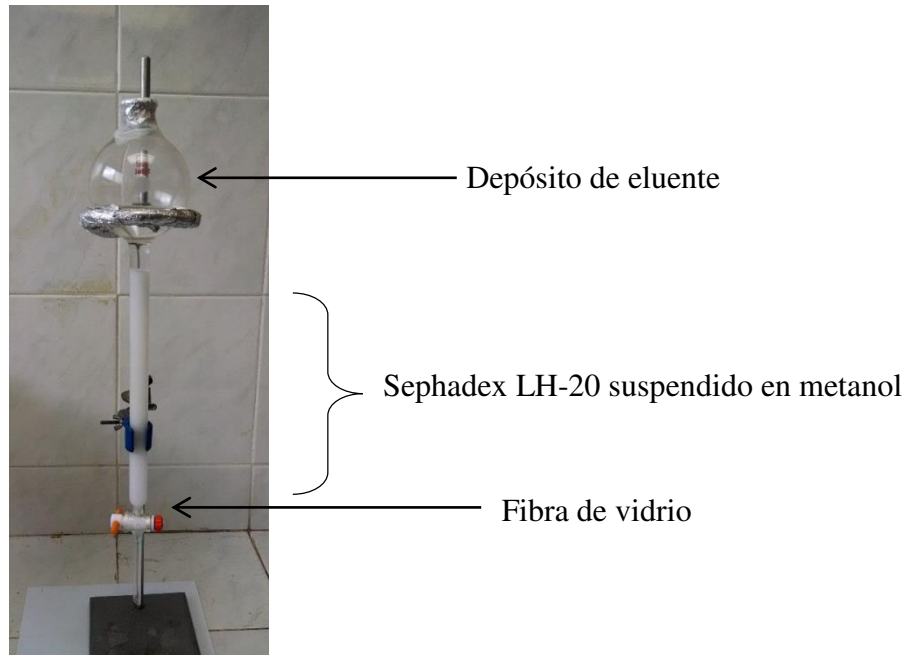


### 5.2.2 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso o tamaño molecular. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. En la práctica, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por polímeros entrecruzados. En consecuencia estas partículas son porosas y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar en los mismos, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de ésta (Reid y Sarker, 2006).

El polímero utilizado en ésta investigación fue Sephadex LH-20 25-100  $\mu\text{m}$ , el cual fue preparado mediante la hidroxipropilación de Sephadex G-25. Fue fabricado especialmente para la separación de productos naturales como esteroides, terpenoides y lípidos en solventes orgánicos (Ellingboe *et al.*, 1970).

Para la realización de esta técnica cromatográfica se empleó una columna de 23 cm de largo por 1.7 cm de diámetro, acoplado en su parte superior un depósito esférico de vidrio como contenedor de eluente. La columna se llenó con Sephadex LH-20 suspendido en metanol (Figura 15). Para su elución se empleó igualmente metanol y se colectaron fracciones de un volumen aproximado de 5 mL hasta completar la elución total de la muestra.



**Figura 15.** Componentes de la columna cromatográfica de Sephadex

### 5.2.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

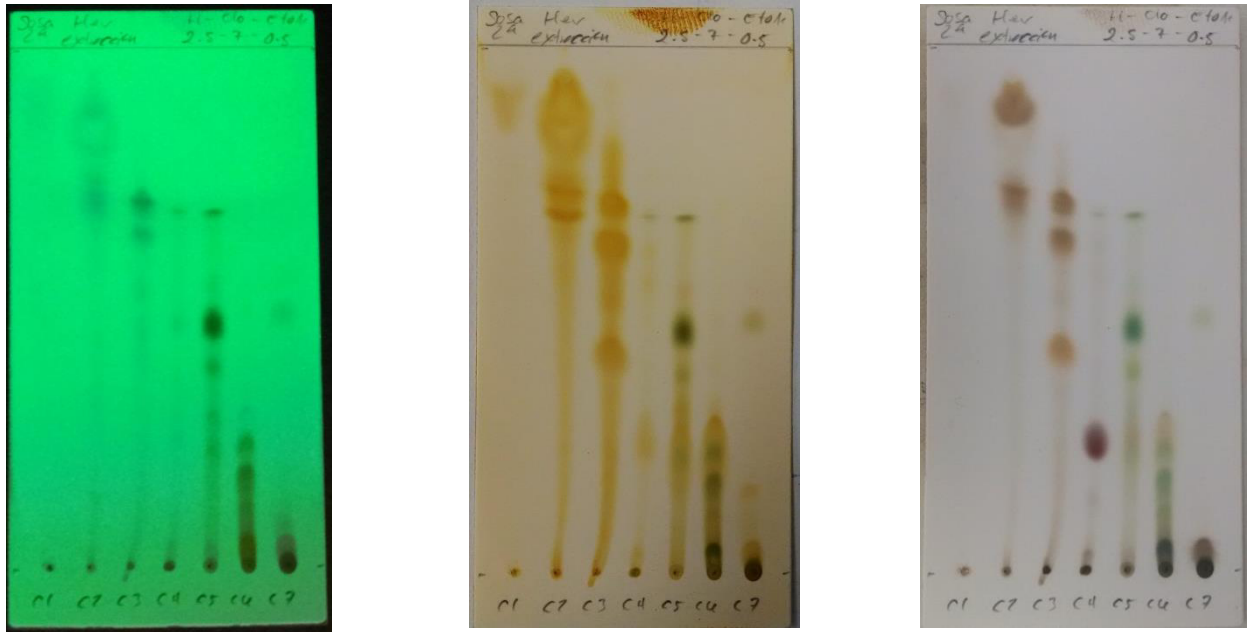
La cromatografía en capa fina es una técnica cualitativa que permite constatar la pureza de los componentes del extracto separados mediante la cromatografía en columna. Ésta consiste de una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel, la cual está mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se coloca mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatoplaca. Ésta se introduce a continuación en una cámara cromatográfica la cual contiene una cierta cantidad de la fase móvil (eluyente). El eluyente sube por capilaridad a través de la cromatoplaca lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio (Dzido y Tuzimski, 2008) entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluyente (Figura 16).



**Figura 16.** Desarrollo de una CCF dentro de una cuba cromatográfica.

Una vez terminado el proceso de separación, la cromatoplate se revela mediante la radiación de luz ultravioleta (254/365 nm), exposición a vapores de yodo dentro de una cámara, rociado de cloruro de cobalto seguido de calentamiento o utilizando los tres métodos, para observar como manchas los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplate (Figura 17).

Para nuestras investigaciones se utilizaron cromatoplates “Merck” (Sílica gel 60 F254, 5 × 10 cm y 4 x 8 cm, 250 nm de grosor de capa) y la muestra a analizar se colocó con apoyo de un capilar de vidrio. El eluyente en la cámara cromatográfica (10 mL) fue diferente para cada análisis y se especificará su composición en cada apartado de la sección de resultados.



**Figura 17.** Una misma cromatoplatea expuesta a diferentes técnicas de revelado: A la izquierda, con luz UV 254/365 nm; al centro, con vapores de yodo; a la derecha, con un rocío de cloruro de cobalto seguido de calentamiento.

#### 5.2.4 Cristalización

La cristalización es en esencia un proceso de colisión en el cual un coloide molecular tiende a formar agregados moleculares llamado núcleos, los cuales posteriormente se desarrollan en cristales con una estructura interna y una superficie externa muy características para cada uno de los productos naturales. Por el hecho de ser un proceso de colisión, influyen factores como la concentración de los compuestos y la agitación lo cual determina el grado de colisiones moleculares en solución (Cannell, 1998).

Para la realización de esta técnica se empleó hexano para solubilizar la mezcla de compuestos. Se agregó la mínima cantidad de solvente necesario para disolver la muestra en su totalidad apoyándose con calor y agitación constante. A continuación, la solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h y después a 4 °C durante el tiempo

necesario hasta que se formaran cristales. El sólido formado se separó mediante decantación. El sólido y sus aguas madres se compararon en cromatoplaça y, de ser necesario, tanto el sólido como las aguas madres se siguieron sometiendo a técnicas cromatográficas de separación para seguir purificándolos.

### 5.3 Evaluación de la Actividad Citotóxica

#### 5.3.1 Preparación de Tratamientos

De cada extracto, fracción cromatográfica o compuesto puro aislado se preparó una solución “stock”, utilizando calor, sonicación y agitación como apoyo, para después realizar el ajuste a una concentración de 1 mg/mL que es la concentración inicial de la cual se parte para la primera fase de los bioensayos.

#### 5.3.2 Linfoma L5178Y-R

La línea celular L5178Y-R se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection) y se mantuvo en medio RPMI-1640 completo (10 % de suero fetal bovino, 1 % de L-glutamina, 0.5 % de solución penicilina estreptomycin, y 0.1 % de fungizona) como medio de propagación. La línea celular L5178-Y es un linfoblastoma murino, que se obtuvo a partir de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 con metilcolantreno (Beer *et al.*, 1983).

Las células se inocularon a un ratón DBA/2 y se observó por 15 d el desarrollo de alguna masa o deformidad dentro de él, verificando que la proliferación de la línea L5178-Y esté presente dentro de éste. Para obtener las células, primero se sacrificó el ratón por

dislocación cervical y se le aplicó alcohol para desinfectar y seleccionar el área peritoneal para la inyección de PBS (Buffer Fosfato Salino), para lo cual se tiró de la piel y con el bisel hacia abajo se introdujeron 5 mL de PBS. A continuación, se hizo un lavado, moviendo al ratón de un lado hacia otro, para después extraer mediante succión con la jeringa el PBS inyectado anteriormente en el área peritoneal, los cuales se agregaron a un tubo estéril conteniendo 3 mL de PBS. Después de la extracción las células obtenidas en PBS se centrifugaron a 1800 rpm a 30 °C por 5 min, para realizar el primer lavado y en cada lavado se decantó el sobrenadante hasta tener el pellet de células; el segundo lavado fue con medio RPMI 1640 centrifugando de la misma manera y el tercero se realizó con medio RPMI 1640 SFB al 10 %. Después de re-suspender las células en la solución se tomaron 100 µL y se vaciaron en los frascos con 6 mL de RPMI 1640 SFB 10 % para incubarlas bajo las siguientes condiciones: 37 °C, 5.0 % CO<sub>2</sub> y 55 % de humedad relativa (Mitchell *et al.*, 1988).

### 5.3.3 Método de viabilidad celular y evaluación de la actividad citotóxica

El uso del bromuro de metiltetrazolio (MTT) brinda la posibilidad de cuantificar la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad en células normales. El fundamento de la utilización de éste compuesto como indicador de viabilidad es en base a la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, él cual es reducido a azul de formazán, observando un cambio de color, que puede ser medido mediante espectrofotometría (Liu *et al.*, 1997). De ésta manera los pocillos que presenten mayor cantidad de células vivas mostrarán mayor absorción en el espectrofotómetro.

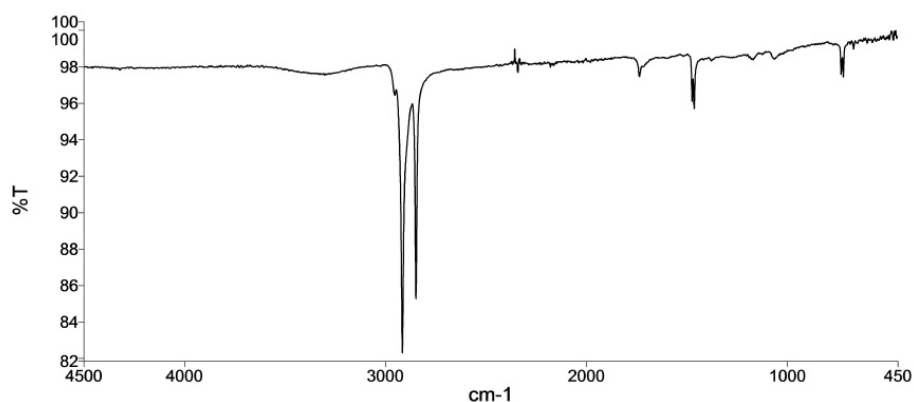
Para la realización del ensayo *in vitro* para la evaluación citotóxica de los extractos, fracciones cromatográficas y/o compuestos puros aislados de *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora* contra el linfoma murino, las células se incubaron hasta obtener una concentración de  $5 \times 10^4$  células/mL y se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (100  $\mu$ L/pocillo). Una vez que se ajustó la suspensión celular se le agregó el tratamiento, partiendo de una concentración inicial de 1000  $\mu$ g/mL, así como de varias diluciones seriadas. Se incubaron a 37 °C por 48 h a 5.0 % CO<sub>2</sub> y 55 % de humedad relativa. Al terminar el tiempo requerido para el crecimiento celular se le adicionaron 15  $\mu$ L de MTT a todos los pocillos y se incubó por 3-4 h más. Al término de la incubación se decantó la solución y se le adicionaron 80  $\mu$ L de DMSO a cada pozo y se agitaron con ayuda de un Vortex. Al terminar, se leyeron las densidades ópticas a 540 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc.). Los resultados se expresan graficando la citotoxicidad corregida de los tratamientos (citotoxicidad del tratamiento menos la citotoxicidad del vehículo) y el error estándar, con respecto al control no tratado.

## 5.4 Análisis Espectroscópico

### 5.4.1 Espectroscopía de Infrarrojo

Mediante esta técnica se identifican compuestos orgánicos por medio de radiación electromagnética en el rango de Infrarrojo. En esta región la energía es utilizada por las moléculas orgánicas para deformar ya sea, sus ángulos de enlace o la longitud de sus enlaces (Silverstein *et al.*, 2005). En nuestra investigación se utilizó IR-ATR (Infrared Attenuated Total Reflection) una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una

onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito. IR-ATR es una técnica muy práctica ya que la muestra necesita poca preparación previa a su análisis, pudiéndose aplicar en forma sólida, líquida o en otras consistencias de difícil manipulación (Ramer y Lendl, 2013)



**Figura 18.** Espectro de IR-ATR.

#### 5.4.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La técnica de espectroscopia de RMN se ha desarrollado como la herramienta más importante para la determinación de estructuras de productos naturales aislados de plantas. Básicamente, se trata de otra forma de espectroscopía de absorción, dado que bajo la influencia de un campo magnético un compuesto orgánico puede absorber radiación electromagnética de la región de microondas (60-600 MHz) como frecuencias gobernadas por el entorno químico de los átomos de hidrógeno o de carbono 13 presentes en la molécula (Macomber, 1998; Silverstein *et al.*, 2005; Mitchell y Costisella, 2007). Los espectros de RMN se obtienen normalmente en soluciones del 2 al 30 % en un disolvente



aprótico (normalmente cloroformo deuterado, tetracloruro de carbono o sulfóxido de dimetilo deuterado) y un pequeño porcentaje del estándar de referencia tetrametilsilano. Se requieren alrededor de 10 mg de muestra para un espectro de alta calidad (Jacobsen, 2007). Para nuestras investigaciones los espectros de RMN fueron obtenidos con un instrumento Bruker DPX (1H, 300 o 400 MHz; 13C, 100 o 125 MHz).

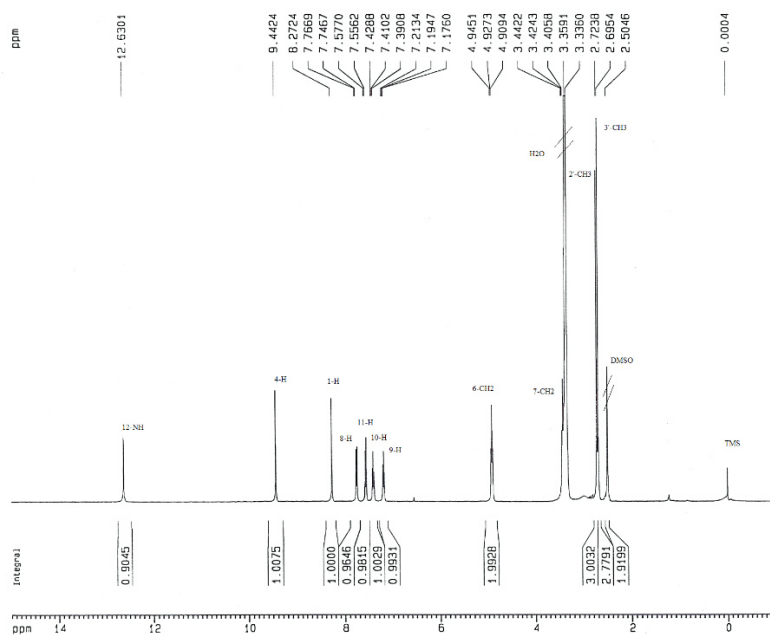
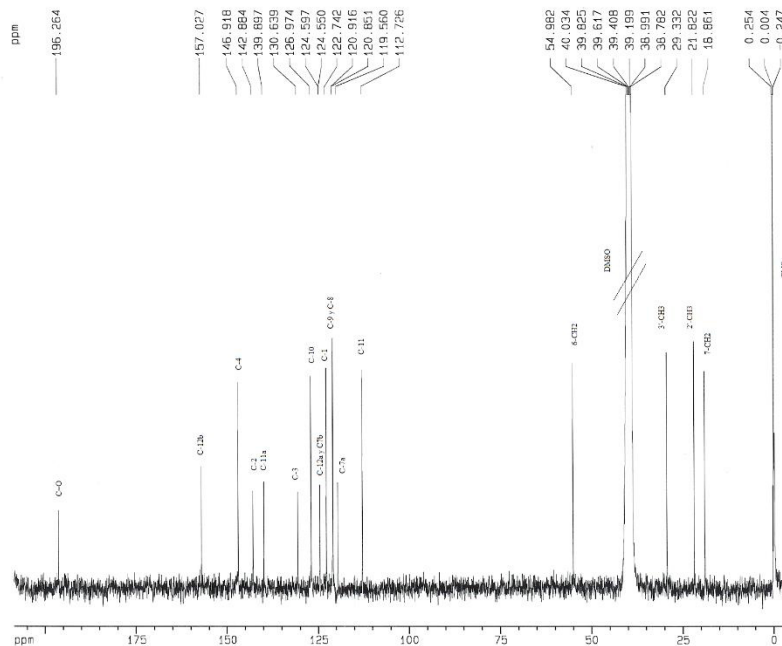


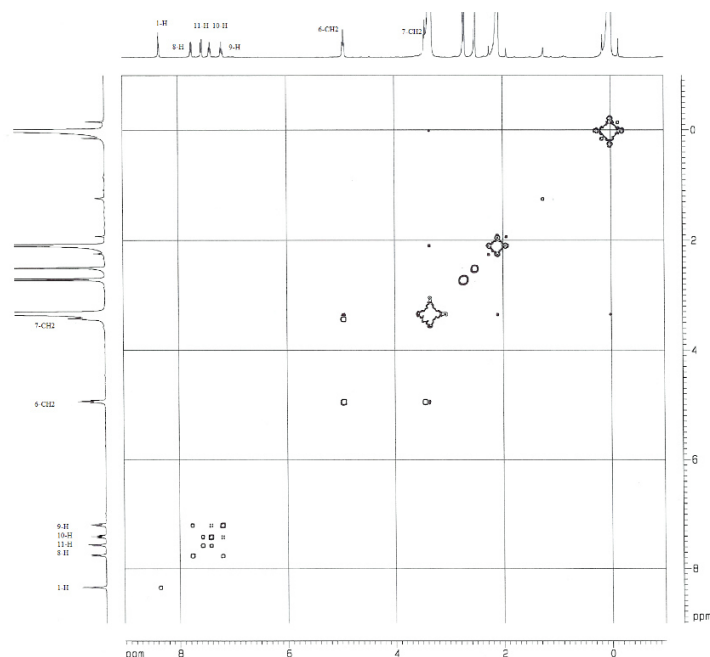
Figura 19. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN.



**Figura 20.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

### 5.4.3 Experimento COSY (Correlation Spectroscopy)

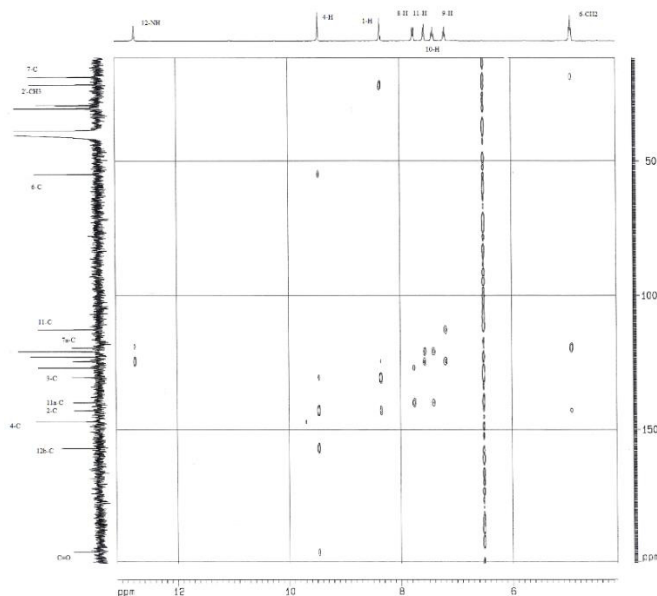
La Espectroscopia de Correlación es una técnica de dos dimensiones homonuclear que es usada para correlacionar el desplazamiento químico de los núcleos de  $^1\text{H}$ , los cuales están acoplados unos a otros. Los espectros COSY son producto de los primeros experimentos de RMN de dos dimensiones desarrollados en forma rutinaria. Una diagonal parte de la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha del espectro. Aquellos hidrógenos que se acoplen entre sí mostrarán señales en forma de círculos localizadas simétricamente a ambos lados de la diagonal.



**Figura 21.** Espectro de COSY.

#### 5.4.4 Experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy)

La Espectroscopia de Correlación Heteronuclear de Múltiple Unión es una herramienta adecuada para determinar la conectividad  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  de largo alcance. Una de las grandes ventajas del experimento HMBC es que posee una gran sensibilidad. En HMBC tenemos el espectro monodimensional de  $^1\text{H}$ -RMN en la parte superior y el espectro de  $^{13}\text{C}$  en el lado izquierdo. Los elipsoides representan la intersección de átomos de hidrógeno con átomos de carbono con los cuales están separados por 2 ó 3 enlaces, es decir no se encuentra unidos directamente a él sino a su átomo de carbono vecino o al subsiguiente. Esta técnica nos permite por lo tanto identificar perfectamente las señales de átomos de carbono cuaternarios.



**Figura 22.** Espectro de HMBC.

### 5.5 Determinación de punto de fusión

El punto de fusión de un sólido se define como la temperatura a la cual las fases sólidas y líquidas están en equilibrio. Ésta característica física se reporta como un intervalo de temperatura, es decir la temperatura a la cual se empieza a observar el primer indicio de fusión y la temperatura a la cual desaparece el último cristal. Por lo que la temperatura, como el intervalo de temperaturas de un punto de fusión observado son datos importantes que reflejan la pureza de una muestra, ya que el intervalo del punto de fusión debe disminuir y el punto de fusión debe aumentar, en tanto se van eliminando las impurezas en las sucesivas etapas de purificación (Pasto y Johnson, 1974)

Para la lectura del punto de fusión se empleó un equipo Electrothermal 9100 (Electrothermal Engineering Ltd., Southend on Sea, Essex, UK) y se usaron capilares sellados en los cuales se depositó la muestra sólida. Cada una de las lecturas se realizó por triplicado para tener un punto de fusión representativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Recolección de las plantas e identificación

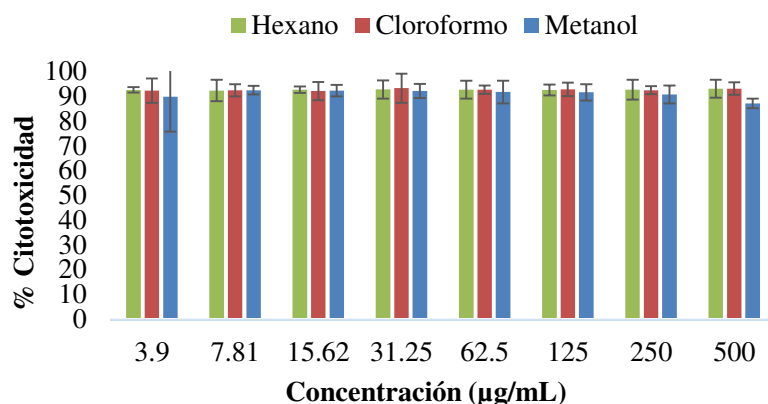
*Pachycereus marginatus* fue comercialmente adquirido en el Mercado Juárez, en el centro de Monterrey, mientras que *Ibervillea sonora* fue colectada en terrenos del municipio de Ahome, estado de Sinaloa. Ambas plantas fueron debidamente identificadas por personal del departamento de botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y un ejemplar de cada una fue depositado en el herbario de la misma institución (*P. marginatus* No. voucher 025588; *I. sonora* No. voucher 025589).

### 6.2 Pachycereus marginatus

#### 6.2.1 Extracción consecutiva de *Pachycereus marginatus*

Para la extracción consecutiva de *P. marginatus* se utilizaron 334 g de material vegetal, y 600 mL de cada solvente (*n*-hexano, cloroformo, metanol). La extracción se llevó a cabo continuamente durante 40 h por cada solvente. Los extractos obtenidos se concentraron bajo presión reducida. Sus pesos y rendimientos fueron los siguientes: hexano, 11.6 g (3.46 %); cloroformo, 11.4 g (3.4 %); metanol, 23.1 g (6.9 %).

Todos los extractos fueron sometidos a pruebas biológicas contra la línea L5178Y-R. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente gráfica (Figura 23):



**Figura 23.** Porcentaje de citotoxicidad de los extractos crudos de *P. marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

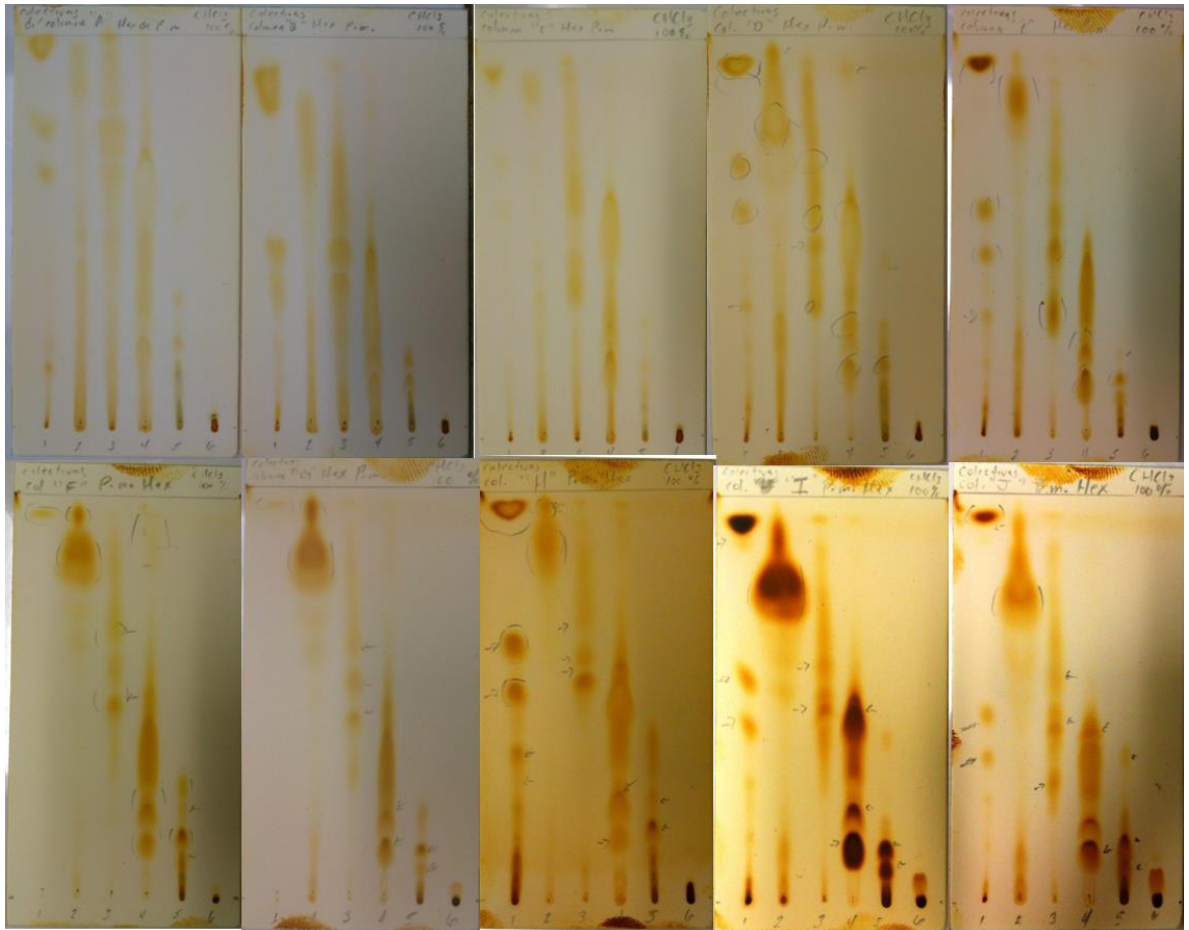
Debido a que todos los extractos crudos de *P. marginatus* demostraron actividad sobresaliente sobre la línea de cáncer murino, se decidió realizar un fraccionamiento biodirigido con el fin de aislar las sustancias responsables de tal actividad, comenzando con el extracto hexánico.

#### 6.2.1.1 Fraccionamiento del extracto hexánico de *P. marginatus*

##### 6.2.1.1.1 Columnas 1-10 del extracto hexánico

De los 11.6 g del extracto original se tomaron 10 g (el resto se reservó para futuros análisis) y se repartieron en 10 columnas cromatográficas (1 g en cada columna) con 20 g de sílica gel. A continuación, se describen los detalles técnicos aplicados a todas éstas columnas:

1 g del extracto hexánico se disolvió en una pequeña cantidad de hexano para ser aplicada en la columna. El gradiente de elución fue el siguiente: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL), cloroformo-EtOAc (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL) y EtOAc-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL). Se colectaron un total de 155 fracciones de 10 mL de volumen cada una. Las fracciones se analizaron en CCF y en base al comportamiento de las manchas observadas se agruparon las fracciones comunes, llamadas fracciones colectivas (FC; Figura 24) que, a su vez, se mezclaron con las FC comunes de las demás columnas (llamadas fracciones súper colectivas, FSC). Las FSC también se analizaron en CCF (figura 25). Los pesos y rendimientos de las FSC se muestran en la tabla 3.

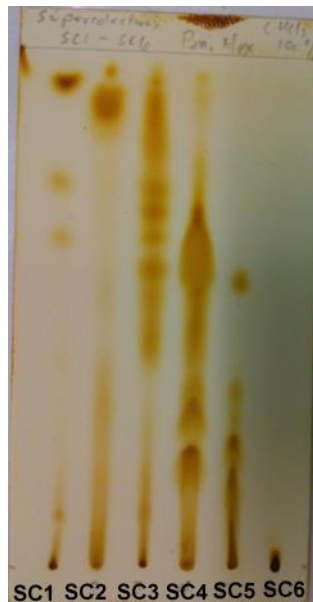


**Figura 24.** CCF de las FC de las 10 columnas del extracto hexánico de *P. marginatus*. Eluente empleado:  $\text{CHCl}_3$  al 100% (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.



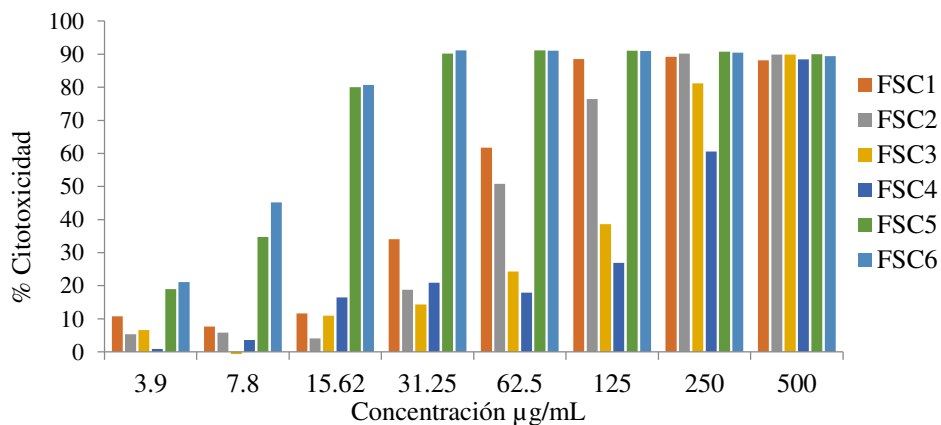
**Tabla 3.** Rendimientos de las FC de las columnas 1-10

FSC	Peso
1	43.8 mg
2	789.5 mg
3	77.5 mg
4	621 mg
5	1.01 g
6	1.57 g



**Figura 25.** CCF de las FSC del extracto hexánico de *P. marginatus*. Eluente empleado: CHCl<sub>3</sub> al 100% (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Se evaluó la actividad citotóxica de todas las FSC obtenidas del extracto hexánico de *P. marginatus*. Los resultados se expresan a continuación a manera de gráfica (Figura 26):



**Figura 26.** Porcentaje de citotoxicidad de las FSC del extracto hexánico de *Pachycereus marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

Todas las FSC exhibieron cierta actividad citotóxica, siendo la FSC5 y FSC6 las más activas; ambas con 80% desde 15.62 µg/mL y siguiendo una curva dosis-respuesta. Por bajo rendimiento, baja citotoxicidad y/o complejidad en su composición las FSC1 y FSC3 se descartaron para continuar con el fraccionamiento biodirigido. Las FSC2, 4, 5 y 6 se siguieron sometiendo a dicho proceso de purificación.

#### 6.2.1.1.2 Cristalización de la FSC2 (de columnas 1-10)

El proceso de cristalización se llevó a cabo siguiendo la metodología previamente descrita en la sección 5.2.4. 780 mg de la FSC2 (una porción se había utilizado en las pruebas biológicas) se sometieron a éste proceso. Se consiguió recuperar un sólido blanco, amorfo (59 mg), mismo que reveló actividad citotóxica sobre el linfoma (56 % a 31.25 µg/mL) sin embargo, éste sólido no se pudo visualizar en CCF y no se volvió a trabajar con el mismo. Las aguas madres (aprox. 500 mg) se sometieron a una separación cromatográfica en columna de sílica gel.

#### 6.2.1.1.3 Columna 11. Fraccionamiento de las aguas madres de la FSC2

Las aguas madres (500 mg) se sometieron a una cromatografía en columna de sílica gel con las siguientes características: 10 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 30 mL), cloroformo-EtOAc (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 30 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (100 mL). Se colectaron un total de 211 fracciones, 210 de 3

mL, y 1 de 100 mL de volumen (en cada gradiente se recolectaron 10 fracciones). Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 4). Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar la distribución de las manchas y su pureza (figura 27).

**Tabla 4.** Rendimientos de las FC de la columna 11.

FC	Fracciones mezcladas	Peso
1	1-17	35 mg
2	18-28	7 mg
3	29-57	8 mg
4	58-119	42 mg
5	120-211	140 mg



**Figura 27.** CCF de FC de la columna 11. Eluente:  $\text{CHCl}_3$  100% (10 mL). Revelador: Iodo sublimado.

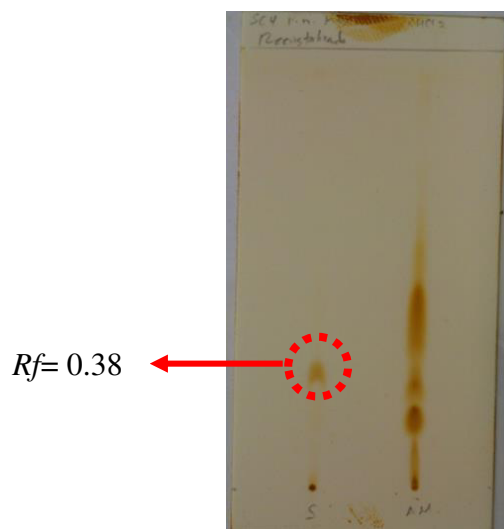
Por escaso rendimiento y/o baja solubilidad, las FC de la columna 11 no fueron sometidas a ningún experimento posterior.

#### 6.2.1.1.4 Cristalización de la FSC4 (de columnas 1-10).

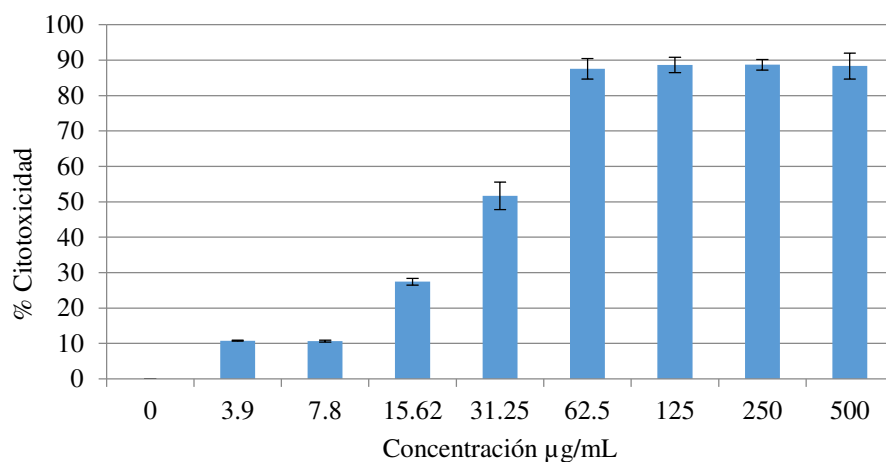
##### Obtención del compuesto **Pm-C1**

De los 621 mg obtenidos originalmente, 497 mg de la FSC4 se sometieron a éste proceso. Las aguas madres, mismas que presentaban una coloración amarilla, se decantaron y el sólido fue recuperado mecánicamente, obteniendo 43 mg del mismo. A este sólido con P.f. = 78.1 °C y  $R_f = 0.38$  (ver figura 28) se le denominó **Pm-C1**. Su

actividad contra la línea L5178Y-R fue evaluada (figura 29). Se decidieron someter las aguas madres a un fraccionamiento en columna de sílica gel.



**Figura 28.** CCF del sólido Pm-C1 (aplicación izquierda) con sus aguas madres (aplicación derecha) Eluyente:  $\text{CHCl}_3$  100% (10 mL). Revelador: Iodo sublimado



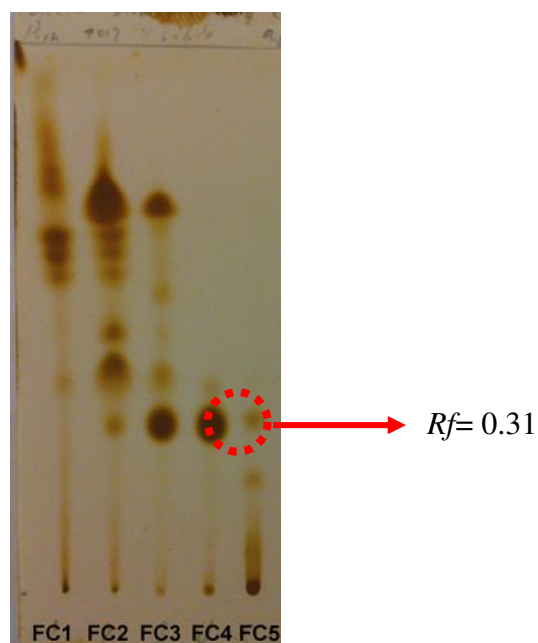
**Figura 29.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C1 de *Pachycereus marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

### 6.2.1.1.5 Columna 12. Fraccionamiento de las aguas madres de la FSC4

Las aguas madres del experimento de cristalización de FSC4 (316 mg) se sometieron a una cromatografía en columna empacada con 10 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 30 mL), cloroformo-EtOAc (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 30 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (100 mL). Se colectaron un total de 211 fracciones, 210 de 3 ML, y 1 de 100 mL de volumen (en cada gradiente se recolectaron 10 fracciones). Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 5). Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar la distribución de las manchas y su pureza (figura 30).

**Tabla 5.** Rendimientos de las FC de la columna 12.

FC	Fracciones mezcladas	Peso
1	1-86	18 mg
2	87-100	76 mg
3	101-121	160 mg
4	122, 123	17 mg
5	124-210	22 mg



**Figura 30.** CCF de las FC de la columna 12. Eluyente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9.8:0.8 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Debido a que la fracción FC3 presentaba un compuesto principal con un  $R_f$  de 0.31 (CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9.8:0.8) a una concentración adecuada, se decidió someter dicha fracción a una columna cromatográfica adicional.

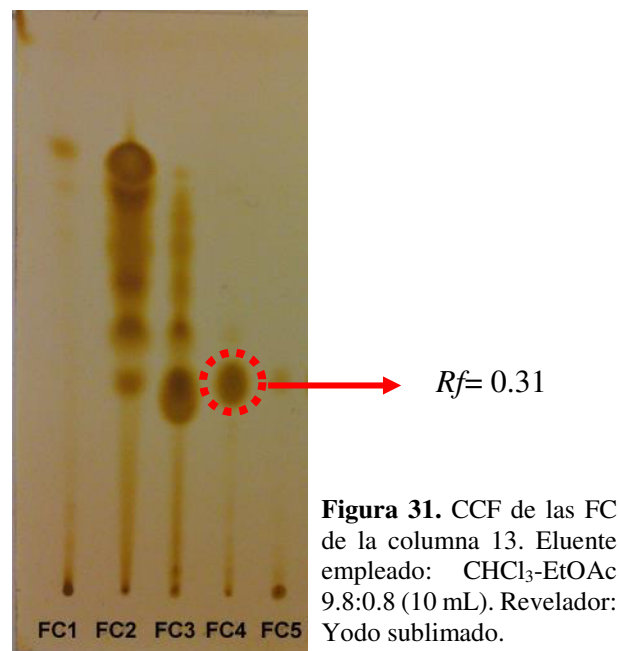
#### 6.2.1.1.6 Columna 13. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 12 y aislamiento del compuesto **Pm-C2**.

La totalidad de la FC3 (160 mg) fue sometida a una columna cromatográfica en sílica gel con las siguientes características:

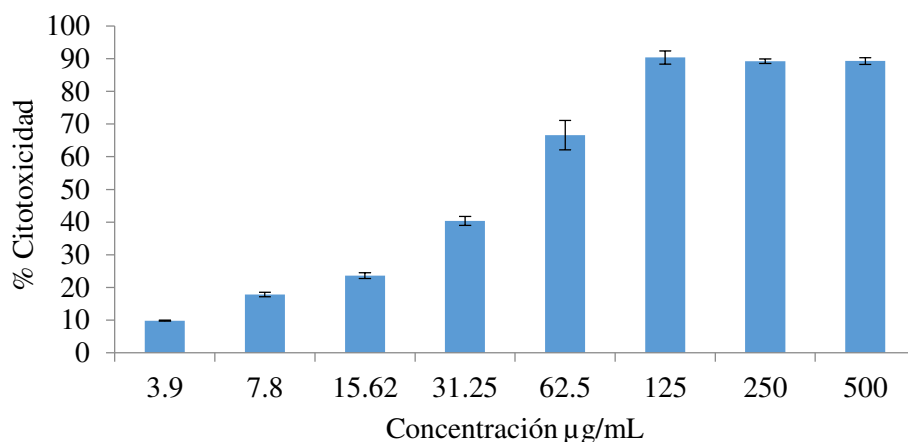
8 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 v/v; cada uno de 20 mL). Se colectaron un total de 70 fracciones de 2 mL de volumen cada una (únicamente en el gradiente 90:10 se decidió coleccionar en fracciones de 1 mL). Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 6). Además, una CCF de las FC fue realizada para evaluar la distribución de las manchas y su pureza (figura 31).

**Tabla 6.** Rendimientos de las FC de la columna 13.

FC	Fracciones	Peso
1	1-26	8 mg
2	27-29	48 mg
3	30-34	31 mg
4	35-47	65 mg
5	48-70	6 mg



De la fracción FC4 se apreció una mancha con un  $R_f$  de 0.31 ( $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9.8:0.8). Este compuesto (polvo amorfo, ligeramente amarillo y punto de fusión de 130.1 °C) fue sometido a una evaluación citotóxica (figura 32). Se denominó como **Pm-C2**. Debido a que aún presentaba ciertas impurezas, el análisis espectroscópico al que se le sometió no fue del todo claro, sin embargo, este mismo compuesto se consiguió aislar en fraccionamientos posteriores con una mayor pureza y, analizando los datos espectroscópicos de ambas sustancias, se logró identificar su estructura química.



**Figura 32.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C2 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

#### 6.2.1.1.7 Columna 14. Fraccionamiento cromatográfico de la FSC5 (de columnas 1-10).

La FSC5 (1.01 g) fue sometida a una cromatografía en columna de sílica gel con las siguientes características:

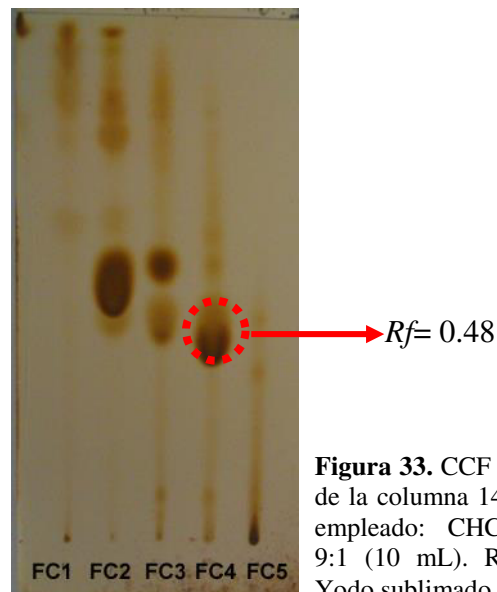
20 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL), cloroformo-EtOAc (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL). Se colectaron un total de 110 fracciones de 10 mL de volumen cada una, y 1 fracción de 50 mL (en cada gradiente se recolectaron 5 fracciones). Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 7).



Además, una CCF de las FC fue realizada para evaluar la distribución de las manchas y su pureza (figura 33)

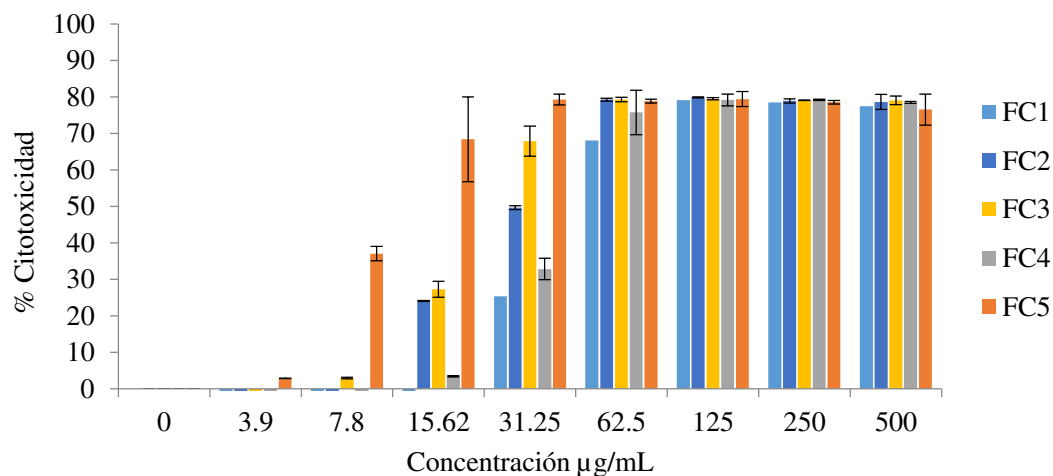
**Tabla 7.** Rendimientos de las FC de la columna 14.

FC	Fracciones	Peso
1	1-49	19.8 mg
2	50-59	168 mg
3	60	107 mg
4	61-63	251 mg
5	64-111	405 mg



**Figura 33.** CCF de las FC de la columna 14. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Posteriormente, las 5 FC fueron evaluadas contra el linfoma L5178Y-R (figura 34)



**Figura 34.** Porcentaje de citotoxicidad de las FC de la columna 14 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

En la FC2 de la columna 14 se logró apreciar un compuesto mayoritario con un  $R_f$  de 0.48 (CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1) y con una actividad citotóxica notable desde los 31.25 µg/mL (ver figura 34). A fin de purificar ésta fracción se decidió someterla nuevamente a una cromatografía en columna de sílica gel.

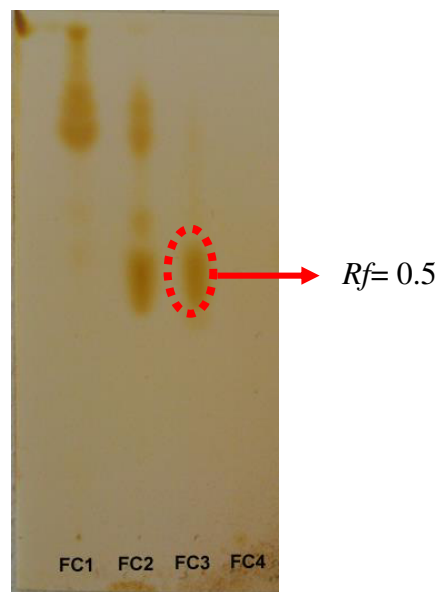
#### 6.2.1.1.8 Columna 15. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 14 y aislamiento del compuesto **Pm-C3**.

La FC2 de la columna 14 fue sometida a un fraccionamiento en columna de sílica gel con las siguientes características:

10 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 v/v; cada uno de 25 mL), seguido de un lavado con 25 mL de EtOAc y finalmente con 25 mL de metanol. Se colectaron un total de 27 fracciones; 25 de 5 mL y 2 de 50 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 35) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 4 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 8).

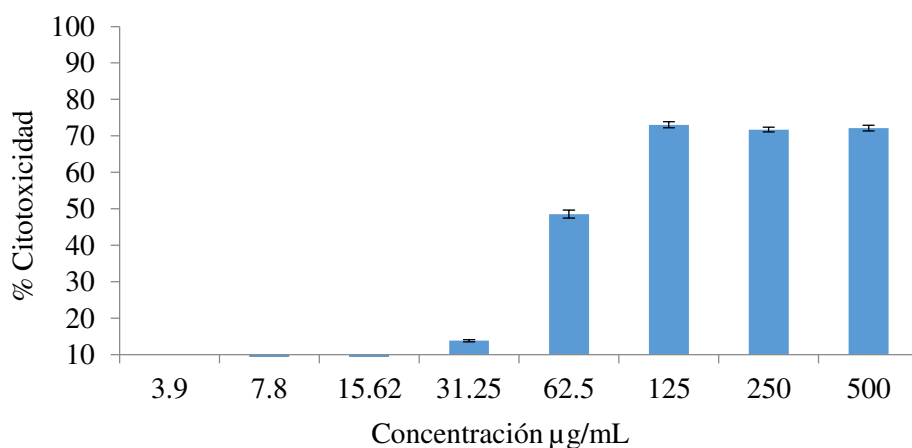
**Tabla 8.** Rendimientos de las FC de la columna 15.

FC	Fracciones	Peso
1	1-17	28 mg
2	18-21	25 mg
3	22-25	96 mg
4	26, 27	10.2 mg

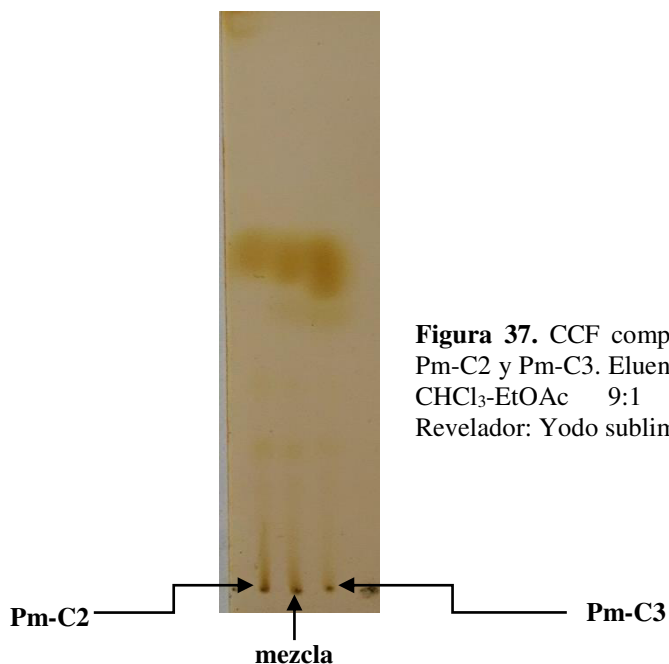


**Figura 35.** CCF de las FC de la columna 15. Eluyente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

La FC3 de la columna 15, de  $R_f = 0.5$  (CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1) se encontraba en suficiente cantidad para evaluar su citotoxicidad contra la línea L5178Y-R (figura 36) y en una pureza adecuada para someterla a un análisis espectroscópico. El polvo blanco amorfo con punto de fusión de 146.9 °C se denominó como **Pm-C3**. Como se mencionó anteriormente, esta substancia es la misma que **Pm-C2**, pero con una pureza mayor. Esto se corroboró al comparar ambos sólidos en CCF (figura 37).



**Figura 36.** Porcentaje de citotoxicidad de Pm-C3 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).



**Figura 37.** CCF comparativa entre Pm-C2 y Pm-C3. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

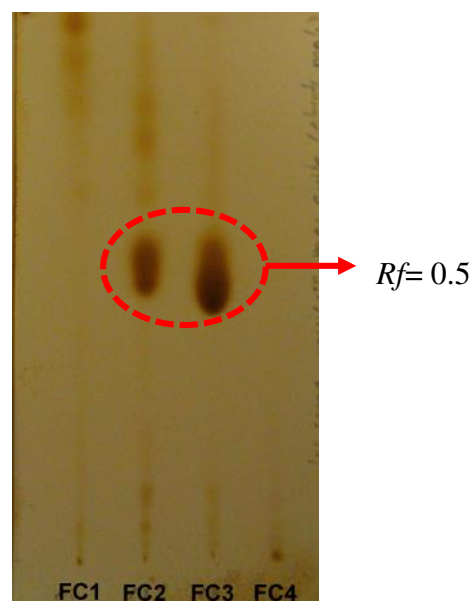
#### 6.2.1.1.9 Columna 16. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la columna 14.

Debido a que la FC4 de la columna 14 se encontraba en suficiente cantidad y su citotoxicidad fue importante (32.8 % a partir de 31.25  $\mu\text{g/mL}$ ; ver figura 34), esta fue sometida a un fraccionamiento en columna de sílica gel con las siguientes características:

10 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 v/v; cada uno de 25 mL) y, finalmente, un lavado con EtOAc y metanol al 100% (25 mL c/u). Se colectaron un total de 27 fracciones; 25 de 5 mL y 2 de 25mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 38) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 4 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 9).

**Tabla 9.** Rendimientos de las FC de la columna 16.

FC	Fracciones	Peso
1	1-13	9 mg
2	14 y 15	46 mg
3	16-20	114 mg
4	21-27	56 mg



**Figura 38.** CCF de las FC de la columna 16. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Por poseer un compuesto mayoritario ( $R_f$  de 0.5;  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1) y un buen rendimiento, se decidió seguir purificando las fracciones FC2 y FC3. Las fracciones FC1 y FC4 se descartaron por tener bajo rendimiento y ningún compuesto mayoritario a aislar.

#### 6.2.1.1.10 Columna 17. Fraccionamiento de la FC2 de la columna 16 y asilamiento del compuesto **Pm-C4**

46 mg de la FC2 de la columna 16 fueron fraccionados en una columna pequeña de sílica gel con las siguientes características:

5 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 95:5, 90:10 v/v; cada uno de 15 mL) y, finalmente, un lavado con EtOAc 100% (25 mL). Se colectaron un total de 31 fracciones; 30 de 1.5 mL y 1 de 25 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 39) y en base al desplazamiento de sus manchas se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 4 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 10).

**Tabla 10.** Rendimientos de las FC de la columna 17.

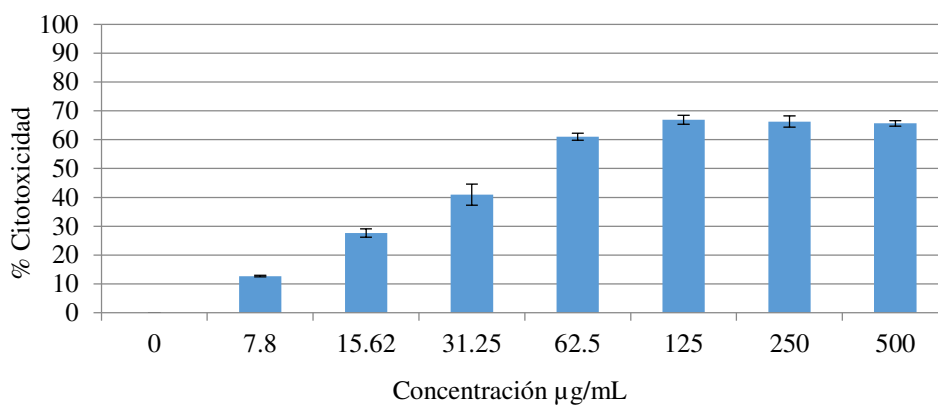
FC	Fracciones	Peso
1	1-22	7.4 mg
2	23-30	14.8 mg
3	31	13.6 mg



**Figura 39.** CCF de las FC de la columna 17. Eluyente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: CoCl<sub>2</sub>.

En base a la CCF de la figura 39, se determinó que la FC1 Y FC2 son la misma substancia, pero por su rendimiento se decidió seguir trabajando sólo con la FC2; su pureza fue la

adecuada para someterse a análisis espectroscópicos, así que se le asignó la clave **Pm-C4**. Además, la actividad citotóxica de Pm-C4 fue evaluada contra el linfoma L5178Y-R (figura 40).



**Figura 40.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C4 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

#### 6.2.1.1.11 Columna 18. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 16 y aislamiento del compuesto **Pm-C5**.

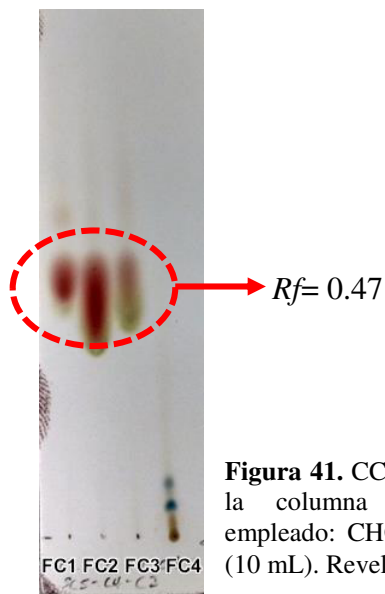
Los 114 mg de la FC3 de la columna 16 fueron sometidos a un fraccionamiento en columna de sílica gel bajo las siguientes características:

8 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, v/v; cada uno de 20 mL) y, finalmente un lavado con 50 mL de EtOAc al 100%. Se colectaron un total de 33 fracciones; 12 de 5 mL, 20 de 2 mL y 1 de 50 mL. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de

sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se colectaron 4 FC (figura 41) y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 11).

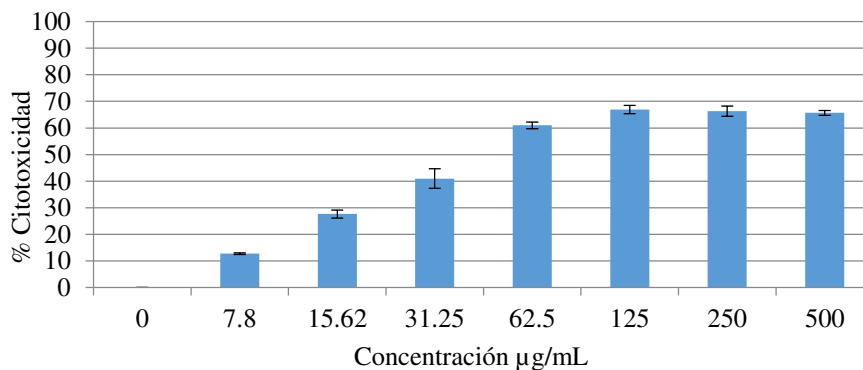
**Tabla 11.** Rendimientos de las FC de la columna 18.

FC	Fracciones	Peso
1	1-10	13.6 mg
2	11-12	51 mg
3	13-16	9.5 mg
4	17-33	26 mg



**Figura 41.** CCF de las FC de la columna 18. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador:  $\text{CoCl}_2$ .

Las primeras tres fracciones, FC1-FC3, contienen el mismo compuesto mayoritario de  $R_f$  0.47 ( $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1), empero, se decidió trabajar con la FC1 ya que presentaba menos impurezas que el resto de las fracciones. Esta fracción se sometió a pruebas biológicas contra la línea L5178Y-R (figura 42), así como a análisis espectroscópicos. El polvo blanco amorfo se denominó como **Pm-C5**.



**Figura 42.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Pm-C5 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).



6.2.1.1.12 Columna 19. Primer fraccionamiento cromatográfico de la FSC6 (de columnas 1-10)

Debido a que la FC6 del extracto crudo hexánico reveló una citotoxicidad sobresaliente (aproximadamente 80% desde 15.62  $\mu\text{g/mL}$ ) se decidió continuar su purificación a miras de aislar la o las sustancias responsables de tal actividad. Los 1.57 g se dividieron en dos partes (1 g y 0.6 g) para ser fraccionadas en dos columnas diferentes. El primer gramo se sometió a una cromatografía en columna de sílica gel bajo las siguientes condiciones:

20 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80: 10:90: 0:100 v/v; cada uno de 50 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL). Se colectaron un total de 55 fracciones de 10 mL de volumen c/u y una fracción de 50 mL de volumen. Todas estas fueron analizadas en CCF (figura 43) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 4 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 12).

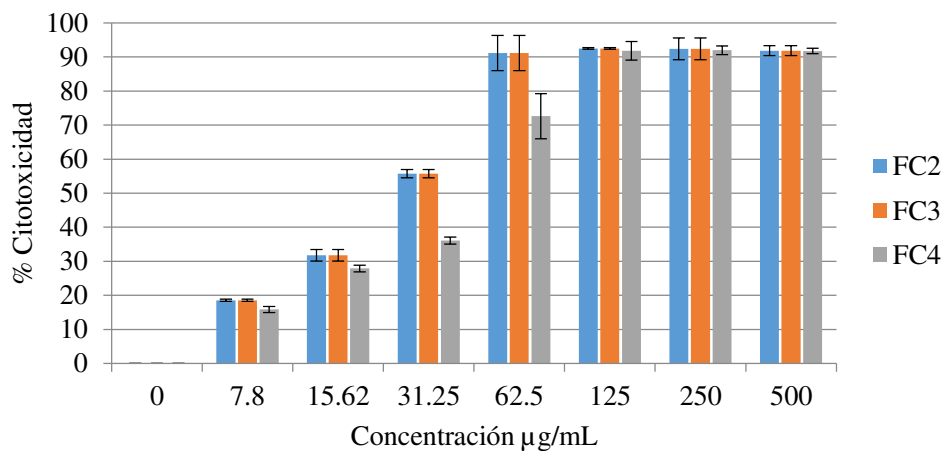
**Tabla 12.** Rendimientos de las FC de la columna 19.

FC	Fracciones	Peso
1	1-17	18.8 mg
2	18-20	35 mg
3	21-30	175 mg
4	31-56	352 mg



**Figura 43.** CCF de las FC de la columna 19. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Por baja solubilidad en el medio utilizado en las pruebas biológicas, la FC1 de la columna 19 no fue sometida a evaluación citotóxica; el resto de las FC sí fueron evaluadas contra la línea celular (figura 44).



**Figura 44.** Porcentaje de citotoxicidad de las FC2-4 de la columna 19 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar. Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

Ante la similitud de la FC2 y FC3 en la CCF (figura 43) y a que el porcentaje de actividad citotóxica de ambas fue el mismo, se decidió mezclarlas y purificarlas en una nueva columna cromatográfica de SiO<sub>2</sub>.

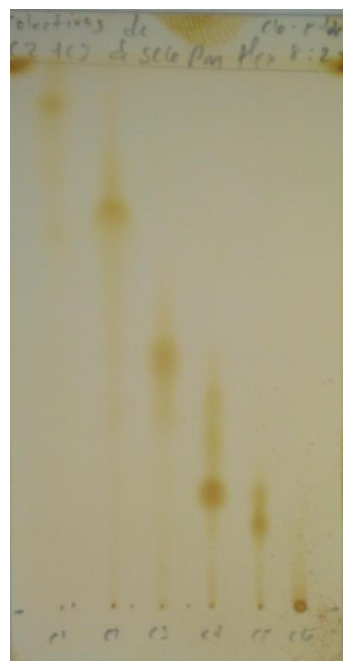
#### 6.2.1.1.13 Columna 20. Fraccionamiento conjunto de la FC2 y FC3 de la columna 19.

Como se mencionó anteriormente, la FC2 y FC3 de la columna 20 se mezclaron entre sí (aprox. 200 mg) y se fraccionaron en una columna de sílica gel con las siguientes características:

8 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (80:20, 75:25, 70:30; 65:35, 50:50, 0:100 v/v; cada uno de 20 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL) para arrastrar las sustancias más polares que se hayan retenido en la fase estacionaria. Se colectaron un total de 25 fracciones; 24 de 5 mL de volumen c/u y 1 de 50 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 45) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 6 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 13).

**Tabla 13.** Rendimientos de las FC de la columna 20.

FC	Fracciones	Peso
1	1-3	5.6 mg
2	4-6	29 mg
3	7, 8	9.3 mg
4	9-14	31 mg
5	15-18	9.6 mg
6	19-25	99 mg



**Figura 45.** CCF de las FC de la columna 19. Eluente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Debido a los bajos rendimientos de estas últimas fracciones, no fue posible seguir trabajando con ellas, es por esta causa que se decidió seguir purificando el resto de la

FSC6 de las columnas 1-10 y así obtener la cantidad suficiente de sustancias para las pruebas biológicas y espectroscópicas.

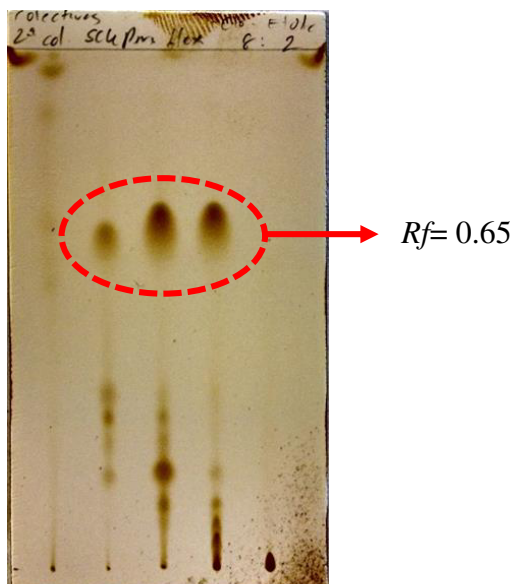
#### 6.2.1.1.14 Columna 21. Segundo fraccionamiento cromatográfico de la FSC6 (de columnas 1-10)

Los 600 mg restantes de la SC6 se sometieron a un fraccionamiento en columna de sílica gel bajo las siguientes condiciones:

20 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 v/v; cada uno de 50 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL). Se colectaron un total de 31 fracciones; 30 de 10 mL y 1 de 50 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 346 y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 14).

**Tabla 14.** Rendimientos de las FC de la columna 21.

FC	Fracciones	Peso
1	1-12	17.3 mg
2	13-18	36.7 mg
3	19-25	79 mg
4	26-30	108.3 mg
5	31	340.5 mg



**Figura 46.** CCF de las FC de la columna 21. Eluyente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

Las fracciones FC2, FC3 y FC4 de la columna 21 presentaron un compuesto mayoritario a  $R_f = 0.65$  ( $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 8:2), no obstante, como la FC3 además presentaba otro compuesto en buena proporción con un  $R_f$  de 0.18 ( $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 8:2), se decidió someter solamente la fracción FC3 a una cromatografía en columna adicional para tratar de aislar éstos dos compuestos.

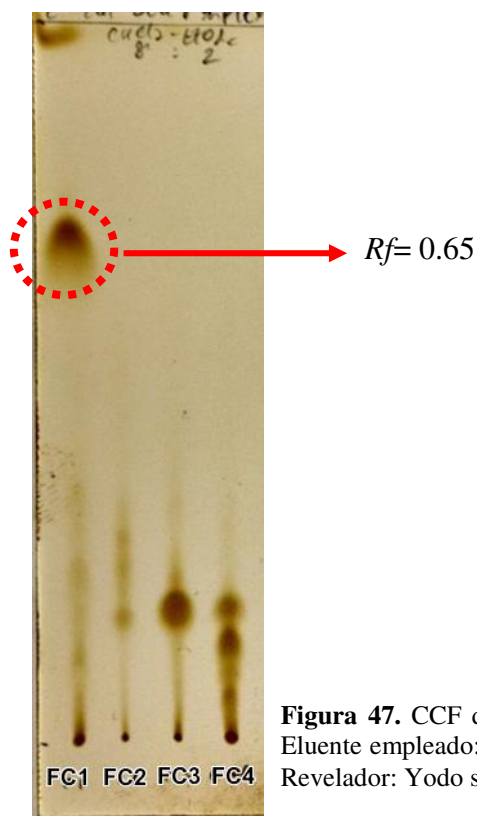
#### 6.2.1.1.15 Columna 22. Fraccionamiento cromatográfico de la FC3 de la columna 21

Los 79 mg de la FC3 de la columna 21 fueron empleados en una columna cromatográfica de sílica gel con las siguientes características:

8 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 v/v; cada uno de 50 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL). Se colectaron un total de 51 fracciones; 50 de 5 mL y 1 de 50 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (figura 47) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 4 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 15).

**Tabla 15.** Rendimientos de las FC de la columna 22.

<b>FC</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Peso</b>
1	1-21	37.1 mg
2	22-37	6 mg
3	38-44	8.7 mg
4	45-51	17.3 mg



**Figura 47.** CCF de las FC de la columna 22.  
Eluente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL).  
Revelador: Yodo sublimado.

El compuesto de  $R_f$  mayor (0.65; CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1), presente en la FC1, aún no se encontraba con la pureza adecuada así que se decidió seguir purificándolo mediante otra columna de sílica. Por otra parte, el compuesto de  $R_f$  menor (0.18; CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 8:2), presente en la FC3, aunque en apariencia poseía una buena pureza, se descartó para seguir trabajando debido a su bajo rendimiento.

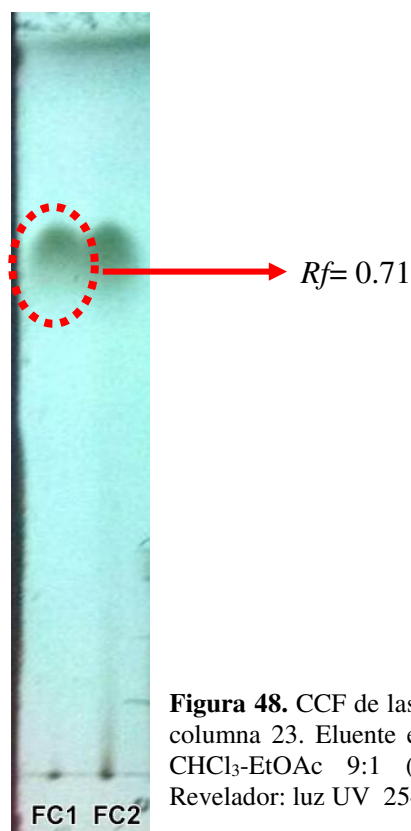
#### 6.2.1.16 Columna 23. Fraccionamiento cromatográfico de la FC1 de la columna 22 y aislamiento del compuesto **Pm-C6**.

Los 37.1 mg de la FC1 de la columna 22 fueron fraccionados en columna cromatográfica de sílica gel bajo las siguientes condiciones: 5 g de sílica. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35,

60:40 v/v; cada uno de 15 mL) y, finalmente, un lavado con metanol al 100% (50 mL). Se colectaron un total de 36 fracciones; 35 de 3 mL y 1 de 50 mL de volumen. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF (Figura 48) y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 2 FC y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 16).

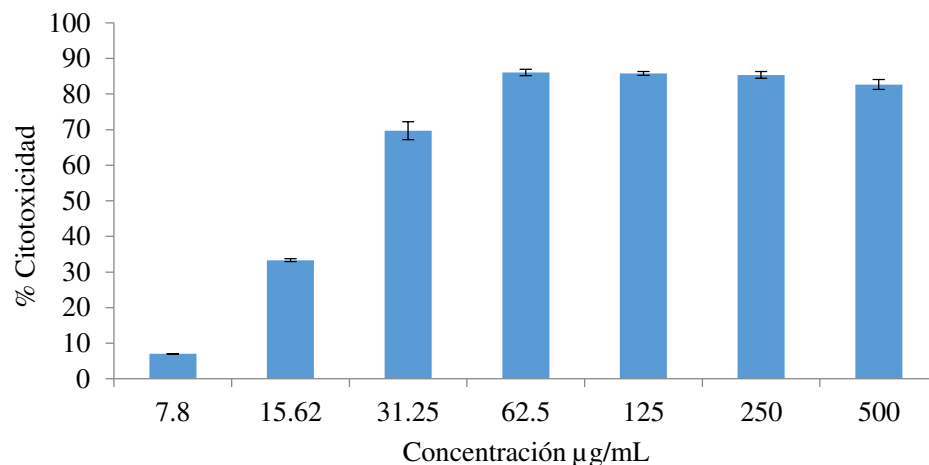
**Tabla 16.** Rendimientos de las FC de la columna 23.

FC	Fracciones	Peso
1	1-34	15.8 mg
2	35,36	17.8 mg



**Figura 48.** CCF de las FC de la columna 23. Eluyente empleado: CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1 (10 mL). Revelador: luz UV 254/ 366 nm

Como se puede apreciar en la figura 48, la FC1 presenta una mayor pureza que la FC2 al no tener tantas impurezas polares. Por esta razón, se concluyó que la FC1, de  $R_f = 0.71$  (CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 9:1), era de suficiente pureza y rendimiento para someterla a pruebas biológicas (figura 49), así como a análisis espectroscópicos. El compuesto obtenido como polvo amorfo blanco fue denominado **Pm-C6**.



**Figura 49.** Porcentaje de citotoxicidad de Pm-C6 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

#### 6.2.1.2 Fraccionamiento del extracto clorofórmico.

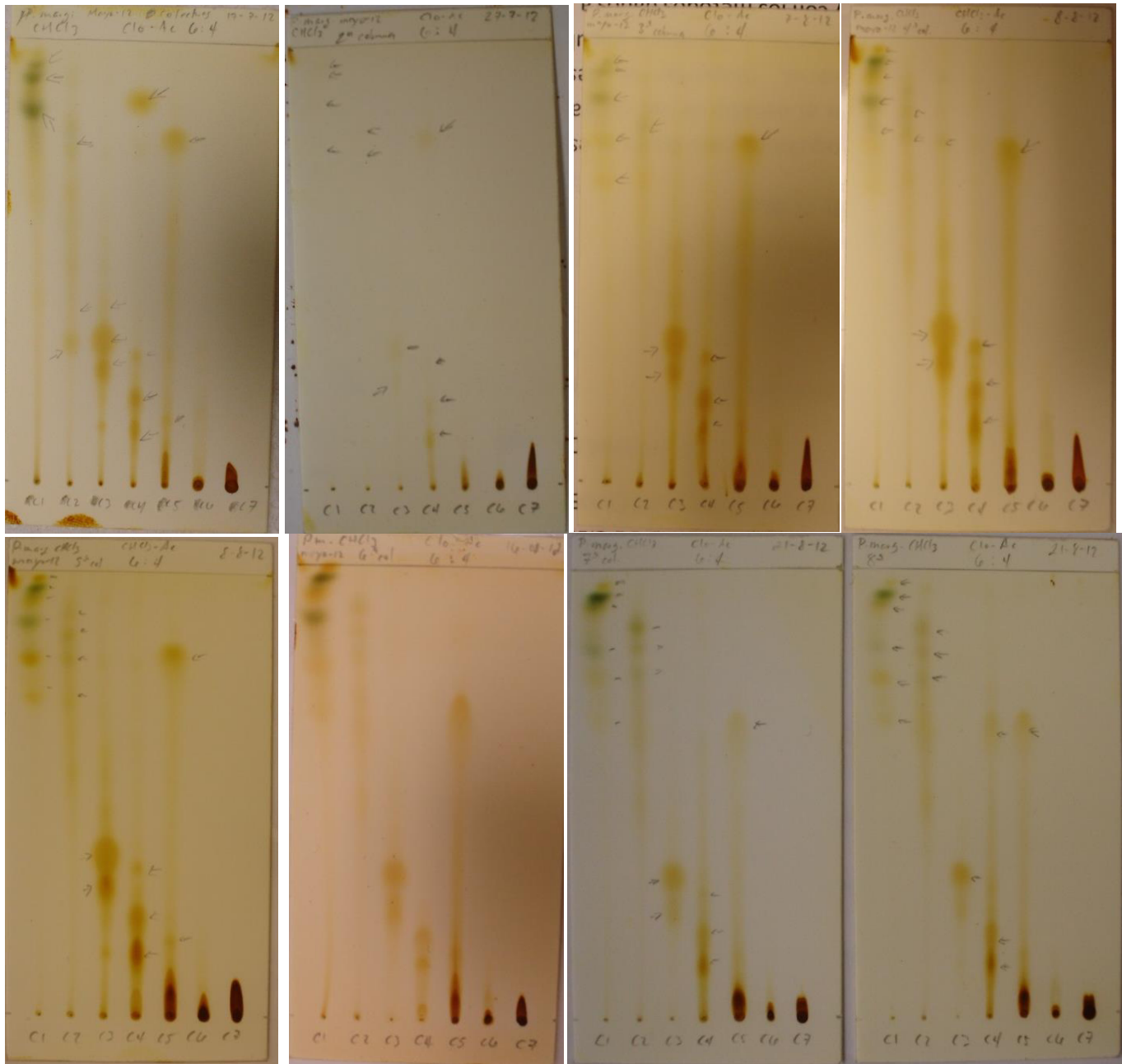
##### 6.2.1.2.1 Columnas 24-31. Fraccionamiento cromatográfico del extracto clorofórmico.

Los 11.43 g del extracto original se repartieron en 8 columnas cromatográficas (aprox. 1.4 g en cada columna), cada una con 20 g de sílica gel como fase estacionaria. A continuación, se describen los detalles técnicos aplicados a todas éstas columnas:

La porción correspondiente del extracto clorofórmico se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna. El gradiente de elución fue el siguiente: cloroformo-EtOAc (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL), EtOAc-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 mL). Se colectaron un total de 105 fracciones de 10 mL de volumen cada una. Las fracciones se analizaron en CCF y



en base al comportamiento de las manchas observadas se agruparon las fracciones comunes, llamadas fracciones colectivas (FC; Figura 50) que, a su vez, se mezclaron con las FC comunes de las demás columnas (llamadas fracciones súper colectivas, FSC). Las FSC también se analizaron en CCF (figura 51). Los pesos y rendimientos de las FSC del



**Figura 50.** CCF de las FC de las 8 columnas del extracto clorofórmico de *P. marginatus*. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 6:4 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

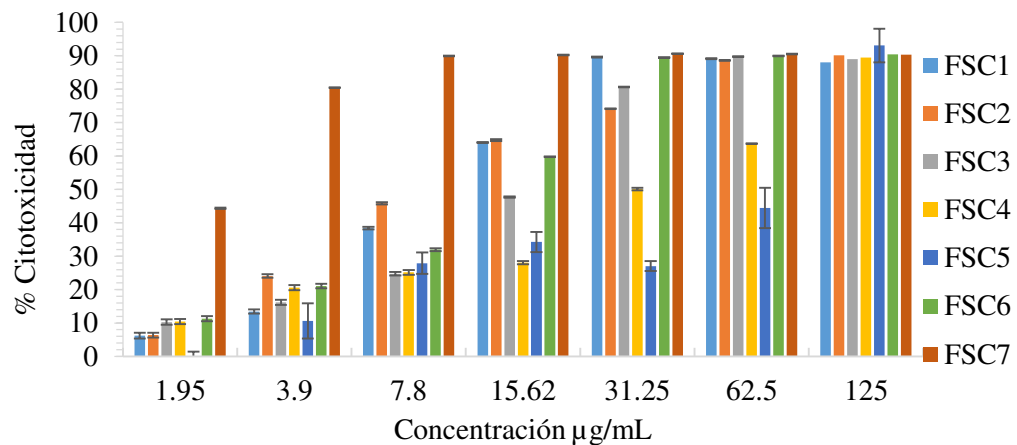
**Tabla 17.** Rendimientos de las FSC de las columnas 24-31.

FSC	Peso
1	106 mg
2	26.9 mg
3	47.8 mg
4	97.5 mg
5	465 mg
6	1.68 g
7	3.7 g



**Figura 51.** CCF de las FSC del extracto clorofórmico de *P. marginatus*. Eluyente empleado:  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 6:4 (10 mL). Revelador: Yodo sublimado.

La actividad biológica contra la línea murina L5178Y-R de estas fracciones se reporta en la siguiente gráfica (figura 52):



**Figura 52.** Porcentaje de citotoxicidad de las FSC del extracto clorofórmico de *Pachycereus marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

A pesar de nuestros esfuerzos, no nos fue posible aislar ninguna sustancia debido a que las FSC 1-4 tuvieron un bajo rendimiento, y las FSC 5-7 fueron demasiado complejas como para aislar un compuesto mayoritario.

#### 6.2.1.3 Extracto metanólico

El extracto metanólico de la extracción consecutiva de *P. marginatus* no fue sometido a ningún proceso cromatográfico, únicamente a evaluación citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R (ver figura 23). Sin embargo, este extracto no fue sometido a fraccionamientos en columnas debido a que su polaridad era muy alta, complicando su purificación.

#### 6.2.2 Extracción no consecutiva de *Pachycereus marginatus*

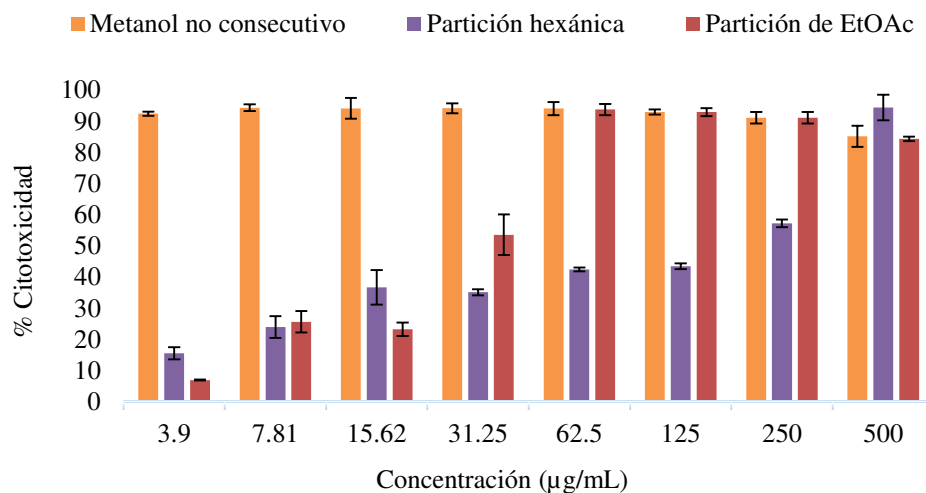
Para la extracción no consecutiva se utilizaron 188 g de *P. marginatus*, además de 600 mL de metanol como solvente de extracción. El proceso se llevó a cabo en un lapso de aproximadamente 40 h continuas. El extracto fue concentrado bajo presión reducida y su rendimiento final fue de 30.4 g (16.2 %)

Este extracto metanólico se sometió a una extracción líquido-líquido basándose en la metodología descrita por Pérez-Castorena, *et al.*, 2006: el extracto total se redisolvió en 200 mL de metanol para posteriormente verterlo dentro de un embudo de separación tipo

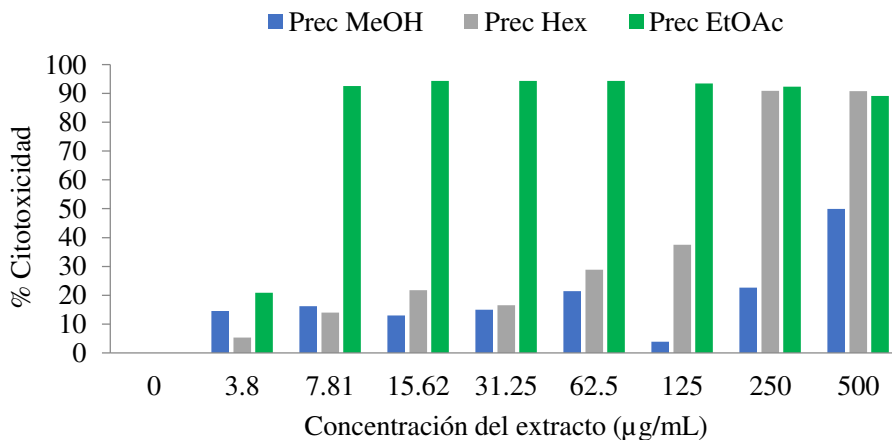
Squib de 500 mL de capacidad. A continuación, se le añadieron 200 mL de hexano y se agitó vigorosamente, dejando escapar el gas acumulado de vez en cuando. Al momento de añadir el hexano se formó instantáneamente un sólido insoluble, mismo que fue removido, secado y etiquetado como precipitado metanólico. El embudo se dejó reposar y se esperó a la formación de las dos fases inmiscibles entre sí. La fase hexánica (fase superior) se separó de la solución metanólica. Este proceso se realizó por triplicado. Finalmente, la fase hexánica se concentró bajo presión reducida y se determinó su peso y rendimiento. Cabe mencionar que durante la concentración de la fase hexánica un sólido se formó, mismo que ya no era soluble en hexano; se le etiquetó como precipitado hexánico.

La fase metanólica recuperada se concentró hasta un volumen aproximado de 50 mL y se disolvió en 150 mL de agua destilada. La solución metanólica-acuosa se transfirió a un embudo de separación tipo Squib de 500 mL de capacidad y se le agregaron 200 mL de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente, se dejó reposar y se esperó a la formación de las fases inmiscibles entre sí. Una vez visualizadas claramente las dos fases, se recuperó la fase de acetato de etilo (fase inferior). Este proceso se realizó por triplicado. La fase metanólico-acuosa se desechó. La fase de acetato de etilo recuperada se concentró para calcular rendimiento. De la misma forma ocurrida con la partición hexánica, un sólido insoluble se formó mismo que fue retirado y pesado, llamándolo precipitado de acetato de etilo. Los pesos y rendimientos de las particiones y precipitados obtenidos fueron los siguientes: precipitado metanólico 4.39 g (14.4 %); partición hexánica, 1.37 g (4.5 %); precipitado hexánico 2.93 g (9.6 %); partición EtOAc, 1.73 g (5.69 %); precipitado EtOAc 1.73 g (5.7 %). Tanto el extracto metanólico como las particiones y precipitados fueron

evaluados contra el linfoma murino para determinar su actividad citotóxica (figura 53, extracto crudo y particiones; figura 54, precipitados).



**Figura 53.** Porcentaje de citotoxicidad del extracto metanólico crudo y sus particiones de *P. marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).



**Figura 54.** Porcentaje de citotoxicidad de los precipitados derivados del extracto crudo no consecutivo y sus particiones de *P. marginatus* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

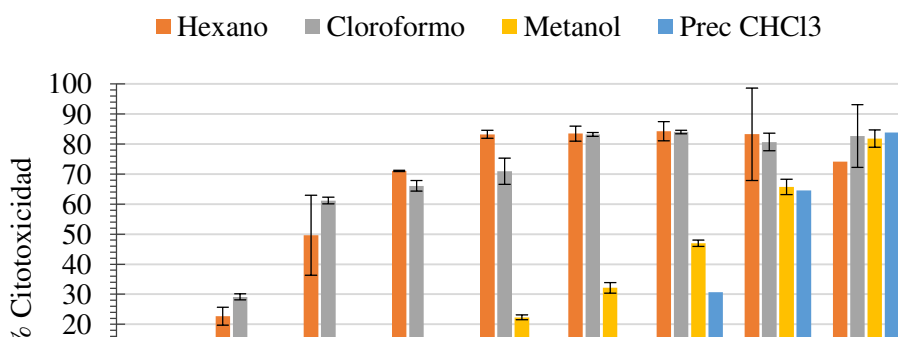
Debido a un bajo rendimiento no fue posible seguir fraccionando el extracto metanólico crudo ni sus particiones.

### 6.3 *Ibervillea sonora*

#### 6.3.1 Extracción consecutiva de *Ibervillea sonora*

Para la extracción consecutiva de *I. sonora* se utilizaron 84 g de material vegetal, y 600 mL de cada solvente (*n*-hexano, cloroformo, metanol). La extracción se llevó a cabo continuamente durante 40 h por cada solvente. Los extractos obtenidos se concentraron bajo presión reducida. En el caso del extracto clorofórmico, conforme se iba concentrando, un sólido insoluble precipitó mismo que fue separado. Sus pesos y rendimientos fueron los siguientes: hexano, 0.46 g (0.54 %); cloroformo, 0.7 g (0.83 %); metanol, 14.4 g (17.1 %); precipitado clorofórmico, 395 mg (0.46 %)

Todos los extractos fueron sometidos a pruebas biológicas contra la línea L5178Y-R. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente gráfica (figura 55):



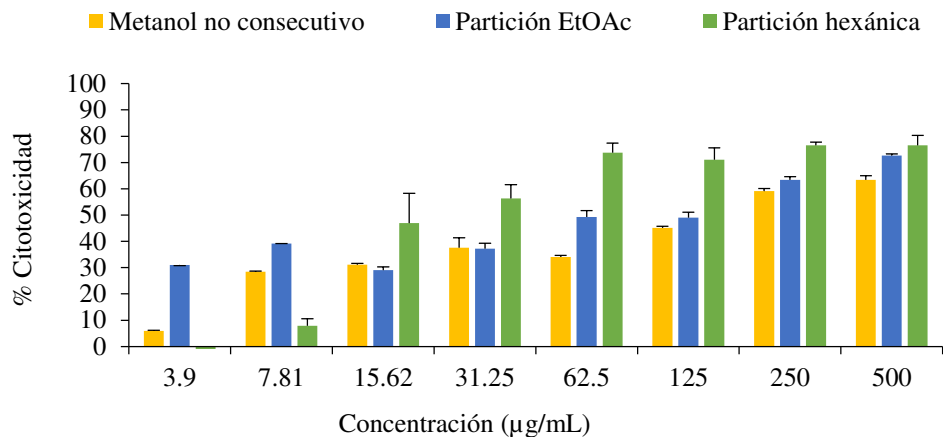
**Figura 55.** Porcentaje de citotoxicidad de los extractos crudos de *I. sonora* así como el precipitado clorofórmico sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

Debido al bajo rendimiento (en el caso de los extractos hexánico, clorofórmico y el precipitado clorofórmico) y a la baja actividad citotóxica (extracto metanólico), los extractos derivados de la extracción consecutiva de *I. sonora* fueron descartados para continuar con su fraccionamiento.

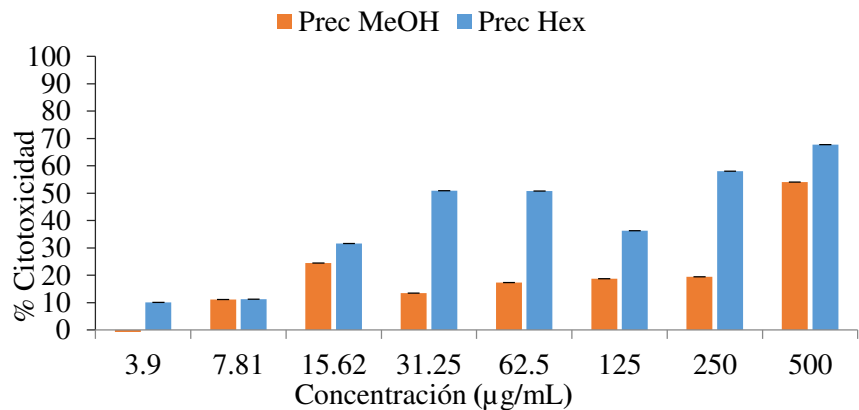
### 6.3.2 Extracción no consecutiva de *Ibervillea sonora*

Para la extracción no consecutiva se utilizaron 52 g de *I. sonora*, además de 600 mL de metanol como solvente de extracción. El proceso se llevó a cabo en un lapso de aproximadamente 40 h continuas. El extracto fue concentrado bajo presión reducida y su rendimiento final fue de 4.37 g (8.4 %).

Este extracto metanólico se sometió a una extracción líquido-líquido utilizando la misma metodología aplicada al extracto metanólico de *P. marginatus* (ver sección 6.2.2). Durante estos procesos se obtuvieron dos precipitados, uno metanólico y otro hexánico, formados a partir del proceso de concentración bajo presión reducida de sus respectivos extractos. Los pesos y rendimientos de las particiones y precipitados obtenidos fueron los siguientes: precipitado metanólico, 0.48 g (11 %); partición hexánica, 0.11 g (2.51 %); precipitado hexánico, 0.45 g (10.3 %); partición EtOAc, 2.14 g (48.9 %). Tanto el extracto metanólico como sus particiones y precipitados fueron evaluados contra el linfoma murino para determinar su actividad citotóxica (figuras 56 y 57).



**Figura 56.** Porcentaje de citotoxicidad del extracto metanólico crudo y sus particiones de *I. sonorae* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).



**Figura 57.** Porcentaje de citotoxicidad de los precipitados derivados de *I. sonorae* sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

Los precipitados metanólico y hexánico fueron descartados por baja actividad biológica. Aunque la partición hexánica fue la de mayor actividad biológica, ésta se descartó por su bajo rendimiento para continuar con el aislamiento biodirigido de



compuestos bioactivos. La partición de EtOAc fue seleccionada para seguir con el proceso de fraccionamiento biodirigido a fin de aislar los componentes activos.

### 6.3.2.1 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de EtOAc

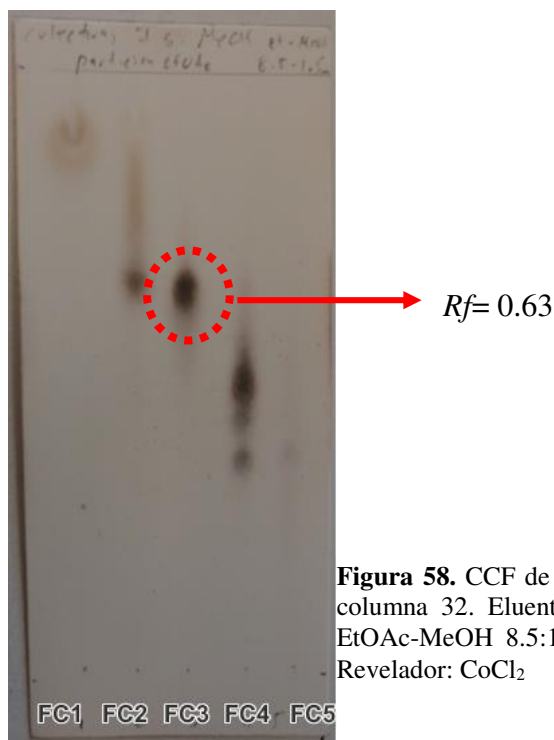
#### 6.3.2.1.1 Columna 32.

Inicialmente se pretendía someter la totalidad de la partición (2.14 g) a un fraccionamiento en columna, sin embargo, sólo 340 mg se pudieron solubilizar nuevamente en acetato de etilo (la porción insoluble fue almacenada). Éstos fueron purificados en una columna de sílica gel con las siguientes características:

10 g de sílica gel. El gradiente de elución fue el siguiente: EtOAc-metanol (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 30 mL v/v a excepción de la última elución que fue de 50 mL v/v). Se colectaron un total de 141 fracciones, 140 de 3 mL y 1 de 50 mL. Todas las fracciones fueron analizadas en CCF y, en base al desplazamiento de sus manchas, se agruparon aquellas que fueran similares. Se consiguieron 5 FC (figura 58 y sus pesos fueron evaluados (ver tabla 18).

**Tabla 18.** Rendimientos de las fracciones de la columna 32.

Fracciones	Peso
1	26 mg
2	48.5 mg
3	40 mg
4	114 mg
5	54 mg



**Figura 58.** CCF de las FC de la columna 32. Eluyente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador:  $\text{CoCl}_2$

La FC3 presentaba un compuesto de buena pureza ( $R_f = 0.63$ , EtOAc-MeOH 8.5:1.5), por lo que se decidió someter esta fracción a una cromatografía en columna adicional, en esta ocasión utilizando una matriz de Sephadex LH-20, esto con el fin de garantizar una mayor pureza del compuesto.

La FC4 presentaba un compuesto mayoritario con un  $R_f = 0.48$  (EtOAc-MeOH 8.5:1.5), seguido de dos compuestos con, aparentemente, menor pureza y de  $R_f$  de 0.42 y 0.34, mismos que se intentaron purificar (ver sección 6.3.2.1.3).

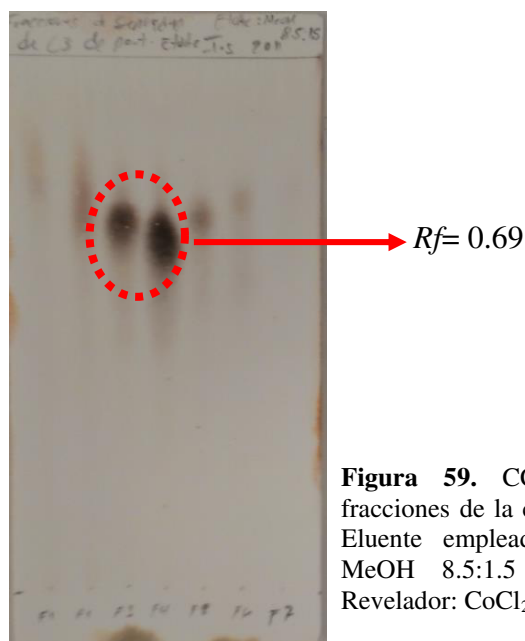
#### 6.3.2.1.2 Columna 33. Fraccionamiento de la FC3 de la columna 32 y aislamiento del compuesto **Is-C1**

Para el fraccionamiento de la FC3 se empleó una columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y 100 mL de metanol como fase móvil. Se utilizó la totalidad de la

fracción, 40 mg. Al final del proceso se recuperaron 20 fracciones de 5 mL de volumen cada uno aproximadamente. Una vez que se recuperaron las fracciones, estas fueron evaluadas por medio de CCF y en base al desplazamiento de sus manchas se decidió agrupar las aquellas que fueran comunes (figura 59). Se colectaron 6 FC y se evaluaron sus rendimientos (ver tabla 19).

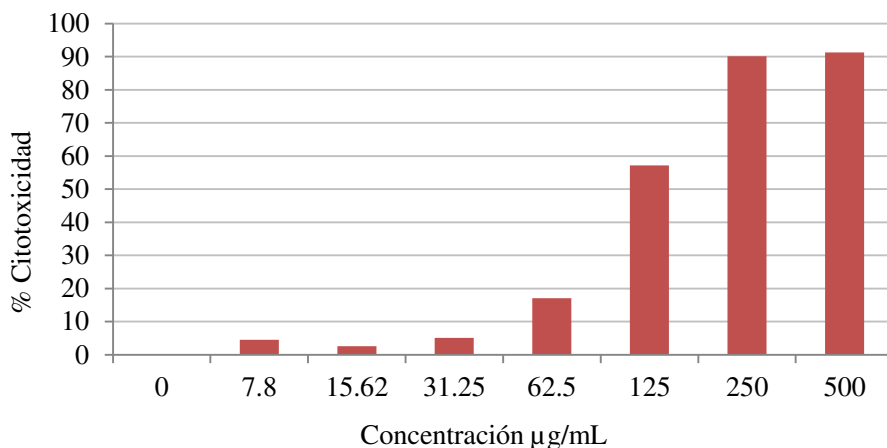
**Tabla 19.** Rendimientos de las fracciones de la columna 33.

Fracciones	Peso
1	0.6 mg
2	1.6 mg
3	13.6 mg
4	14.4 mg
5	5.2 mg
6	0.3 mg



**Figura 59.** CCF de las fracciones de la columna 33. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador:  $\text{CoCl}_2$ .

Se observó que las fracciones 3 y 4 representaban el compuesto deseado con  $R_f = 0.69$  (EtOAc-MeOH 8.5:1.5), así que se mezclaron, 28 mg en total, mismos que se sometieron a pruebas biológicas y espectroscópicas. A esta sustancia obtenido como polvo amorfo amarillo con punto de fusión de 170 °C se le denominó **Is-C1**. Su actividad biológica contra el linfoma L5178Y-R fue evaluada (figura 60).



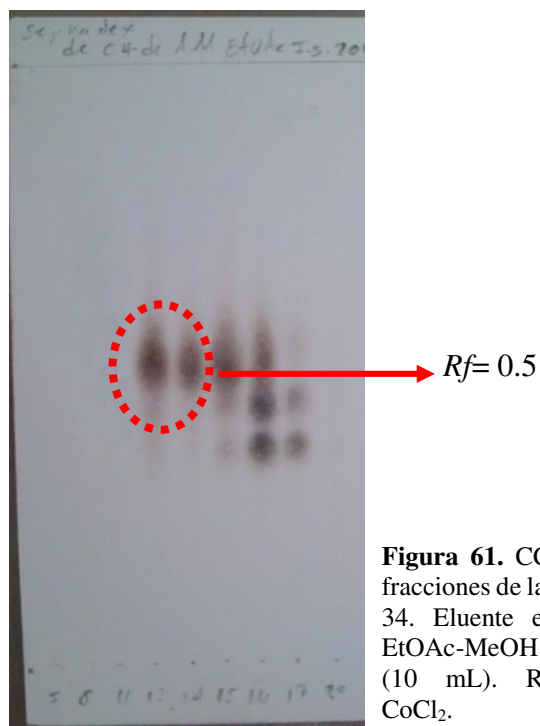
**Figura 60.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Is-C1 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

#### 6.3.2.1.3 Columna 34. Fraccionamiento de la FC4 de la columna 32 y aislamiento del compuesto **Is-C2**

La fracción FC4 de la columna 32 contenía, aparentemente, sólo un compuesto principal con  $R_f = 0.52$  (EtOAc-MeOH 8.5:1.5), además se encontraba en buena cantidad para seguir purificándola (114 mg). Es por esto que se decidió someter esta fracción nuevamente a una cromatografía en columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y 100 mL de metanol como fase móvil. Se utilizó la totalidad de la fracción, 114 mg. Al final del proceso se recuperaron 20 fracciones de 5 mL de volumen cada una aproximadamente. En sólo 5 fracciones se detectó material recuperado así que el resto se descartó. Estas fueron evaluadas por medio de CCF para determinar su pureza (figura 61) y sus pesos se pueden ver en la tabla 20.

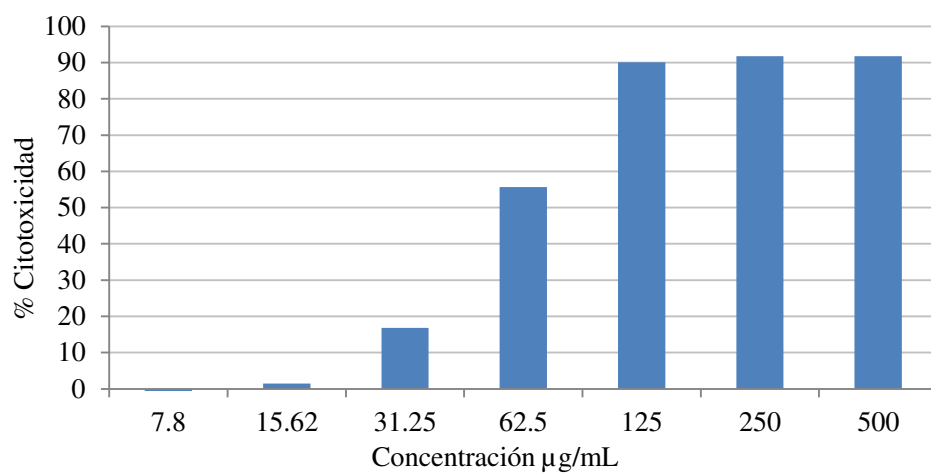
**Tabla 20.** Rendimientos de las fracciones de la columna 34.

Fracciones	Peso
1	12 mg
2	24 mg
3	23 mg
4	29 mg
5	4 mg



**Figura 61.** CCF de las fracciones de la columna 34. Eluente empleado: EtOAc-MeOH 8.5:1.5 (10 mL). Revelador:  $\text{CoCl}_2$ .

Se observó que en las fracciones 1 y 2 se encontraba el compuesto con  $R_f = 0.5$  (EtOAc-MeOH 8.5:1.5), así que se mezclaron para obtener 36 mg en total, mismos que se sometieron a pruebas biológicas y espectroscópicas. A esta sustancia obtenida como polvo amarillo amorfo con punto de fusión de  $152.5\text{ }^\circ\text{C}$  se le denominó **Is-C2**. Su actividad biológica contra el linfoma L5178Y-R fue evaluada (figura 62).

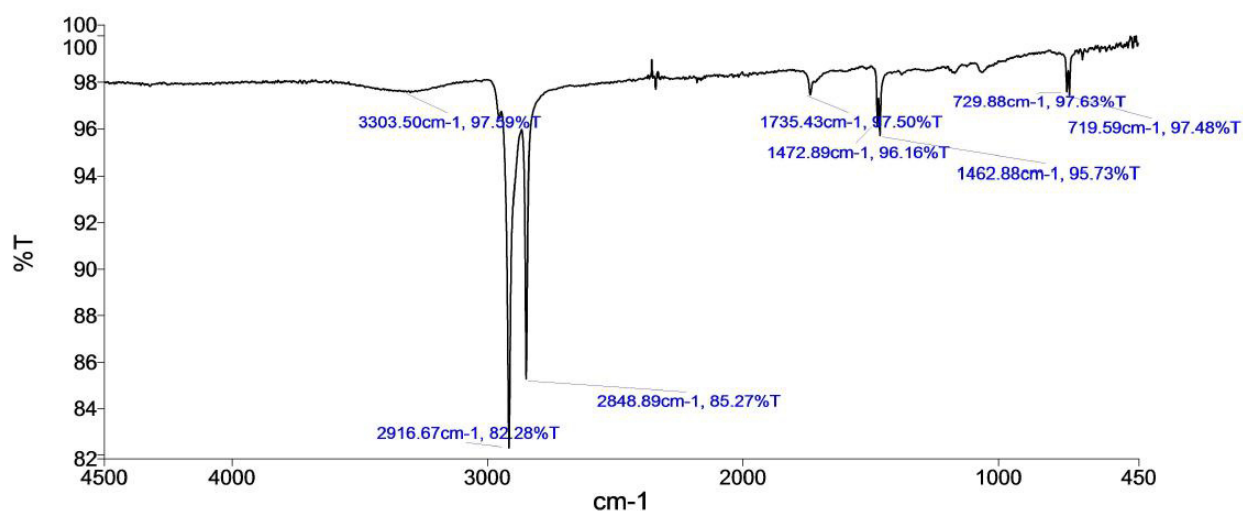


**Figura 63.** Porcentaje de citotoxicidad del compuesto Is-C2 sobre el linfoma murino L5178Y-R. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos representativos con tres réplicas, comparado con el control sin tratar (no mostrado). Vincristina fue usada como control positivo (no mostrado).

## 6.4 RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS

### 6.4.1 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C1**

#### 6.4.1.1 Análisis de IR-ATR



**Figura 63.** Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C1.

En el espectro de IR/ATR del compuesto **Pm-C1** las señales de absorción más intensas se observan a:  $\nu_{\max} = 2916, 2848, 1765, 1472, 729, 719 \text{ cm}^{-1}$ . Estos datos revelan que la molécula no es de naturaleza aromática, sino alifática, en donde predominan

grupos metilenos, lo que parece indicar la presencia de una gran cadena alifática. Una señal débil y ancha a  $3303\text{ cm}^{-1}$  pudiera deberse a la presencia de un grupo hidroxilo.

#### 6.4.1.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Un análisis de protones ( $^1\text{H}$ ) del compuesto **Pm-C1** también fue llevado a cabo (figura 64)

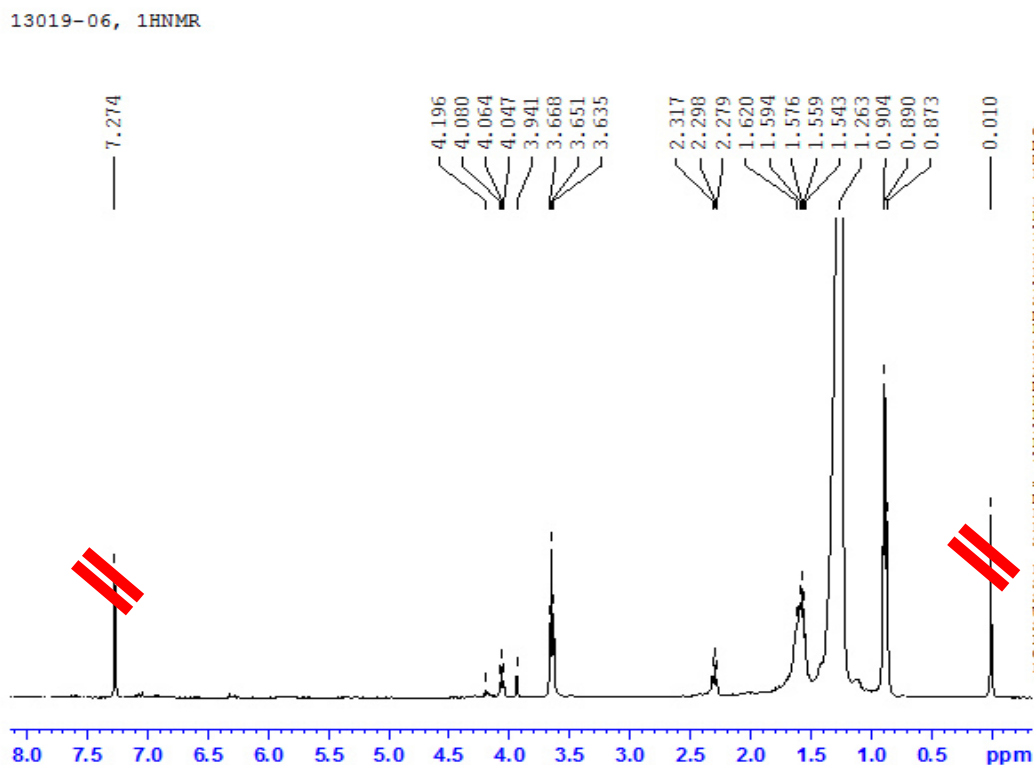


Figura 64. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN sin ampliar del compuesto Pm-C1 en  $\text{CDCl}_3$ .

En la figura anterior se descartaron las señales con los desplazamientos químicos 7.27 y 0 ppm, ya que corresponden al solvente  $\text{CHCl}_3$  sin deuteroar y al estándar de referencia

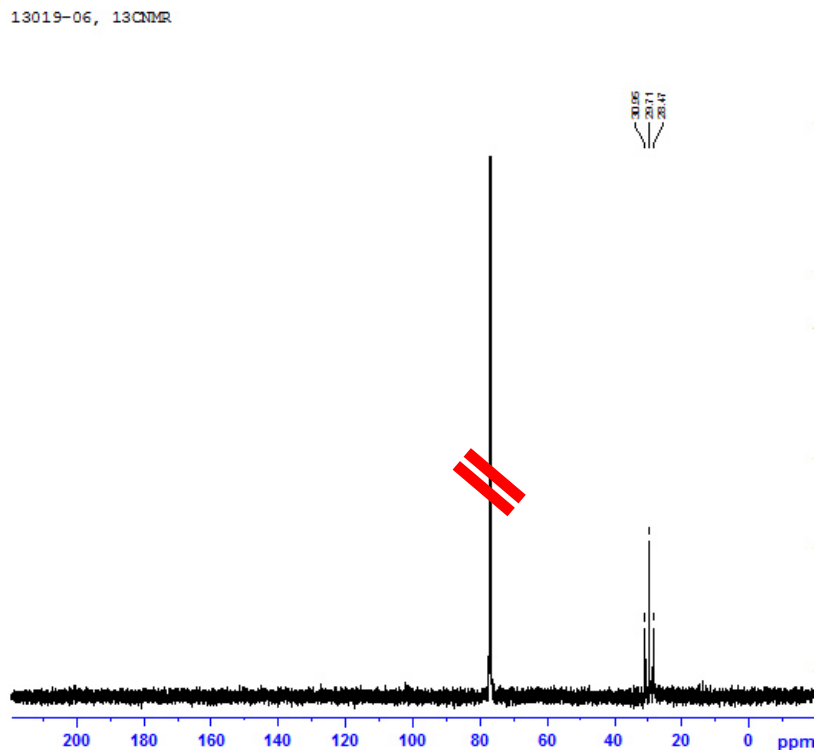


TMS, respectivamente, además se descartaron también las señales entre 3.9-4.2 ppm y entre 2.3-2.4 ppm ya que probablemente se traten de impurezas. De esta forma quedan claras la presencia de 4 señales: la señal a 3.65 ppm se trata de una señal triplete (t), representando un grupo metileno (CH<sub>2</sub>) unido por un lado a oxígeno y por otro a un grupo metileno. La señal a 1.57 ppm, con una multiplicidad multiplete (m), corresponde a grupos metileno (CH<sub>2</sub>) al igual que la señal intensa (“s”) a 1.26 ppm. La señal a 0.89 ppm, de multiplicidad triplete (t), representa un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) unido a un metileno.. Todas estas señales, en conjunto con las bandas de IR-ATR, sugieren que el compuesto sea de naturaleza alifática, de cadena larga y con al menos un grupo hidroxilo unido a esta. Los datos obtenidos de éste espectro se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 21.** Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup>H del compuesto **Pm-C1**.

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Interpretación
A	3.65	t	O-CH <sub>2</sub>
B	1.57	m	CH <sub>2</sub>
C	1.26	“s”	CH <sub>2</sub>
D	0.89	t	CH <sub>3</sub>

### 6.4.1.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$



**Figura 65.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Pm-C1 en  $\text{CDCl}_3$ .

En la anterior figura se descartó la señal propia del solvente sin deuterar de  $\text{CHCl}_3$  (77.3 ppm). Se pudieron apreciar 3 señales diferentes: 30.95, 29.71 y 28.47 ppm. Estas señales probablemente representan grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ), sin embargo no se aprecia en el espectro la señal del grupo metilo que debiera estar debajo de 20 ppm. La señal del grupo metileno unido al grupo hidroxilo pudiera estar enmascarada por la señal del solvente. Estos hechos sugieren que la gran abundancia de grupos metileno de la cadena alifática opacan las señales que se esperarían ver en los espectros. A pesar de nuestros esfuerzos no nos fue posible elucidar totalmente la estructura de este sólido. Nuestra

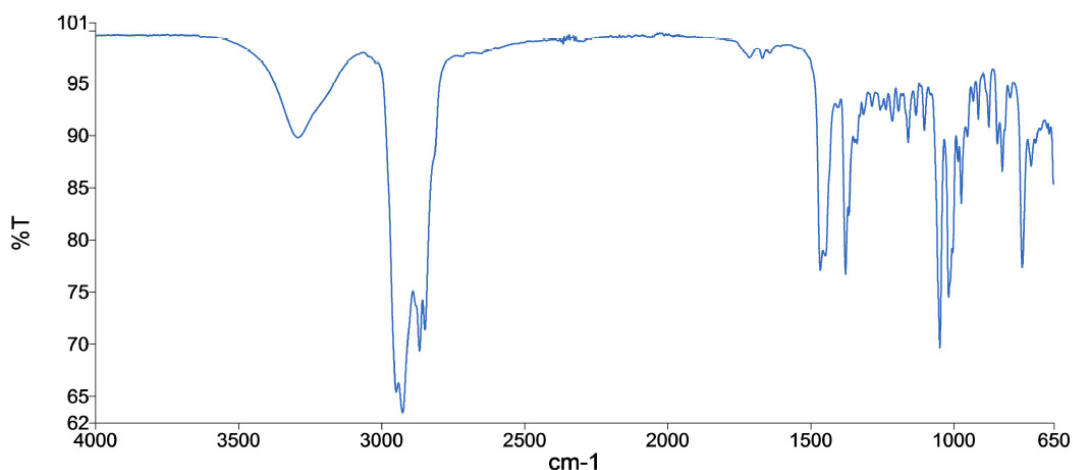
conclusión es que la sustancia posee principalmente compuestos de cadena larga alifática como es el caso de ceras de tipo alcohol con la estructura general mostrada a continuación:



Los alcoholes de cadena larga más comunes en plantas terrestres contienen alrededor de 26 a 30 carbonos (n), generalmente de manera par (Mudge, 2005), así que **Pm-C1** pudiera ser alguno de estos alcoholes.

#### 6.4.2 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C2**

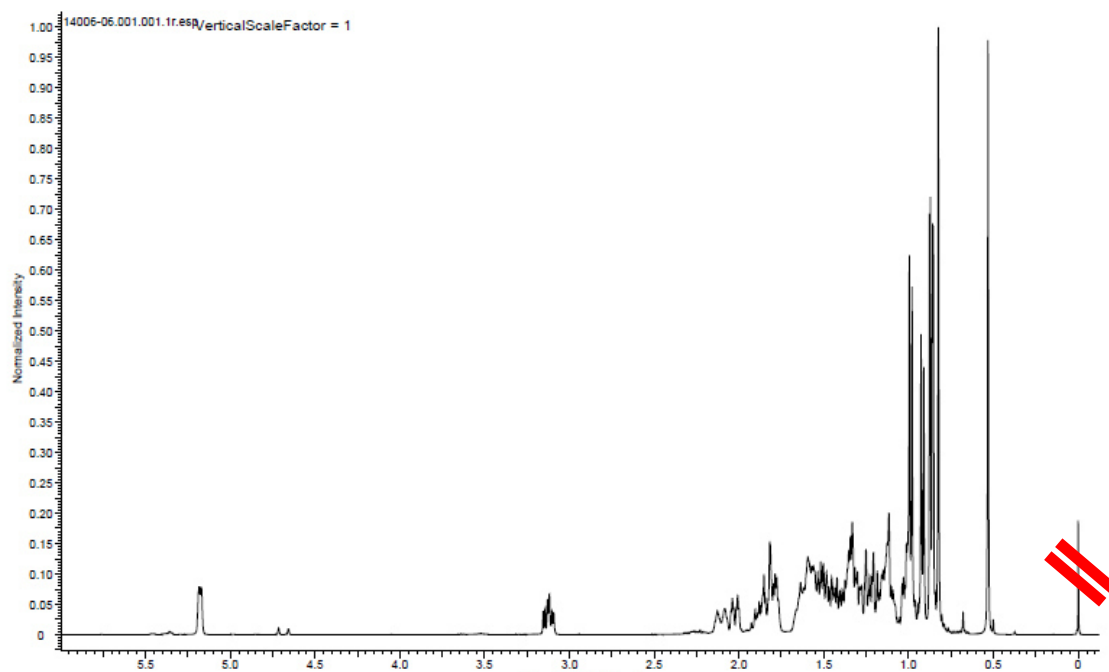
Como se mencionó anteriormente en la sección 6.2.1.1.6, este compuesto se obtuvo aún con ciertas impurezas y debido a esto algunos espectros no están del todo bien definidos. Es por eso que solo se describen las señales más claras e importantes y, posteriormente, se comparan con las de **Pm-C3**.



**Figura 66.** Espectro de IR del compuesto Pm-C2.

En el espectro de IR/ATR del compuesto **Pm-C2** de la figura anterior, las señales de absorción más importantes fueron las siguientes:  $\nu_{\max} = 3374, 2952, 2927, 2868, 2850, 1465, 1366, 1192 \text{ cm}^{-1}$ . Estos datos revelan que la molécula no es de naturaleza aromática, sino alifática donde predominan grupos metilos y metilenos. La banda amplia a  $3374 \text{ cm}^{-1}$  y la banda a  $1192 \text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de un grupo hidroxilo.

#### 6.4.2.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 67.** Espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto Pm-C2 en  $\text{CDCl}_3$ .

En la figura anterior se pudieron apreciar múltiples señales entre las que destacan las señales a 5.18 ppm, singlete (s), que sugiere la presencia de hidrógenos unidos a

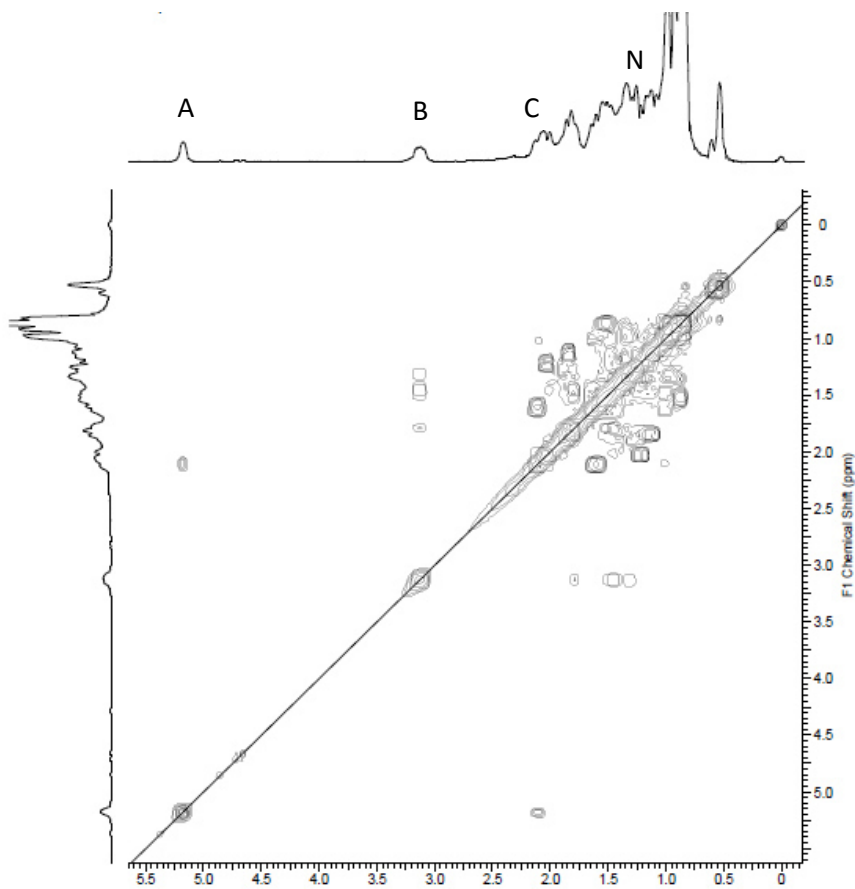
carbonos olefínicos; un multiplete (m) a 3.13 ppm, que representa a protones cercanos a grupos hidroxilo; 5 señales a campos altos de gran intensidad: 0.99 (d), 0.92 (d), 0.87 (d), 0.83 (s) y 0.53 (s) ppm que son característicos de grupos metilos por su integración de 3 ó 6 hidrógenos. Además de diversas señales en la región de alifáticos mismas que indican una gran cantidad de grupos CH y CH<sub>2</sub>. En la siguiente tabla se resumen los resultados de este análisis:

**Tabla 22.** Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup>H del compuesto **Pm-C2**.

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración
A	5.18	t	1 H
B	3.12	m	1 H
C	2.09	m	28 H
D	2.01	m	
E	1.86	m	
F	1.83	m	
G	1.80	m	
H	1.63	m	
I	1.60	m	
J	1.55	m	
K	1.51	m	
L	1.44	m	
M	1.34	m	
N	1.29	m	
Ñ	1.19	m	
O	1.13	m	
P	0.99	d	3 H
Q	0.92	d	3 H
R	0.87	d	6 H
S	0.83	s	3 H
T	0.54	s	3 H

Al ser muy complejo el rango de señales en la región de alifáticos la integración calculada puede variar de la real.

Además, se realizó un análisis COSY (Correlation Spectroscopy) para identificar las correlaciones entre dos protones (figura 68).



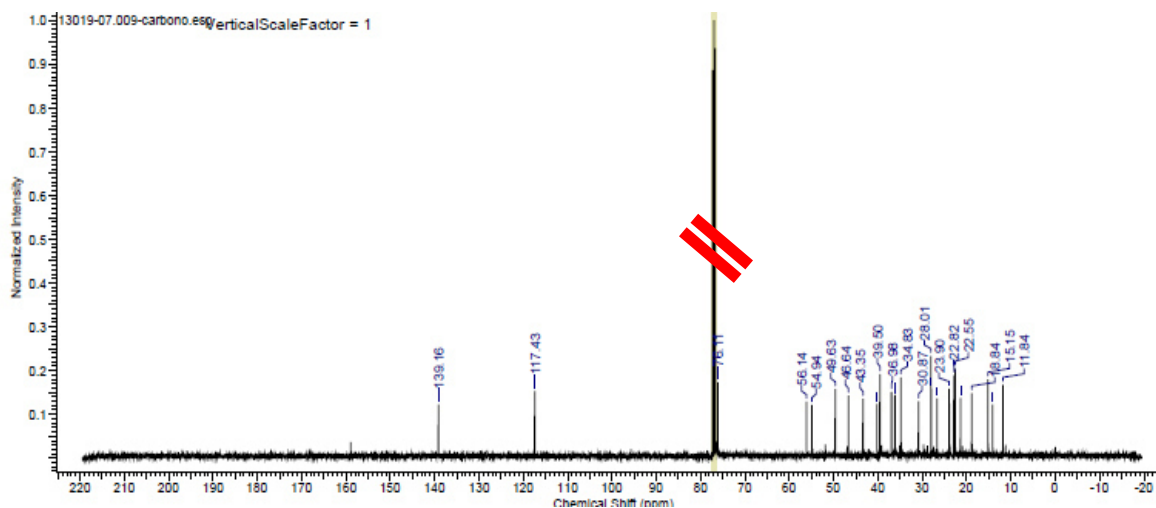
**Figura 68.** Espectro de COSY del compuesto Pm-C2 en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de COSY se observaron dos correlaciones claras, una entre el hidrógeno olefínico (5.18 ppm) y un protón en el área de alifáticos (2.09 ppm), y otra entre un hidrógeno cercano a un oxígeno (3.12 ppm) y un hidrógeno alifático (1.29 ppm). En la región que comprende entre 0.5-2.5 ppm se aprecian varios acoplamientos, sin embargo, debido a que las señales se encuentran sobrelapadas es difícil asignar con certeza alguna correlación. En la siguiente tabla se resumen los resultados.

**Tabla 23.** Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto **Pm-C2**.

Señal	Correlación
A (5.18 ppm)	C (2.09 ppm)
B (3.12 ppm)	N (1.29 ppm)

#### 6.4.2.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$

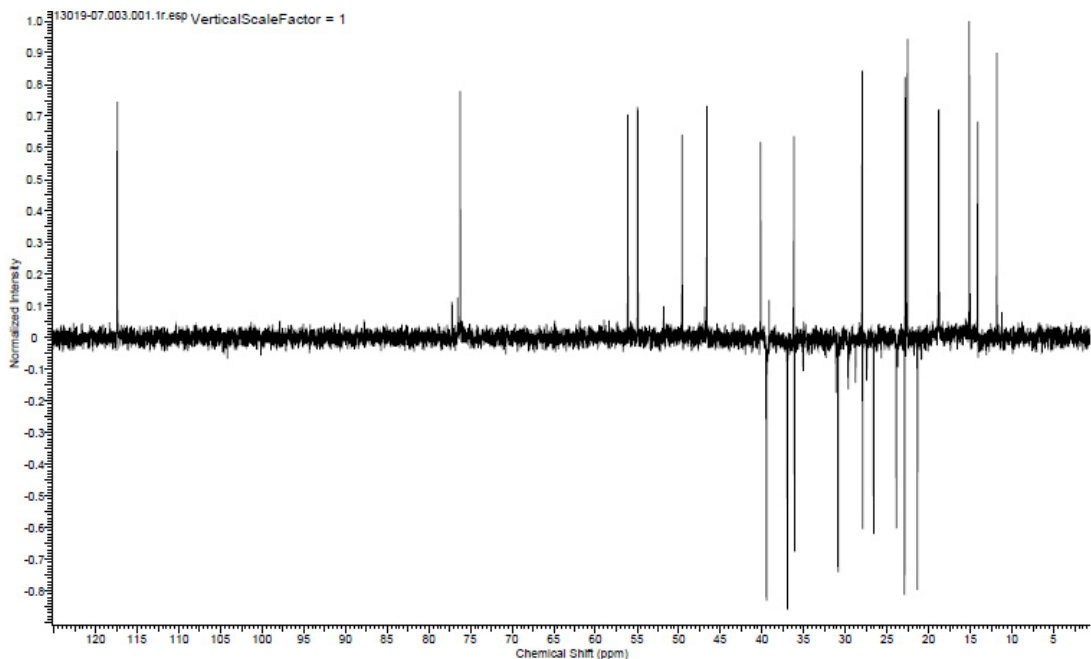


**Figura 69.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **Pm-C2** en  $\text{CDCl}_3$ .

En el análisis de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **Pm-C2** se pudieron apreciar claramente 28 señales que representan tentativamente 28 carbonos diferentes en la estructura. Destacan las señales a 139.16 y 117.43 ppm que representan carbonos olefínicos. Una señal a

76.11 ppm sugiere la presencia de un carbono unido a oxígeno. El resto de señales a campos más altos corresponden a carbonos alifáticos.

Posteriormente, se realizó un análisis por DEPT-135 (figura 70).



**Figura 70.** Espectro de DEPT-135 del compuesto Pm-C2 en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro anterior se pudieron observar la presencia de 6  $\text{CH}_3$ , 10  $\text{CH}_2$  y 9  $\text{CH}$ . Cabe destacar que las señales previamente observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  con los desplazamientos químicos 139.16, 43.35 y 34.83 ppm ya no se aprecian en DEPT-135, indicando que representan carbonos cuaternarios, es decir, carbonos no enlazados a hidrógenos. Los resultados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

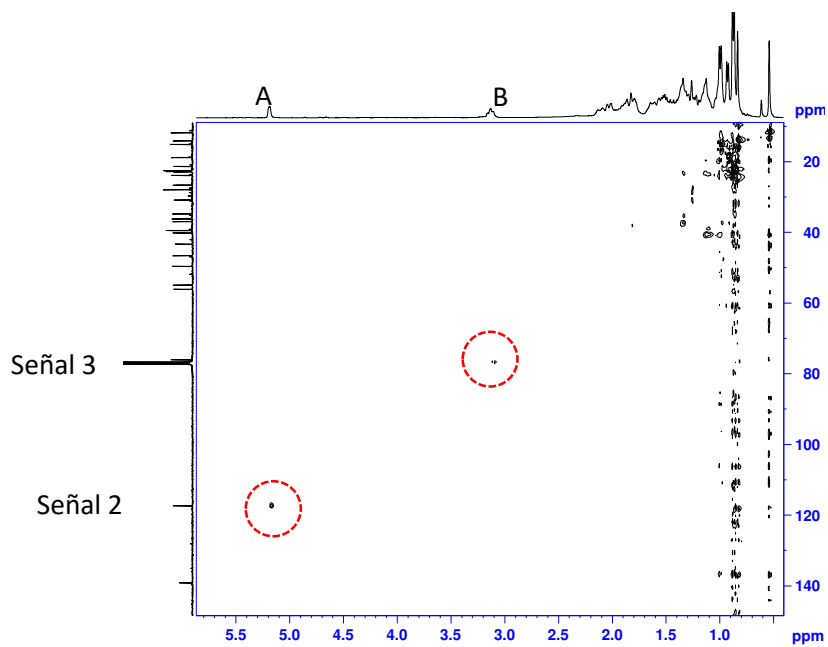


**Tabla 24.** Resumen de señales de  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 de **Pm-C2**.

Señal	$\delta$ ppm	DEPT-135	Señal	$\delta$ ppm	DEPT-135
1	139.16	Cq	15	34.83	Cq
2	117.43	CH	16	30.87	CH <sub>2</sub>
3	76.11	CH	17	28.01	CH
4	56.14	CH	18	27.96	CH <sub>2</sub>
5	54.94	CH	19	26.63	CH <sub>2</sub>
6	49.63	CH	20	23.90	CH <sub>2</sub>
7	46.64	CH	21	22.91	CH <sub>2</sub>
8	43.35	Cq	22	22.82	CH <sub>3</sub>
9	40.17	CH	23	22.55	CH <sub>3</sub>
10	39.54	CH <sub>2</sub>	24	21.37	CH <sub>2</sub>
11	39.5	CH <sub>2</sub>	25	18.84	CH <sub>3</sub>
12	36.98	CH <sub>2</sub>	26	15.15	CH <sub>3</sub>
13	36.20	CH	27	14.13	CH <sub>3</sub>
14	36.12	CH <sub>2</sub>	28	11.84	CH <sub>3</sub>

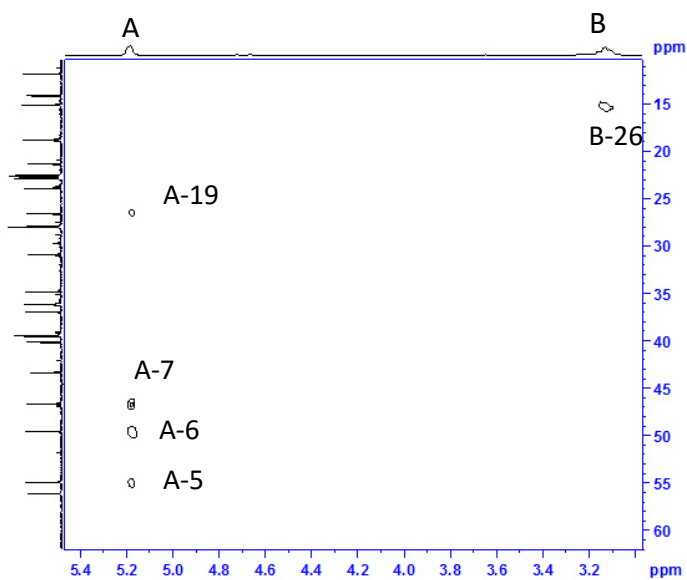
Aunado a esto se realizaron análisis de HSQC y HMBC de **Pm-C2** para correlacionar las diferentes señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y de ésta manera revisar las interacciones de los hidrógenos y carbonos dentro de la estructura.

En el espectro de HSQC (figura 71) se pudo apreciar que la señal de carbono 2 (117.43 ppm) tiene correspondencia con la señal de protones A (5.18 ppm). La señal de carbono 3 (76.11 ppm) tiene una correspondencia con la señal de protones B (3.12 ppm). Además, se pudo percibir que las señales de carbono 1, 8 y 15, anteriormente identificados como carbonos cuaternarios, se confirmaron en ésta técnica al no poseer acoplamiento con ninguna señal de protones.



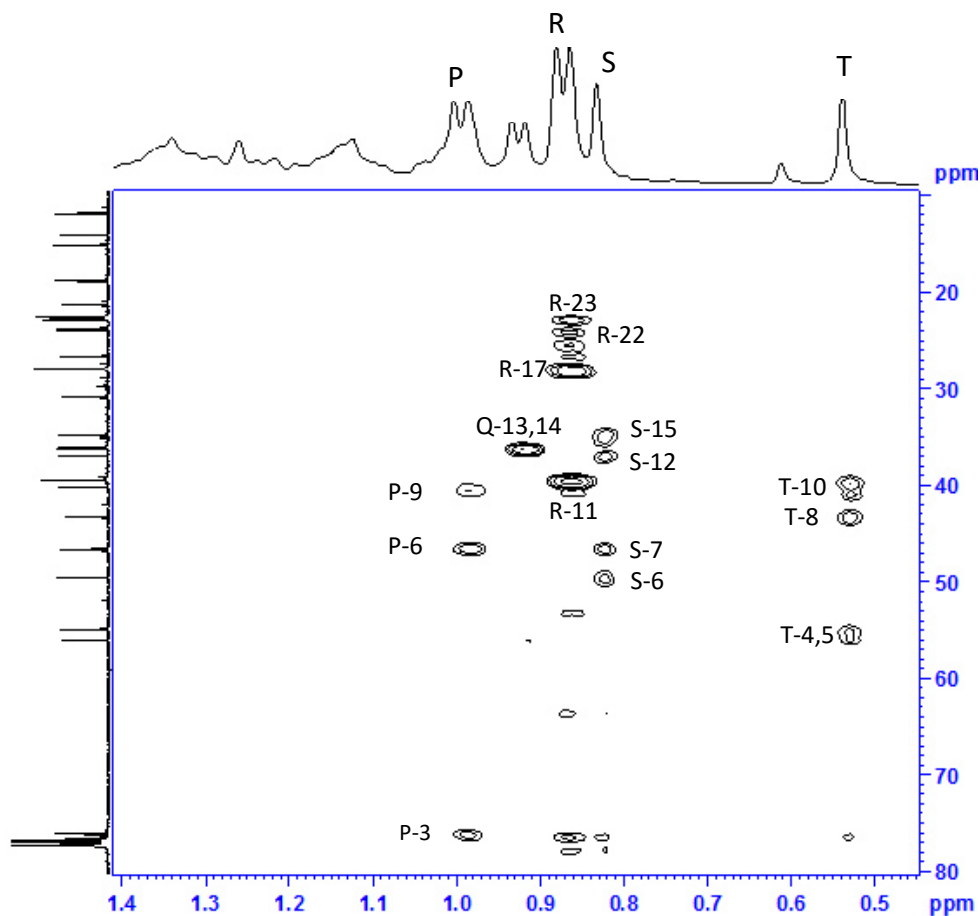
**Figura 71.** Espectro de HSQC del compuesto Pm-C2.

Un análisis de HMBC de **Pm-C2** fue llevado a cabo para reconocer los acoplamientos carbono-hidrógeno a 2, 3 ó 4 enlaces. En la figura 72 se muestra una ampliación de las señales encontradas a campos bajos, y en la figura 73 una ampliación a campos altos.



**Figura 72.** Espectro ampliado ( $^1\text{H}$ : 3-5.5 ppm;  $^{13}\text{C}$ : 10-65 ppm) de HMBC del compuesto Pm-C2.

En la anterior figura se pudo apreciar que la señal A, 5.18 ppm, se acopla a 4 señales de carbono distintas: 5, 6, 7 y 19. La señal B, 3.12 ppm, se acopla a la señal de carbono 26.



**Figura 73.** Espectro ampliado ( $^1\text{H}$ : 0-1.4 ppm;  $^{13}\text{C}$ : 0-80 ppm) de HMBC del compuesto Pm-C2.

En la anterior figura se pudo apreciar que la señal P, 0.99 ppm, se acopla a 3 señales: 3, 6 y 9. La señal Q, 0.92 ppm, se acopla a las señales 13 y 14. La señal R, 0.87 ppm, como era de esperarse, se acopla a varias señales ya que representa dos metilos de entornos químicos similares como se pudo observar en el espectro de  $^1\text{H}$ : señales 11, 17,

22 y 23. La señal S da correspondencia con las señales 6, 7, 12, 15. Finalmente, la señal de protones T posee 4 acoplamientos con las señales de carbono 4, 5, 8 y 10.

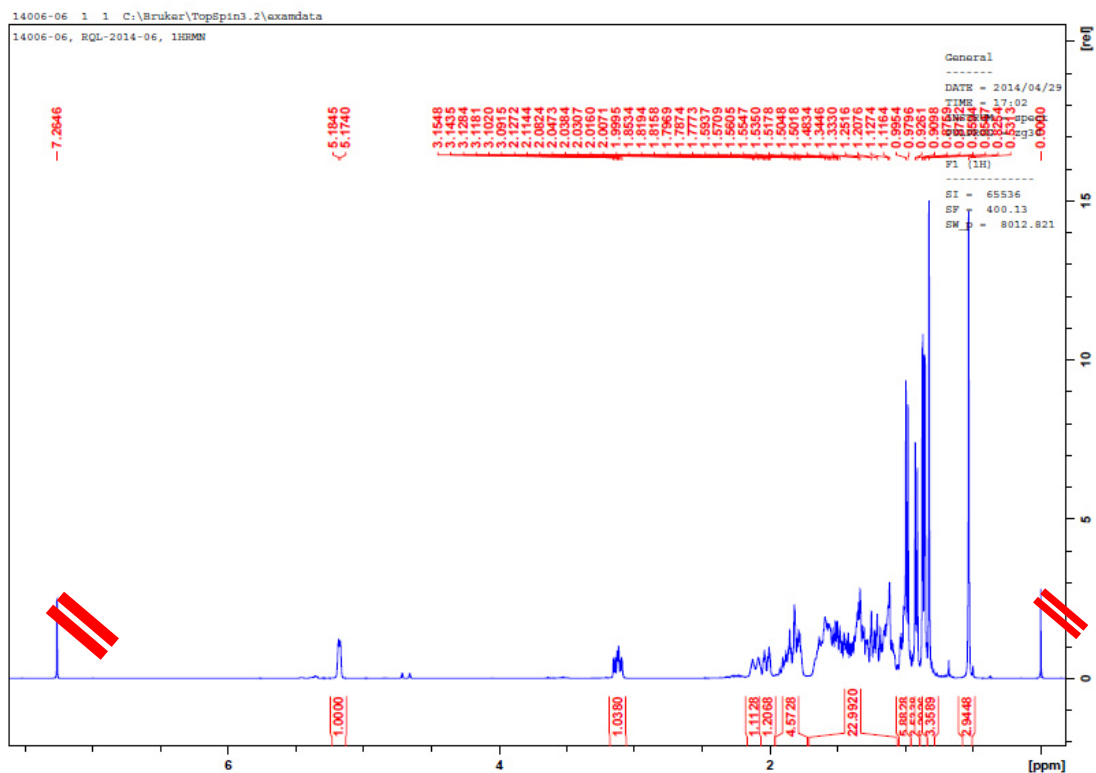
**Tabla 25.** Resumen de señales de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC del compuesto **Pm-C2**.

Señal	C(ppm)	C(tipo)	HMBC	$^1\text{H}$ (ppm)	Señal	C (ppm)	C(tipo)	HMBC	$^1\text{H}$ (ppm)
<b>1</b>	139.17	Cq	-	-	<b>15</b>	34.83	Cq	-	-
<b>2</b>	117.43	CH	5, 6, 7, 19	5.18	<b>16</b>	30.87	CH <sub>2</sub>	-	
<b>3</b>	76.11	CH	26	3.12	<b>17</b>	28.01	CH	-	
<b>4</b>	56.14	CH	-		<b>18</b>	27.96	CH <sub>2</sub>	-	
<b>5</b>	54.94	CH	-		<b>19</b>	26.63	CH <sub>2</sub>	-	
<b>6</b>	49.63	CH	-		<b>20</b>	23.90	CH <sub>2</sub>	-	
<b>7</b>	46.64	CH	-		<b>21</b>	22.91	CH <sub>2</sub>	-	
<b>8</b>	43.35	Cq	-	-	<b>22</b>	22.82	CH <sub>3</sub>	11, 17, 22 y 23	0.87
<b>9</b>	40.17	CH	-		<b>23</b>	22.55	CH <sub>3</sub>	11, 17, 22 y 23	0.87
<b>10</b>	39.54	CH <sub>2</sub>	-		<b>24</b>	21.37	CH <sub>2</sub>	-	
<b>11</b>	39.5	CH <sub>2</sub>	-		<b>25</b>	18.84	CH <sub>3</sub>	13, 14	0.92
<b>12</b>	36.98	CH <sub>2</sub>	-		<b>26</b>	15.15	CH <sub>3</sub>	3, 6, 9	0.99
<b>13</b>	36.2	CH	-		<b>27</b>	14.13	CH <sub>3</sub>	6, 7, 12, 15	0.83
<b>14</b>	36.12	CH <sub>2</sub>	-		<b>28</b>	11.84	CH <sub>3</sub>	4, 5, 8, 10	0.54

Estas señales se compararon con las más importantes del compuesto **Pm-C3** (ver siguiente sección) para corroborar que se trataban de la misma sustancia.

### 6.4.3 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C3**.

#### 6.4.3.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 74.** Espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto **Pm-C3** en  $\text{CDCl}_3$ .

En la figura anterior se pudieron apreciar las mismas señales que las presentadas en el espectro de protones de **Pm-C2**. Destacan las señales a 5.18 ppm, singlete (s), que sugiere la presencia de hidrógenos unidos a carbonos olefínicos; un multiplete (m) a 3.13 ppm, que representa a protones cercanos a grupos hidroxilo; 5 señales a campos altos de gran intensidad: 1.00 (d), 0.92 (d), 0.87 (d), 0.83 (s) y 0.53 (s) ppm que son característicos de grupos metilos por su integración de 3 ó 6 hidrógenos.

**Tabla 26.** Resumen de señales del espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto **Pm-C3**.

Señal	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Integración
A	5.18	t	1 H
B	3.12	m	1 H
C	2.09	m	28 H
D	2.01	m	
E	1.86	m	
F	1.83	m	
G	1.80	m	
H	1.63	m	
I	1.60	m	
J	1.55	m	
K	1.51	m	
L	1.44	m	
M	1.34	m	
N	1.29	m	
Ñ	1.19	m	
O	1.13	m	
P	1.00	d	3 H
Q	0.92	d	3 H
R	0.87	d	6 H
S	0.83	s	3 H
T	0.53	s	3 H

Estos resultados respaldan la teoría de que **Pm-C2** y **Pm-C3** son el mismo compuesto.

### 6.4.3.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$

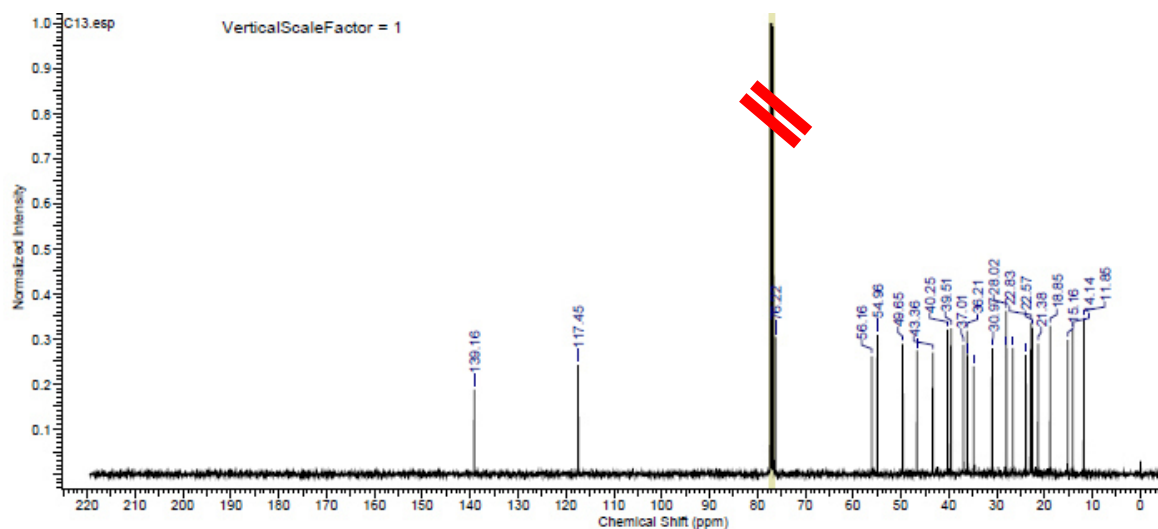
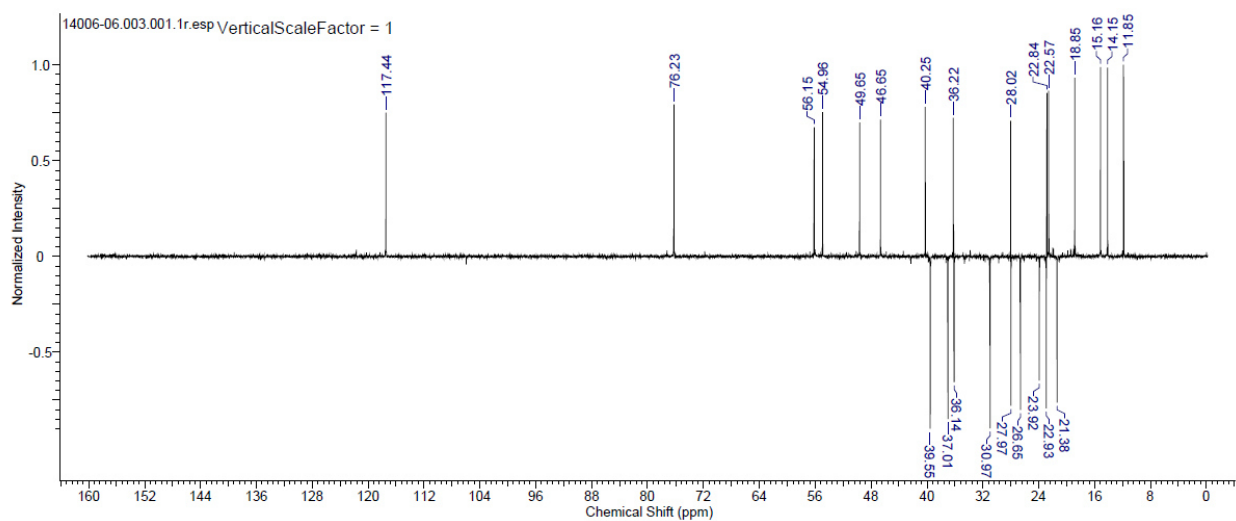


Figura 75. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Pm-C3 en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  de la figura 75, se lograron detectar un total de 28 señales con desplazamientos químicos muy similares a los exhibidos por **Pm-C2**. Conjuntamente, se realizó un análisis DEPT-135 (figura 76) para constatar que ambas sustancias tuvieran el mismo tipo de carbonos. En la tabla 24 se resumen a manera comparativa las señales de  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 de **Pm-C2** y **Pm-C3**.



**Figura 76.** Espectro de DEPT-135 del compuesto Pm-C3 en  $\text{CDCl}_3$ .

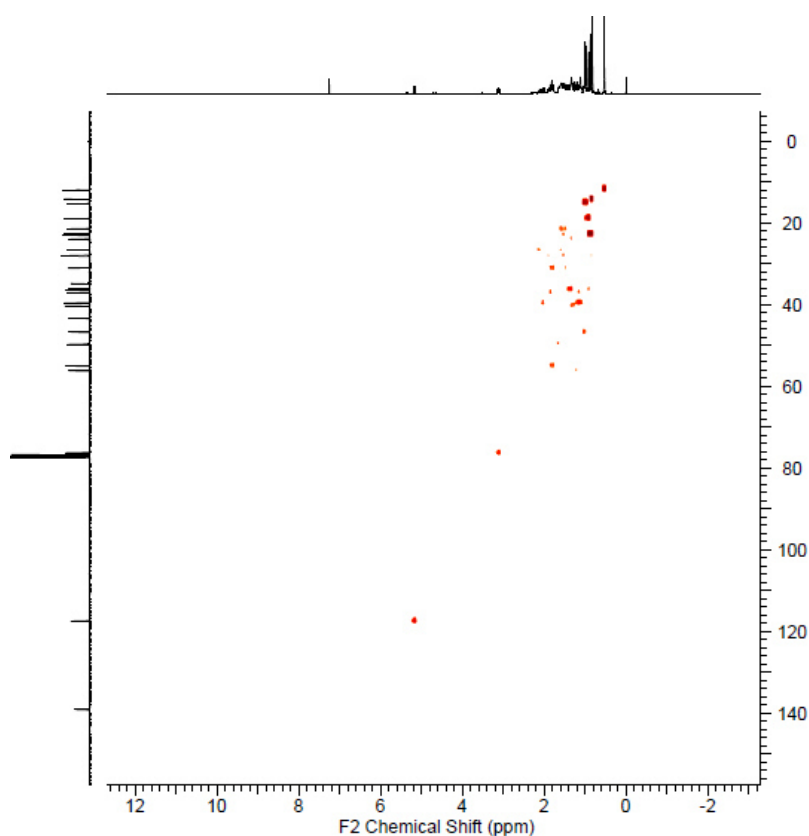
**Tabla 27.** Comparación de señales de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 entre Pm-C2 y Pm-C3.

Pm-C2			Pm-C3		
Señal	$\delta$ (ppm)	C (tipo)	Señal	$\delta$ (ppm)	C (tipo)
1	139.17	Cq	1	139.16	Cq
2	117.43	CH	2	117.45	CH
3	76.11	CH	3	76.22	CH
4	56.14	CH	4	56.16	CH
5	54.94	CH	5	54.96	CH
6	49.63	CH	6	49.65	CH
7	46.64	CH	7	46.66	CH
8	43.35	Cq	8	43.36	Cq
9	40.17	CH	9	40.25	CH
10	39.54	CH <sub>2</sub>	10	39.55	CH <sub>2</sub>
11	39.5	CH <sub>2</sub>	11	39.51	CH <sub>2</sub>
12	36.98	CH <sub>2</sub>	12	37.01	CH <sub>2</sub>
13	36.2	CH	13	36.21	CH
14	36.12	CH <sub>2</sub>	14	36.13	CH <sub>2</sub>
15	34.83	Cq	15	34.84	Cq
16	30.87	CH <sub>2</sub>	16	30.97	CH <sub>2</sub>
17	28.01	CH	17	28.02	CH
18	27.96	CH <sub>2</sub>	18	27.97	CH <sub>2</sub>
19	26.63	CH <sub>2</sub>	19	26.65	CH <sub>2</sub>
20	23.90	CH <sub>2</sub>	20	23.91	CH <sub>2</sub>

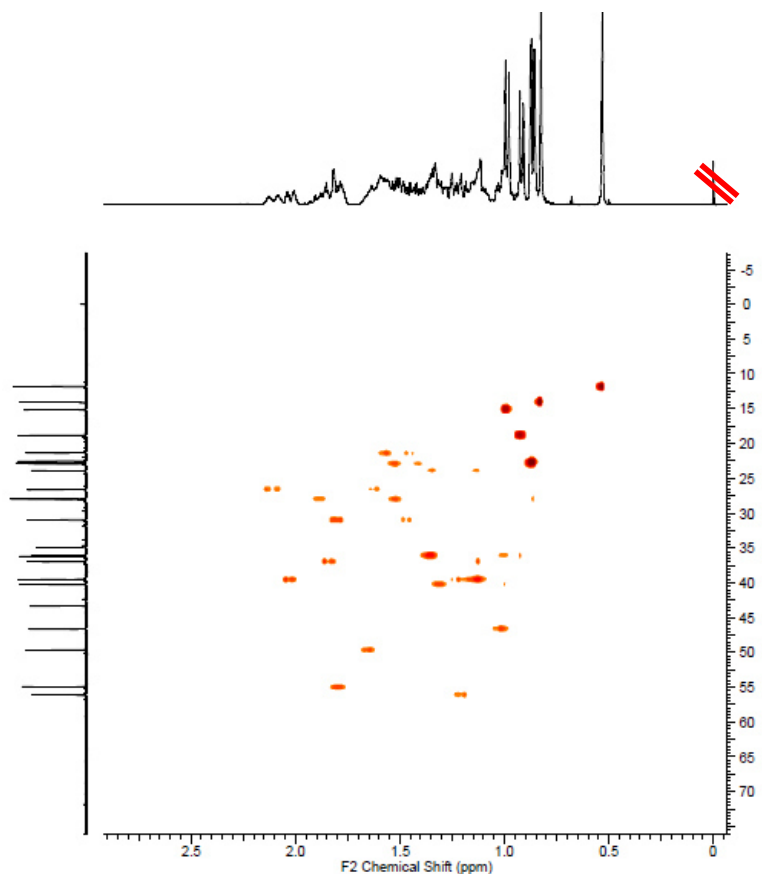


21	22.91	CH <sub>2</sub>	21	22.92	CH <sub>2</sub>
22	22.82	CH <sub>3</sub>	22	22.83	CH <sub>3</sub>
23	22.55	CH <sub>3</sub>	23	22.57	CH <sub>3</sub>
24	21.37	CH <sub>2</sub>	24	21.38	CH <sub>2</sub>
25	18.84	CH <sub>3</sub>	25	18.85	CH <sub>3</sub>
26	15.15	CH <sub>3</sub>	26	15.16	CH <sub>3</sub>
27	14.13	CH <sub>3</sub>	27	14.14	CH <sub>3</sub>
28	11.84	CH <sub>3</sub>	28	11.85	CH <sub>3</sub>

Gracias a que el compuesto **Pm-C3** poseía una mayor pureza, el análisis de HSQC (figura 77 y figura 78) nos arrojó una información más clara acerca de los enlaces directos entre los carbonos e hidrógenos de la molécula.



**Figura 77.** Espectro de HSQC del compuesto Pm-C3.

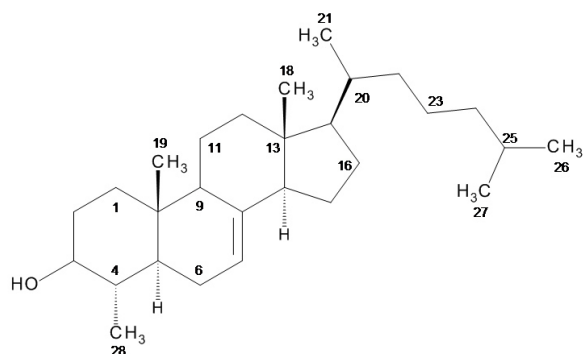


**Figura 78.** Espectro de HSQC ampliado ( $^1\text{H}$ : 0-2.5 ppm;  $^{13}\text{C}$ : 0-80 ppm) del compuesto Pm-C3.

**Tabla 28.** Resumen de señales de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135 y HSQC del compuesto Pm-C3.

Señal	C(ppm)	C(tipo)	$^1\text{H}$ (ppm)	Señal	C(ppm)	C(tipo)	$^1\text{H}$ (ppm)
<b>1</b>	139.16	Cq	-	<b>15</b>	34.84	Cq	-
<b>2</b>	117.45	CH	5.18	<b>16</b>	30.97	CH <sub>2</sub>	
<b>3</b>	76.22	CH	3.12	<b>17</b>	28.02	CH	1.51
<b>4</b>	56.16	CH		<b>18</b>	27.97	CH <sub>2</sub>	1.86
<b>5</b>	54.96	CH		<b>19</b>	26.65	CH <sub>2</sub>	2.13, 2.08
<b>6</b>	49.65	CH		<b>20</b>	23.91	CH <sub>2</sub>	1.34
<b>7</b>	46.66	CH		<b>21</b>	22.92	CH <sub>2</sub>	
<b>8</b>	43.36	Cq	-	<b>22</b>	22.83	CH <sub>3</sub>	0.86
<b>9</b>	40.25	CH	1.29	<b>23</b>	22.57	CH <sub>3</sub>	0.86
<b>10</b>	39.55	CH <sub>2</sub>	2.04, 2.01	<b>24</b>	21.38	CH <sub>2</sub>	
<b>11</b>	39.51	CH <sub>2</sub>		<b>25</b>	18.85	CH <sub>3</sub>	0.91
<b>12</b>	37.01	CH <sub>2</sub>	1.86, 1.80	<b>26</b>	15.16	CH <sub>3</sub>	0.98
<b>13</b>	36.21	CH		<b>27</b>	14.14	CH <sub>3</sub>	0.82
<b>14</b>	36.13	CH <sub>2</sub>		<b>28</b>	11.85	CH <sub>3</sub>	0.54

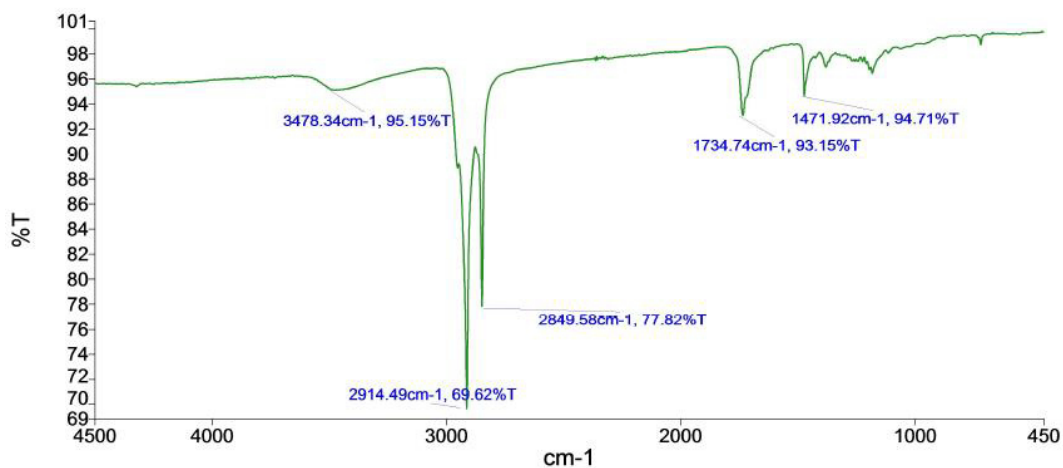
Gracias al análisis conjunto de los espectros de **Pm-C2** y **Pm-C3**, y a la comparación en la literatura (Akihisa y Matsumoto, 1987), se logró identificar el compuesto como Lofenol, con fórmula molecular  $C_{28}H_{48}O$  (figura 79).



**Figura 79.** Estructura del compuesto Pm-C2 y Pm-C3, Lofenol.

#### 6.4.4 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C4**

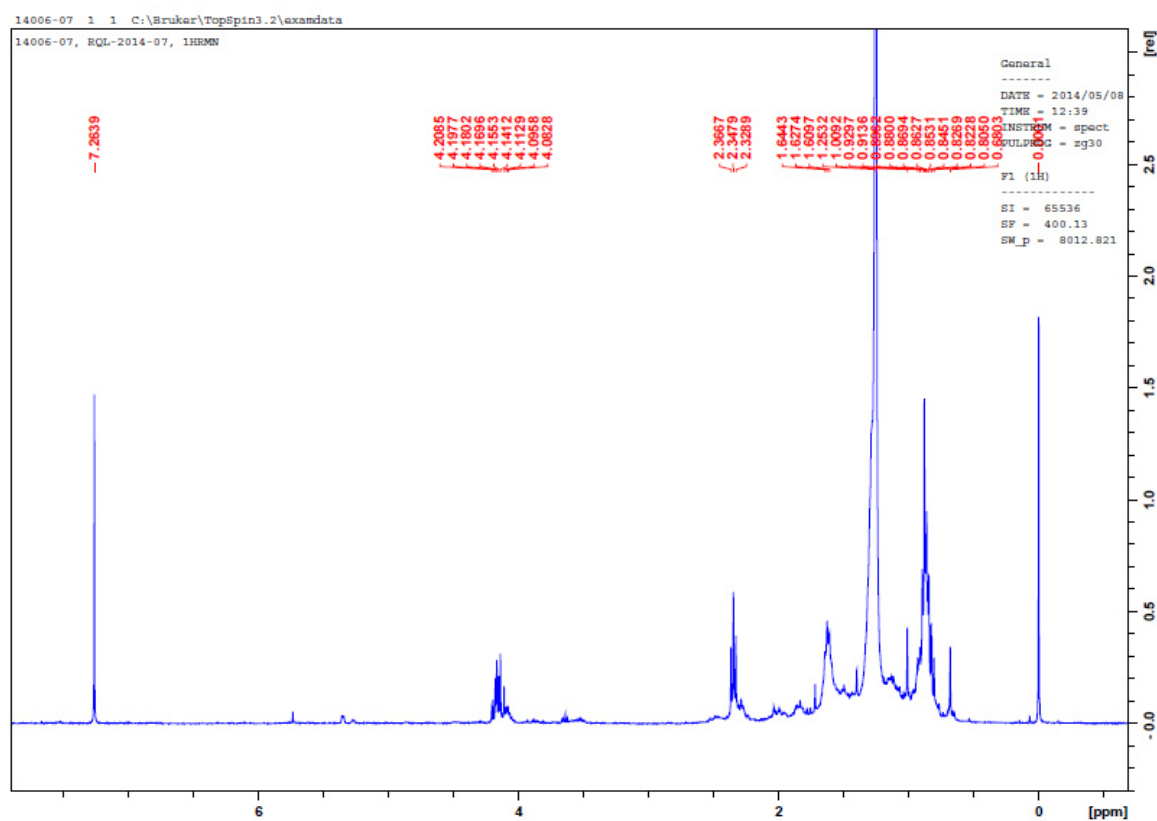
##### 6.4.4.1 Análisis de IR-ATR



**Figura 80.** Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C4.

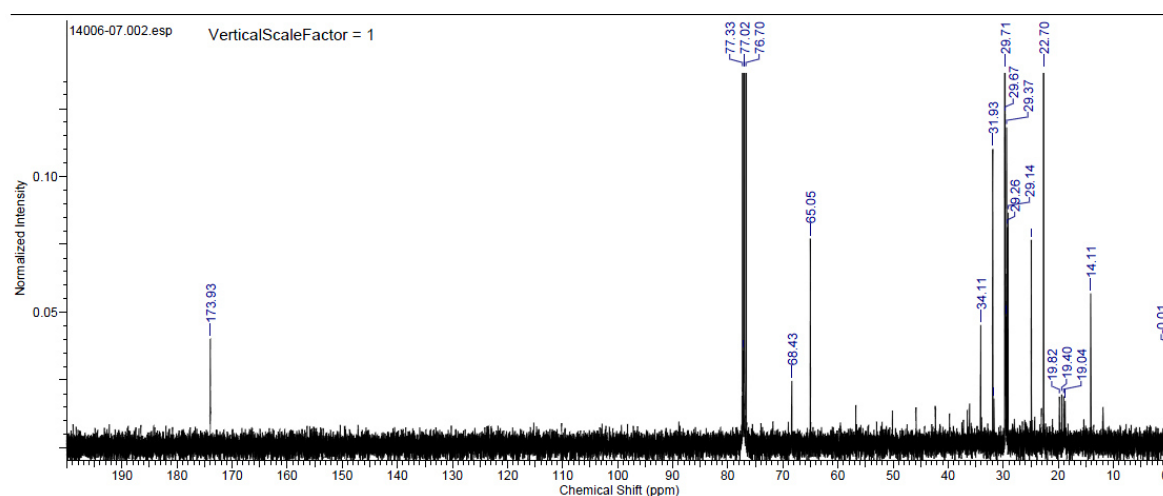
En el espectro de IR/ATR del compuesto **Pm-C4**, las señales de absorción más importantes fueron las siguientes:  $\nu_{\max} = 3478, 2914, 2849, 1734, 1471 \text{ cm}^{-1}$ . Estos datos revelan que la molécula no es de naturaleza aromática, sino alifática, donde predominan grupos metilos y metilenos. La banda amplia a  $3478 \text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos funcionales OH. Las bandas a  $2914$  y  $2849 \text{ cm}^{-1}$  revelan que la molécula posee gran cantidad de metilenos  $\text{CH}_2$ . La banda a  $1734 \text{ cm}^{-1}$  indica que el compuesto contiene grupos carbonilos.

#### 6.4.4.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 81.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN sin ampliar del compuesto Pm-C4 en  $\text{CDCl}_3$ .

En la figura anterior se descartaron las señales con los desplazamientos químicos 7.27 y 0 ppm, ya que corresponden al solvente  $\text{CHCl}_3$  sin deuterar y al estándar de referencia TMS, respectivamente. Un grupo de señales a 4.15 ppm, respaldan la presencia de grupos hidroxilos. La intensa señal singulete (s) a 1.25 ppm indica la presencia de múltiples grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ). La señal a 0.89 ppm, de multiplicidad triplete (t), representan grupos metilos ( $\text{CH}_3$ ). La señal a 0.89 ppm, un singulete (s), constituyen grupos metilos ( $\text{CH}_3$ ). Éstos resultados, en conjunto con los del análisis de IR-ATR, indican que el compuesto sea de naturaleza alifática, abundante en grupos metilenos y con al menos un grupo hidroxilo en su molécula.



**Figura 82.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Pm-C4 en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de la figura anterior se descartó la señal propia TMS y las señales cercanas a 77 ppm por pertenecer al  $\text{CHCl}_3$  sin deuterar. De esta manera quedan claras 20 señales. Una señal a 173.93 ppm indica la presencia de carbonilos ya sea de ésteres o ácidos carboxílicos. El resto de señales representan carbonos alifáticos. **Pm-C4**, a

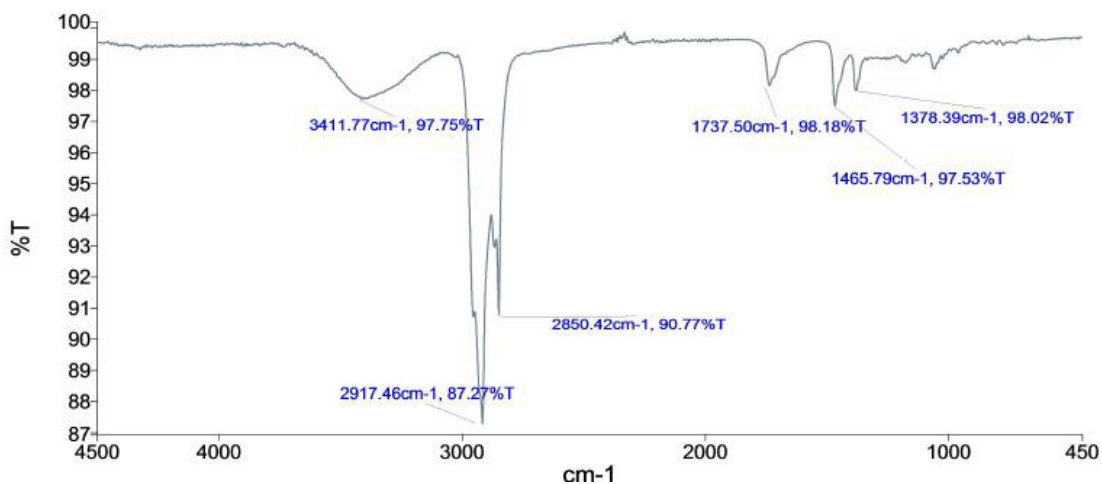
diferencia de **Pm-C2**, **Pm-C3** y **Pm-C5**, no posee carbonos olefínicos por la ausencia de señales propias de estos grupos, sin embargo, por la diversidad de carbonos que existen a campos altos, la molécula pudiera ser también de naturaleza esteroidea. En la siguiente tabla se resumen los datos de este análisis.

**Tabla 29.** Resumen de señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **Pm-C4**.

Señal	C(ppm)	Señal	C(ppm)
1	173.93	11	29.37
2	68.43	12	29.26
3	65.05	13	29.14
4	34.11	14	24.91
5	31.93	15	22.7
6	31.68	16	19.82
7	29.71	17	19.4
8	29.67	18	19.04
9	29.62	19	18.79
10	29.46	20	14.11

#### 6.4.4.3 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C5**

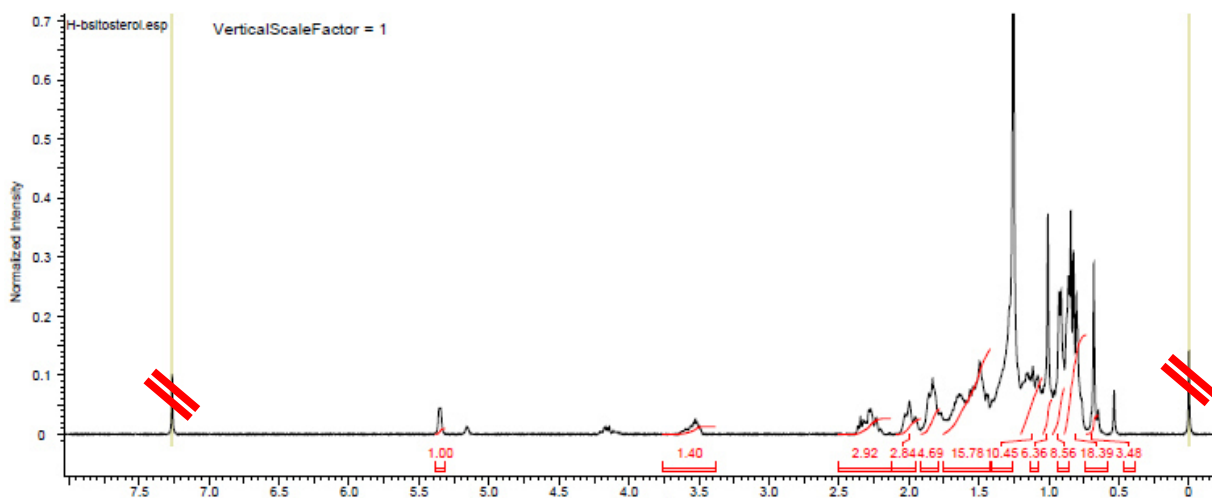
#### 6.4.4.4 Análisis del espectro de IR/ATR



**Figura 83.** Espectro de IR/ATR del compuesto **Pm-C5**.

Después de analizar el espectro de IR/ATR del compuesto **Pm-C5** se pudieron detectar claramente las siguientes las bandas de absorción:  $\nu_{\max} = 3411, 2917, 2850, 1737, 1465, 1378 \text{ cm}^{-1}$ . Nuevamente, estos datos revelan que la molécula no es de naturaleza aromática, sino alifática, donde predominan grupos metilos y metilenos. La banda amplia a  $3411 \text{ cm}^{-1}$  sugiere que la molécula posee al menos un grupo hidroxilo.

#### 6.4.4.5 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 84.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN sin ampliar del compuesto Pm-C5 en  $\text{CDCl}_3$ .

Tras hacer el análisis del espectro de  $^1\text{H}$  de **Pm-C5** (figura 84), se descartaron las señales con los desplazamientos químicos 7.26 y 0 ppm, ya que corresponden al solvente  $\text{CHCl}_3$  sin deutrar y al estándar de referencia TMS, respectivamente, así como la señal a 1.25 ppm ya que probablemente corresponde a contaminación por grasas. De esta forma quedaron asignadas 11 señales, A-K. Entre las señales más importantes se

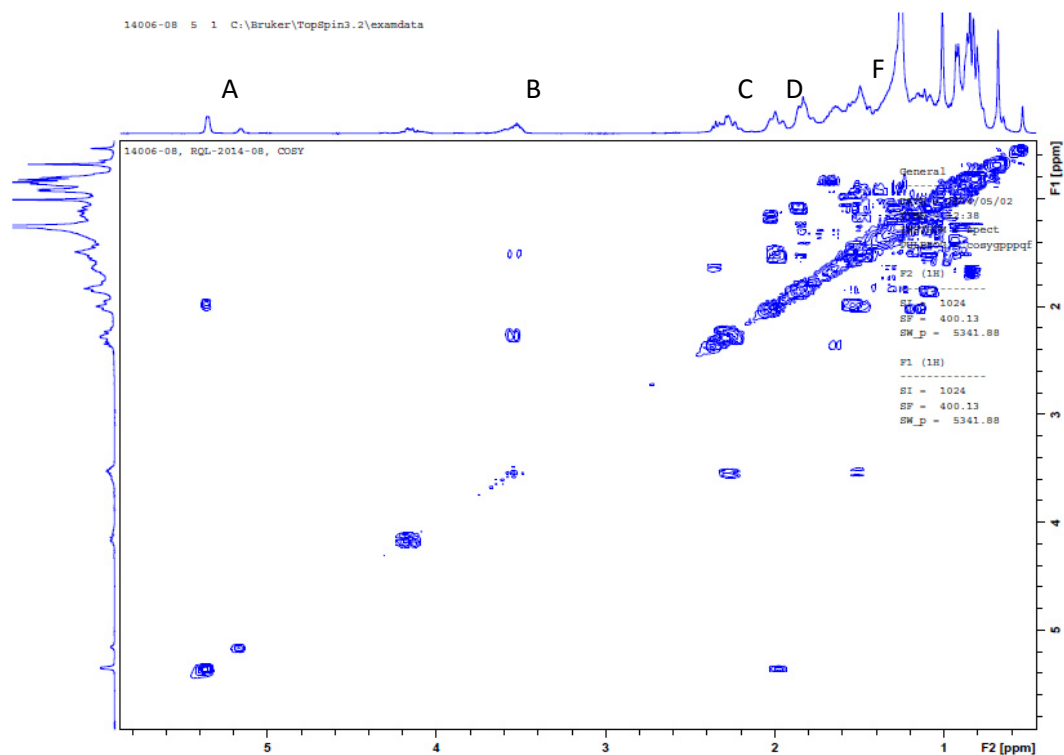
encuentran la señal A, 5.35 ppm de multiplicidad triplete (t), integrando para 1 hidrógeno y que probablemente corresponda a un protón unido a carbono olefínico. La señal B, 3.56 ppm, se trata de una señal multiplete (m), que integra para 1 hidrógeno y que probablemente se trate de un protón cercano a un grupo hidroxilo. El grupo de señales C-K son de difícil asignación debido al solapamiento entre ellas, sin embargo, este tipo de patrones son propios de moléculas esteroidales. En general, estas señales respaldan el hecho de que la molécula no es un compuesto aromático y de que posee al menos un grupo hidroxilo, así como gran cantidad de grupo CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. El resumen de este análisis se representa en la siguiente tabla:

**Tabla 30.** Resumen de señales del espectro de <sup>1</sup>H del compuesto **Pm-C5**.

Señal	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración	
A	5.35	t	1 H	
B	3.56	m	1 H	
C	2.28	m	47 H	
D	2.03	m		
E	1.87	m		
F	1.52	m		
G	1.13	m		
H	1.01	m		
I	0.91	m		
J	0.83	m		
K	0.68	s		3 H

Además, se llevó a cabo un análisis COSY para identificar las correlaciones entre dos protones (figura 85).





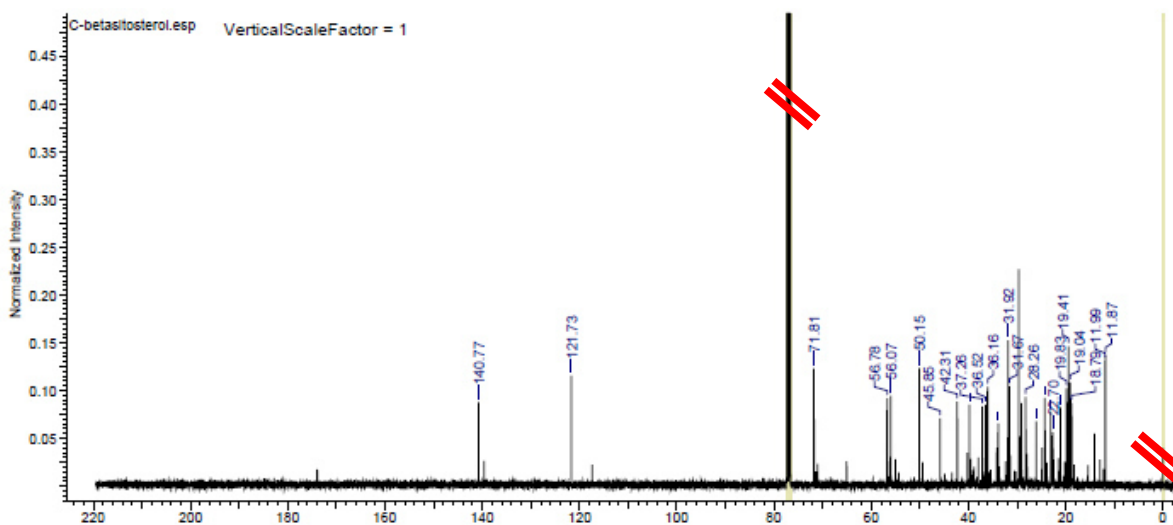
**Figura 85.** Espectro de COSY del compuesto Pm-C5 en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de COSY se observaron dos correlaciones claras, una entre el hidrógeno olefínico (5.35 ppm) y un protón en el área de alifáticos (2.09 ppm), y otra entre un hidrógeno cercano a un oxígeno (3.56 ppm) y un hidrógeno alifático (2.28 ppm). Como en el caso del Lofenol, en la región que comprende entre 0.5-2.5 ppm se aprecian varios acoplamientos sobrelapados que son difíciles de correlacionar. En la siguiente tabla se resumen los resultados:

**Tabla 31.** Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto **Pm-C5**.

Señal	Correlación
A	D
B	C, F

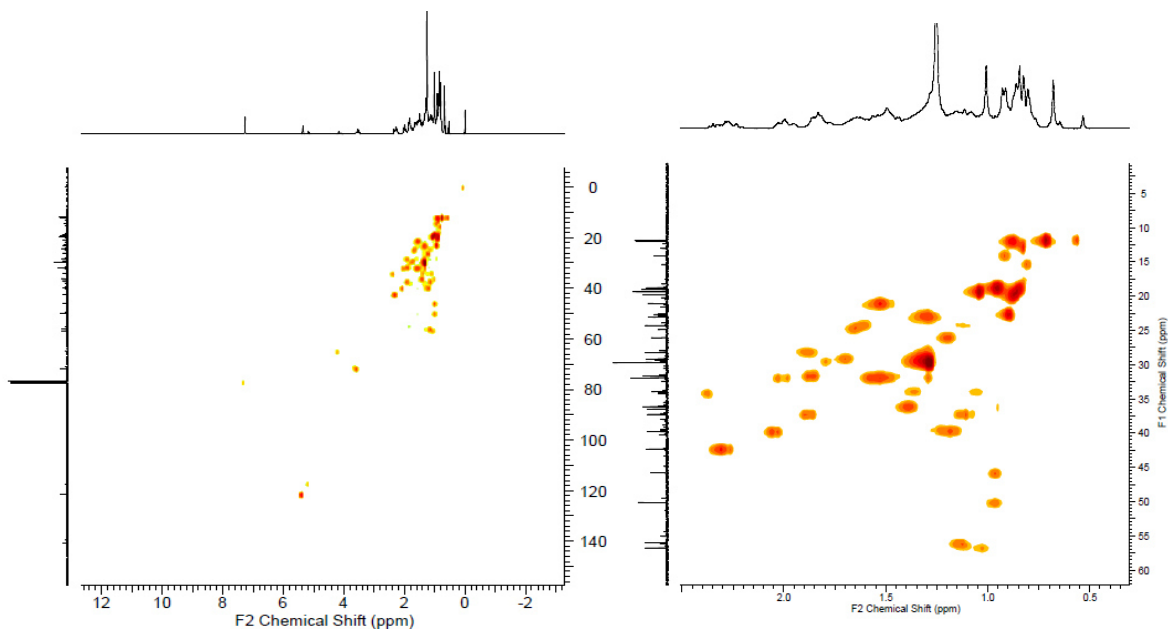
#### 6.4.4.6 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$



**Figura 86.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto Pm-C5 en  $\text{CDCl}_3$ .

Tras el análisis del espectro de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **Pm-C5** (figura 86), y descartando las señales propias del solvente y el estándar de referencia, se detectaron 30 señales de carbono diferentes, empero, como en el caso del espectro de  $^1\text{H}$ , se descartó aquella que corresponde a contaminación por grasas, la señal a 29.72 ppm. De esta manera quedó claro la presencia de 29 señales. Los desplazamientos a 140.77 y 121.7 ppm corresponden a carbonos olefínicos; por su alto desplazamiento químico, la señal a 71.8 ppm pertenece a un carbono unido a un elemento altamente electronegativo, seguramente al grupo hidroxilo ya detectado en los análisis previos. El resto de señales, que oscilan entre 60 y 11 ppm, pertenecen a carbonos alifáticos.

Un análisis de HSQC se llevó a cabo (figura 87) con el fin de determinar los acoplamientos C-H a un enlace.



**Figura 87.** Espectros de HSQC del compuesto Pm-C5. A la izquierda, espectro general; a la derecha, espectro ampliado en el área de 1H: 0-2.5 ppm, 13C: 0-60 ppm.

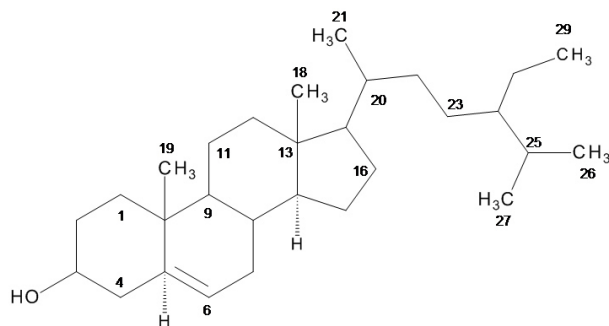
Una vez establecidos los acoplamientos C-H a un enlace mediante HSQC, se pudo confirmar que las señales 140.77, 42.31 y 36.52 ppm pertenecen a carbonos cuaternarios al no poseer ningún acoplamiento con ninguna señal de protones. Un resumen de los análisis de  $^{13}\text{C}$  y HSQC se muestra en la tabla 28.

Con todos los datos recopilados de las técnicas ya descritas, y comparando con los datos espectroscópicos reportados en la literatura (Patra *et al.*, 2010) y en el portal de internet Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB-BS, 2015), se llegó a la

conclusión de que la identidad de **Pm-C5** es el  $\beta$ -sitosterol, de fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O$  (figura 88). Aunque este fitosterol es muy abundante en la naturaleza, nunca se había reportado con anterioridad en *P. marginatus*.

**Tabla 32.** Resumen de señales de los espectros de  $^{13}C$ -RMN y HSQC del compuesto **Pm-C5**.

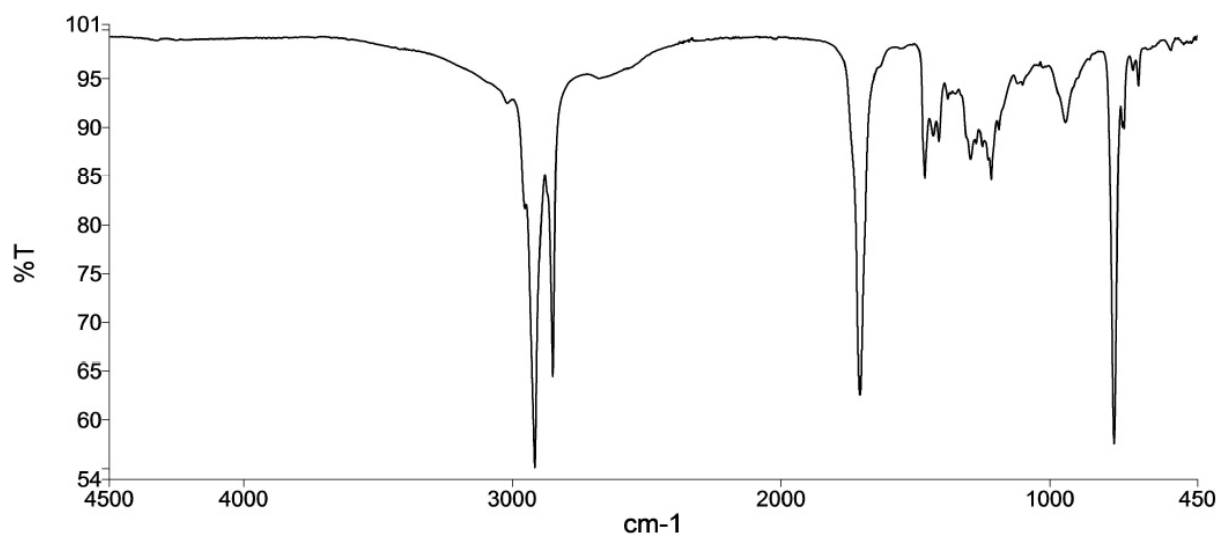
Señal	$^{13}C$ ( $\delta$ )	$^1H$ ( $\delta$ )	Señal	$^{13}C$ ( $\delta$ )	$^1H$ ( $\delta$ )
1	140.77	-	16	31.67	1.52
2	121.73	5.35	17	29.16	
3	71.81	3.56	18	28.26	1.87
4	56.78		19	26.09	1.18
5	56.07		20	24.32	
6	50.15		21	23.08	
7	45.85		22	22.7	
8	42.33	2.28	23	21.1	
9	42.31	-	24	19.83	
10	39.79		25	19.41	1.01
11	37.26		26	19.04	
12	36.52	-	27	18.79	0.91
13	36.16		28	11.99	0.87
14	33.96		29	11.87	0.68
15	31.92	2.03			



**Figura 88.** Estructura del compuesto Pm-C5,  $\beta$ -sitosterol.

## 6.4.5 Análisis espectroscópico del compuesto **Pm-C6**

### 6.4.5.1 Análisis de IR/ATR

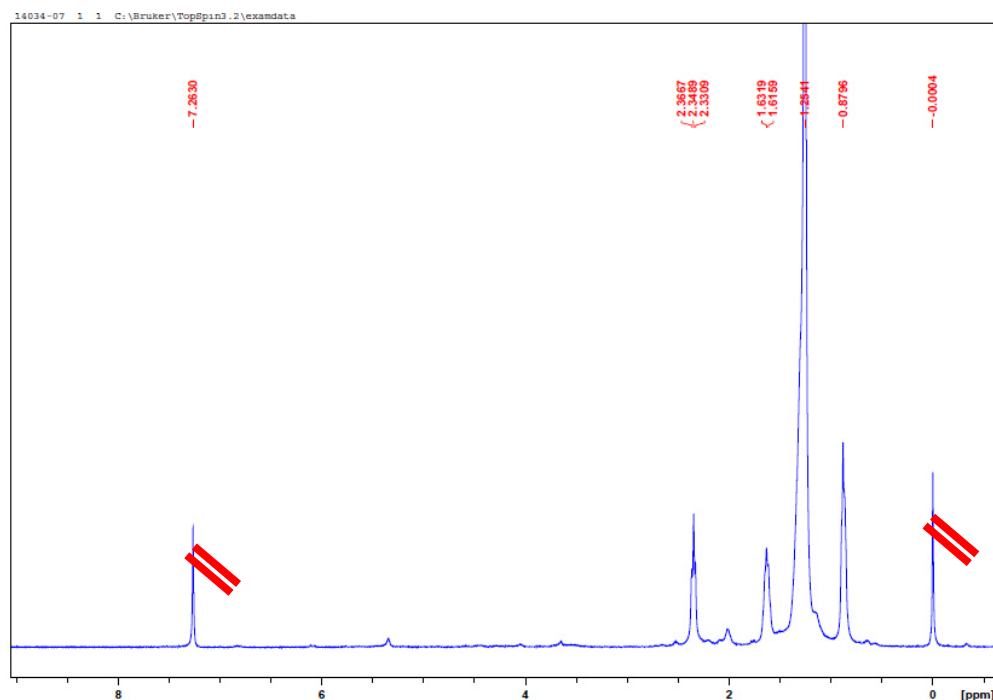


**Figura 89.** Espectro de IR/ATR del compuesto Pm-C6.

En el espectro de IR/ATR del compuesto C# las señales de absorción más importantes fueron las siguientes:  $\nu_{\max} = 2917, 2849, 2700, 1705, 1464, 757 \text{ cm}^{-1}$ . Estos datos revelan que la molécula no es de naturaleza aromática, sino alifática, donde

predominan grupos metilos y metilenos. La banda a  $1705\text{ cm}^{-1}$  sugiere que el compuesto posee al menos un grupo carbonilo. Además, se puede apreciar una banda a  $2700\text{ cm}^{-1}$  propia de grupos hidroxilo de ácidos carboxílicos, sin embargo, su intensidad se vio reducida probablemente debido a la abundancia de metilos y metilenos que opacan ésta señal.

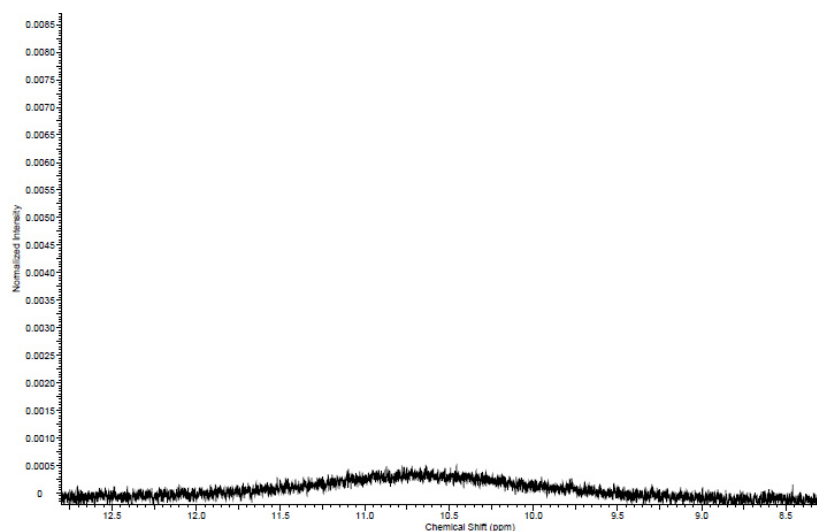
### Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 90.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN sin ampliar del compuesto Pm-C6.

En la figura anterior se descartaron las señales con los desplazamientos químicos 7.26 y 0 ppm, ya que corresponden al solvente  $\text{CHCl}_3$  sin deuterar y al estándar de referencia

TMS, respectivamente. De esta forma quedan claras la presencia de 4 señales: la señal a 2.35 ppm se trata de una señal triplete (t), que integra para 2 hidrógenos y representa 1 grupo metileno. La señal de desplazamiento químico 1.62 ppm posee una multiplicidad tipo multiplete (m), que integra para 2 hidrógenos y representa 1 grupo metileno. La señal con un desplazamiento de 1.25 ppm y aparentemente un multiplete (m), integra para 24 hidrógenos, sugiriendo la presencia de 12 metilenos. Finalmente, la señal con un desplazamiento químico de 0.88 ppm, posee una multiplicidad tipo triplete (t) e integra para 3 hidrógenos, lo que indica la presencia de 1 grupo metilo. En el espectro de IR-ATR ya mostrado se detectó una banda propia grupos hidroxilo de ácidos carboxílicos, grupo funcional que no se observa claramente en el espectro de  $^1\text{H}$ , sin embargo, al hacer una ampliación en la región 8.5-12.5 ppm se pudo apreciar con más detalle la señal correspondiente a un hidrógeno de ácido carboxílico, la cual es muy débil y ancha (figura 91).



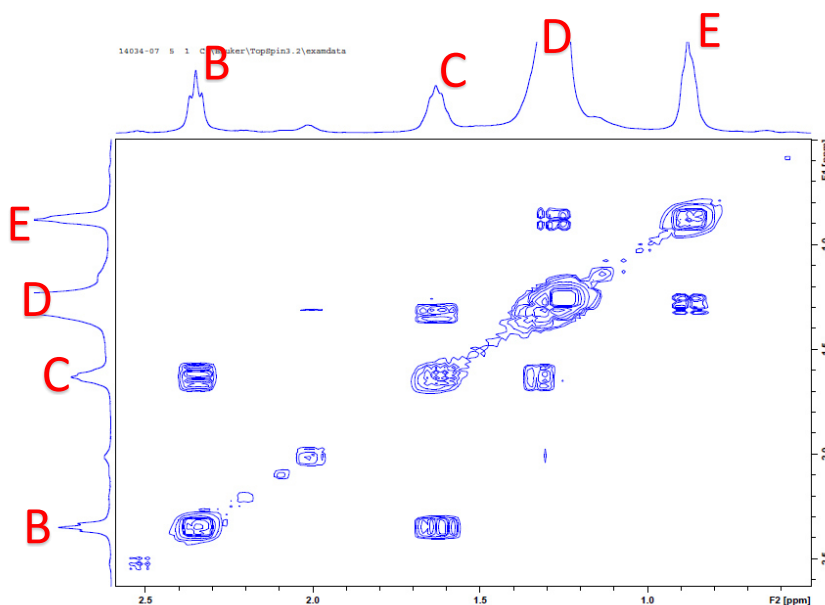
**Figura 91.** Espectro de  $^1\text{H}$  ampliado (12.5-8.5 ppm) del compuesto Pm-C6

Incluyendo esta señal débil de ácidos carboxílicos, se resumen los datos obtenidos de éste espectro en la siguiente tabla:

**Tabla 33.** Resumen de señales del espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto **Pm-C6**.

Señal	$\delta$	Multiplicidad	Integración	Interpretación
A	10.7	s	1 H	COOH
B	2.35	t	2 H	CH <sub>2</sub>
C	1.62	m	2 H	CH <sub>2</sub>
D	1.25	m	24 H	12 CH <sub>2</sub>
E	0.88	t	3	CH <sub>3</sub>

Aunado a esto, también se realizó un análisis bidimensional de COSY para detectar las correlaciones entre señales de protones vecinos (figura 92).



**Figura 92.** Espectro de COSY ampliado del compuesto Pm-C6.

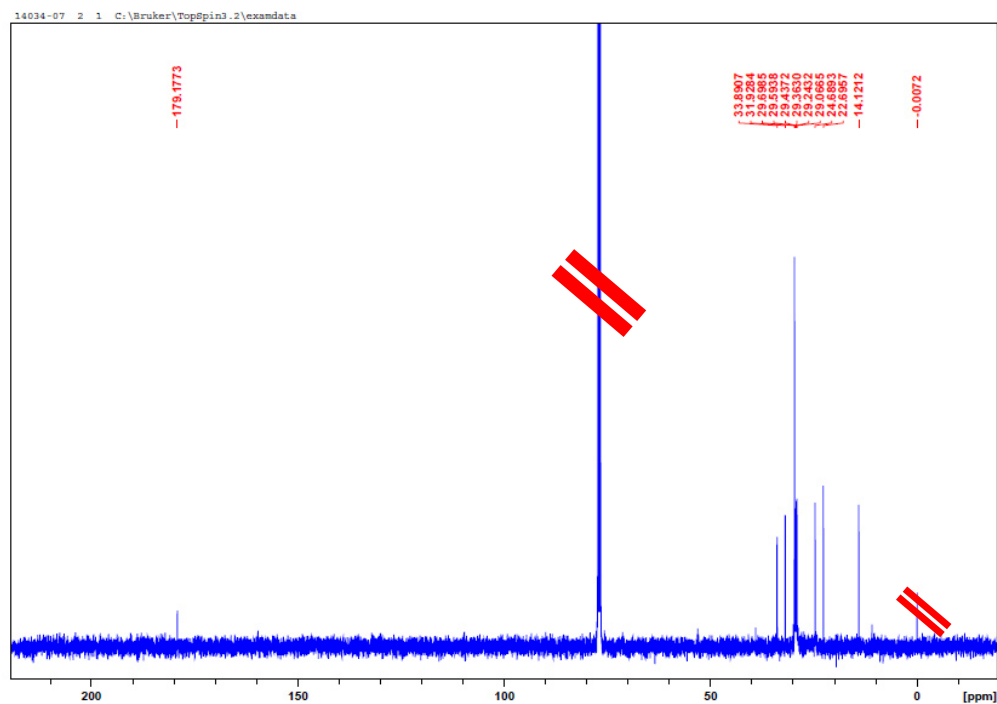


En el espectro de COSY de la figura anterior, se puede observar que la señal B posee una correlación con la señal C, C con D y, finalmente, D con E. En la siguiente tabla se resumen los resultados:

**Tabla 34.** Resumen de correlaciones del espectro COSY del compuesto **Pm-C6**.

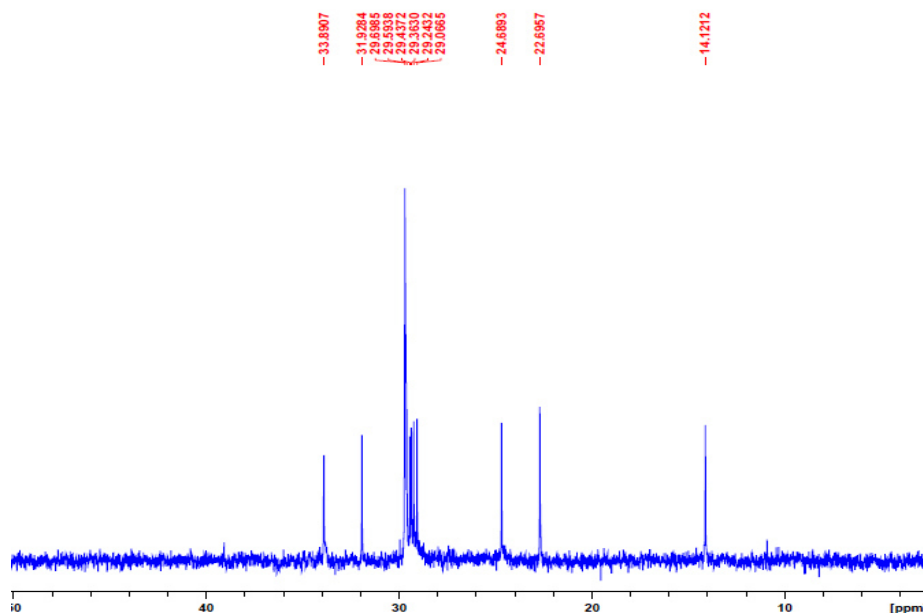
Señal	Correlación
A	-
B	C
C	D
D	E

#### 6.4.5.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$



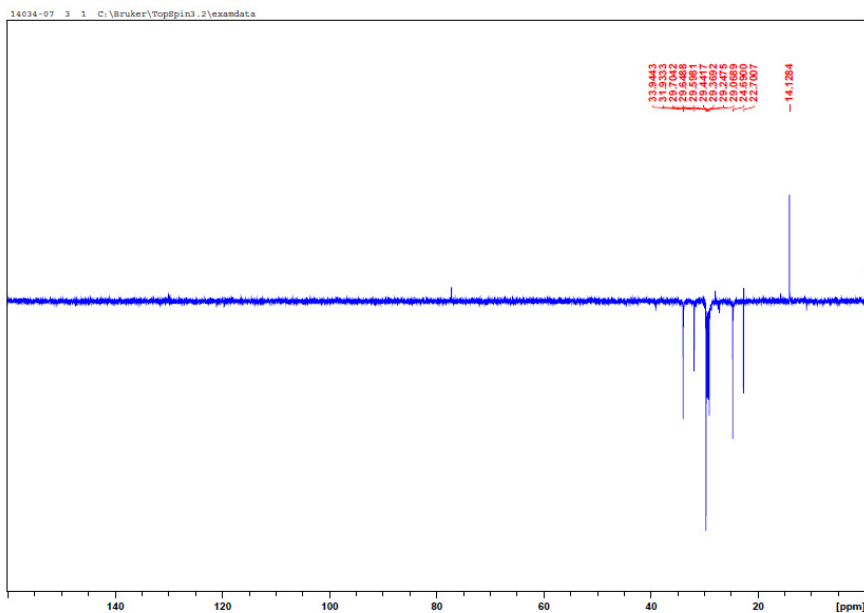
**Figura 93.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN sin ampliar del Pm-C6.

Ignorando las señales propias del solvente  $\text{CHCl}_3$  sin deuterar (77 ppm) y del TMS (0 ppm), se pudieron detectar 12 señales diferentes. La señal a 179.17 ppm pertenece a un carbono de grupo carbonilo, lo que respalda la presencia de un grupo de ácido carboxílico en la estructura del compuesto. Las señales ubicadas entre 40 y 14 ppm pertenecen a carbonos alifáticos, donde destaca la señal a 29.7 ppm, cuya intensidad probablemente se deba a que representa más de un carbono.



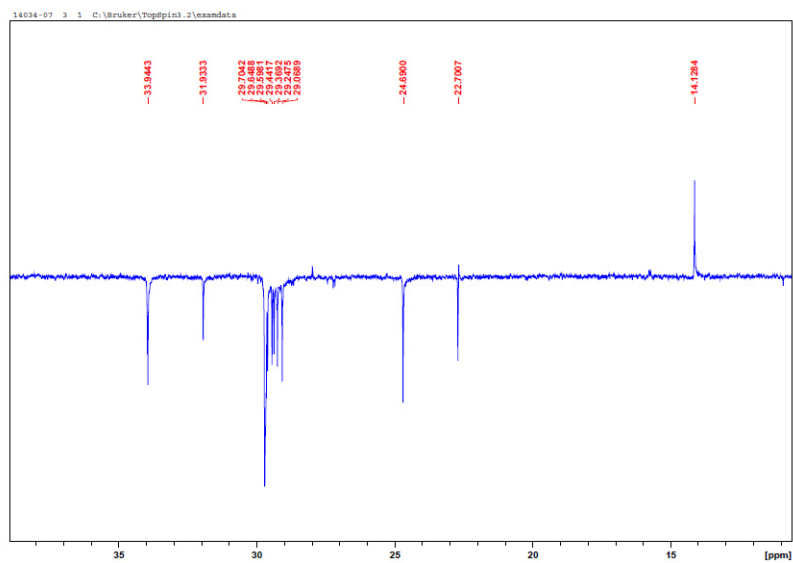
**Figura 94.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN ampliado (0 – 50 ppm) del Pm-C6.

Además, se realizó un análisis mediante DEPT-135 (figura 95) con el fin de determinar el número de hidrógenos enlazados a cada carbono.



**Figura 95.** Espectro de DEPT-135 sin ampliar del Pm-C6.

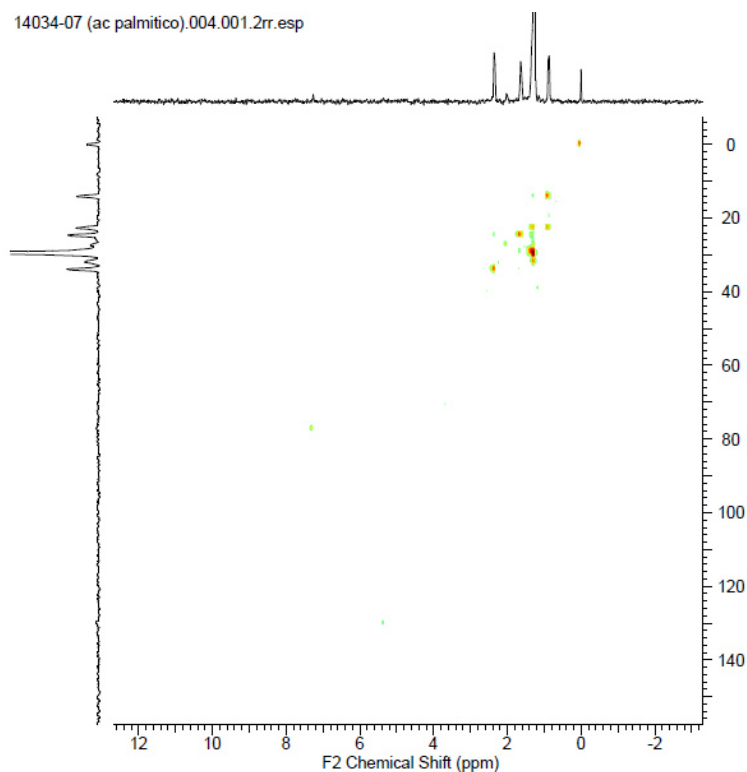
En la figura anterior se pudo apreciar que la señal que antes aparecía en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN con desplazamiento químico 179.11 ppm ya no aparece, indicando que se trata de un carbono cuaternario (Cq).



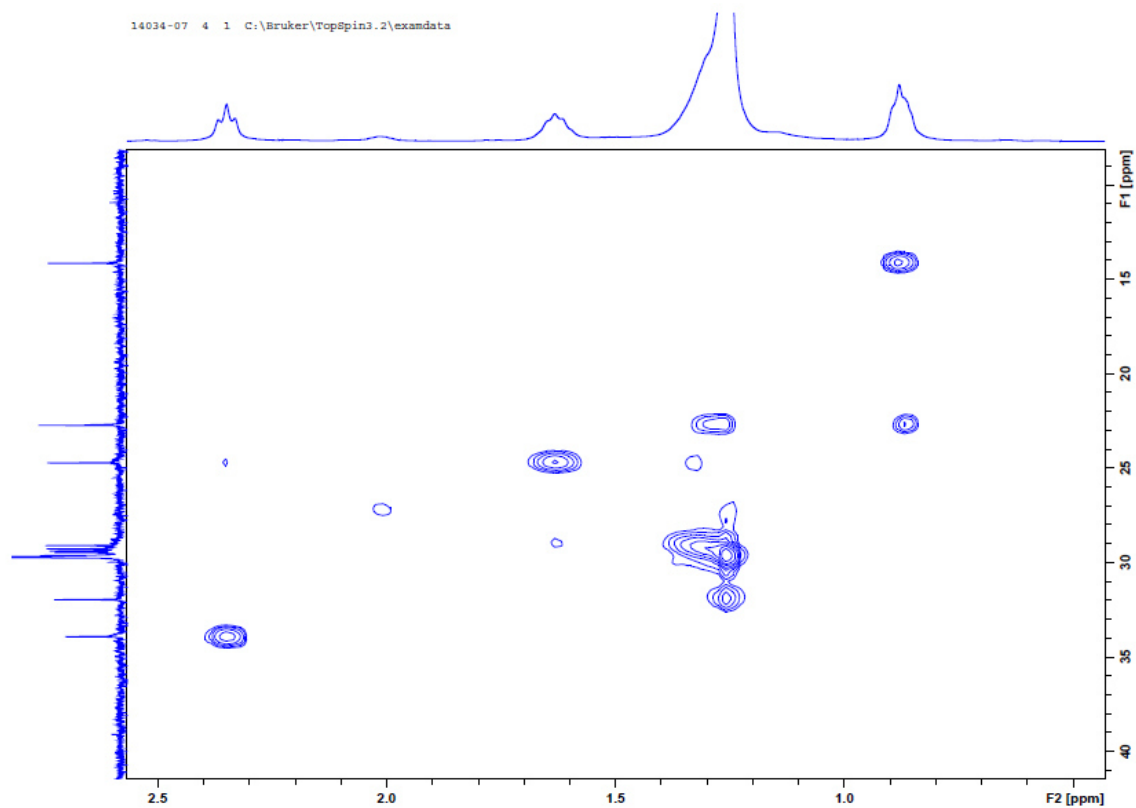
**Figura 96.** Espectro de DEPT-135 ampliado (0-35 ppm) del Pm-C6.

Al realizar una ampliación al espectro de DEPT-135 (figura 96) se pudieron identificar 10 señales diferentes, entre 34 y 22 ppm, pertenecientes a grupos metilenos, además de una señal 14.12 ppm que, sin lugar a dudas, se trata de un grupo metilo.

En la figura 97 se muestra el espectro de HSQC del compuesto **Pm-C6**, en el cual podemos observar los acoplamientos C-H a un enlace. Se pudo apreciar que las señales se concentran en una sola región ( $^1\text{H}$ : 0-2.5 ppm;  $^{13}\text{C}$ : 0-40 ppm), esto explica que la señal a 179.17 ppm del espectro de  $^{13}\text{C}$  se trata de un carbono cuaternario ya que no existe una correlación entre esta señal y alguna del espectro de  $^1\text{H}$ .



**Figura 97.** Espectro de HSQC del compuesto Pm-C6.

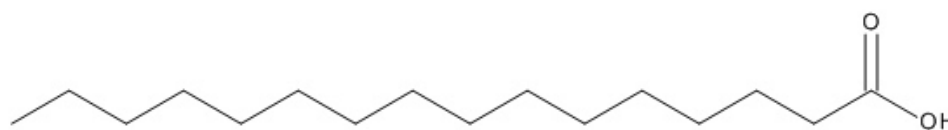


**Figura 98.** Espectro de HSQC ampliado ( $^1\text{H}$ : 0-2.5 ppm;  $^{13}\text{C}$ : 0-40 ppm) de Pm-C6.

**Tabla 35.** Resumen de señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135 y HSQC de Pm-C6.

Señal	C(ppm)	C(tipo)	$^1\text{H}$ (ppm)
<b>1</b>	179.17	Cq	-
<b>2</b>	33.89	CH <sub>2</sub>	2.35
<b>3</b>	31.83	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>4</b>	29.7	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>5</b>	29.59	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>6</b>	29.43	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>7</b>	29.36	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>8</b>	29.24	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>9</b>	29.07	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>10</b>	24.69	CH <sub>2</sub>	1.62
<b>11</b>	22.7	CH <sub>2</sub>	1.25
<b>12</b>	14.12	CH <sub>3</sub>	1.25

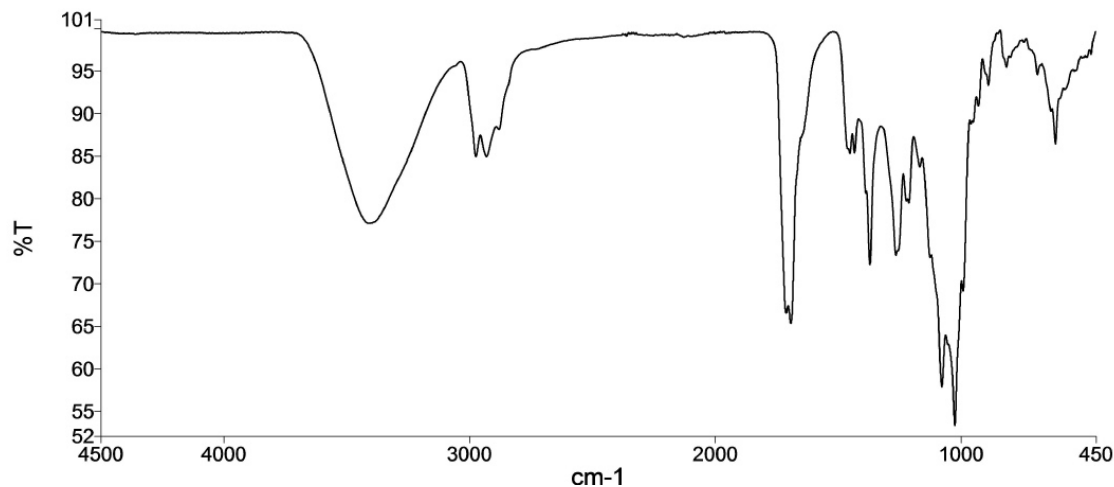
El análisis conjunto de las técnicas antes descritas aplicadas a **Pm-C6** junto con la comparación con la Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB-PA, 2015), nos permitió identificarlo como ácido palmítico, de peso molecular  $C_{16}H_{32}O_2$  (figura 99). Al igual que con el  $\beta$ -sitosterol, el ácido palmítico es un compuesto muy abundante en los seres vivos, pero no había sido reportada su presencia en *P. marginatus*.



**Figura 99.** Estructura del compuesto Pm-C6, ácido palmítico.

#### 6.4.6 Análisis espectroscópico del compuesto **Is-C1**

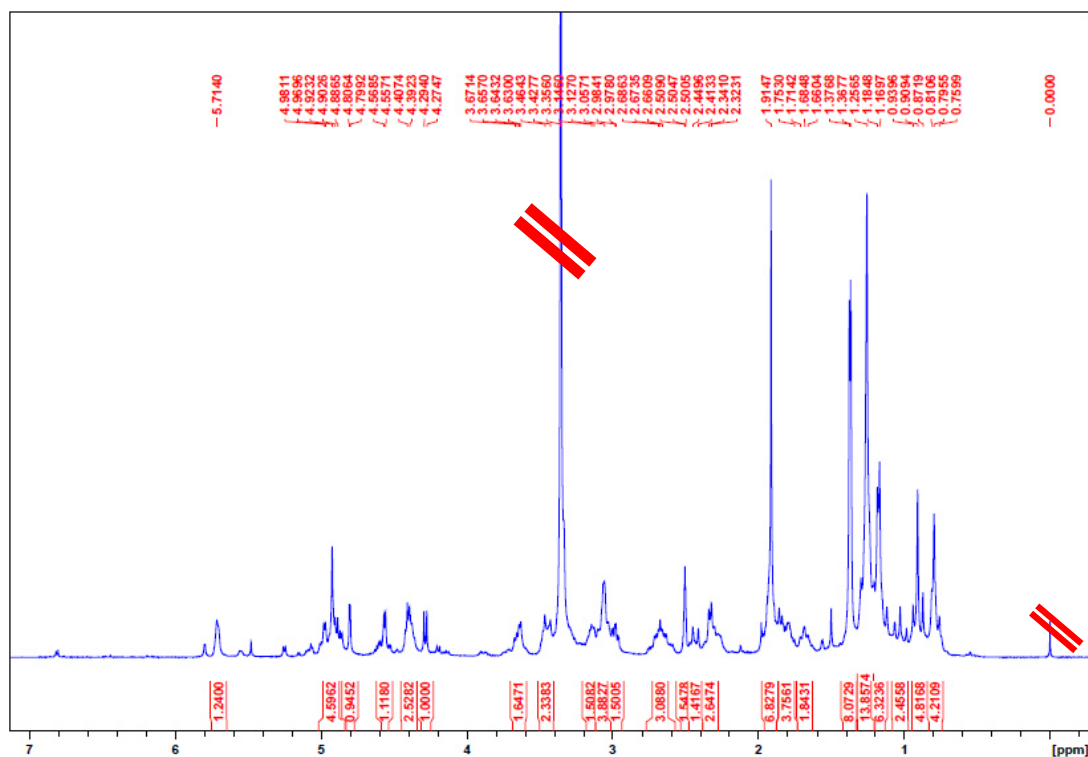
##### 6.4.6.1 Análisis de IR-ATR



**Figura 100.** Espectro de IR/ATR del compuesto Is-C1.

En el espectro de IR/ATR del compuesto **Is-C1** las señales de absorción más importantes fueron las siguientes:  $\nu_{\max} = 3410, 2975, 2932, 1710 \text{ cm}^{-1}$ . Estos datos revelan que la molécula es de naturaleza alifática. La banda amplia a  $3410 \text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos funcionales OH. Las bandas a  $2975$  y  $2932 \text{ cm}^{-1}$  revelan la presencia de grupos metilos y metilenos. La banda a  $1710 \text{ cm}^{-1}$  indica que la molécula tiene grupos carbonilo, y por su intensidad sugiere que se traten de varios de éstos grupos.

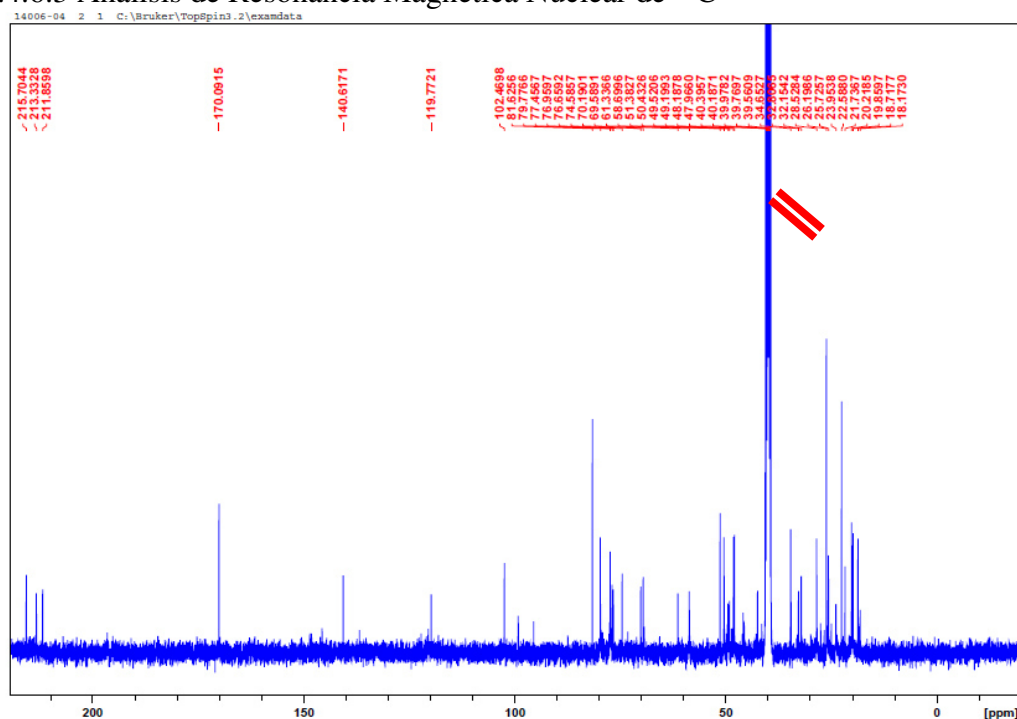
#### 6.4.6.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 101.** Espectro general de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **Is-C1** en  $\text{DMSO-d}_6$ .

Una vez descartadas las señales propias del H<sub>2</sub>O (3.32 ppm) y del DMSO sin deutero (2.48 ppm) de la figura anterior, se procedió analizar el resto de señales. Al no poseer señales por encima de las 7 ppm se confirma que la estructura no es de carácter aromático, sino alifático. La señal A (5.71 ppm) delata la presencia de un hidrógeno unido a carbono olefínico. Las señales B (4.92 ppm), C (4.80 ppm), D (4.56 ppm), E (4.40 ppm) y F (4.28 ppm) probablemente representen hidrógenos de alcoholes.

#### 6.4.6.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C



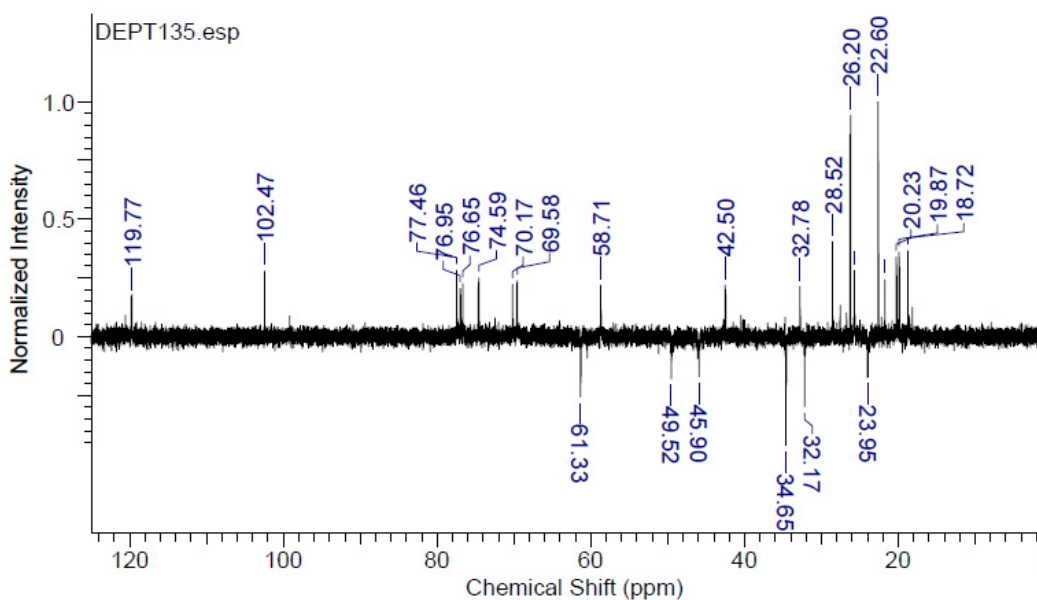
**Figura 102.** Espectro general de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto Is-C1 en DMSO-d<sub>6</sub>.

Tras el análisis de <sup>13</sup>C del compuesto **Is-C1** y descartando la señal propia del solvente sin deutero (39.5 ppm) se pudieron apreciar 33 señales correspondientes al compuesto mencionado. Destacan las señales a 215.7, 213.33 y 211.85 ppm que representan



carbonos de grupos carbonilos. La señal a 170.09 ppm sugiere la presencia grupo éster. Las señales 140.6 y 120.4 ppm seguramente corresponden a carbonos olefínicos. El resto de señales a campos más altos corresponden a carbonos alifáticos.

Posteriormente, se realizó un análisis por DEPT-135 (figura 103).



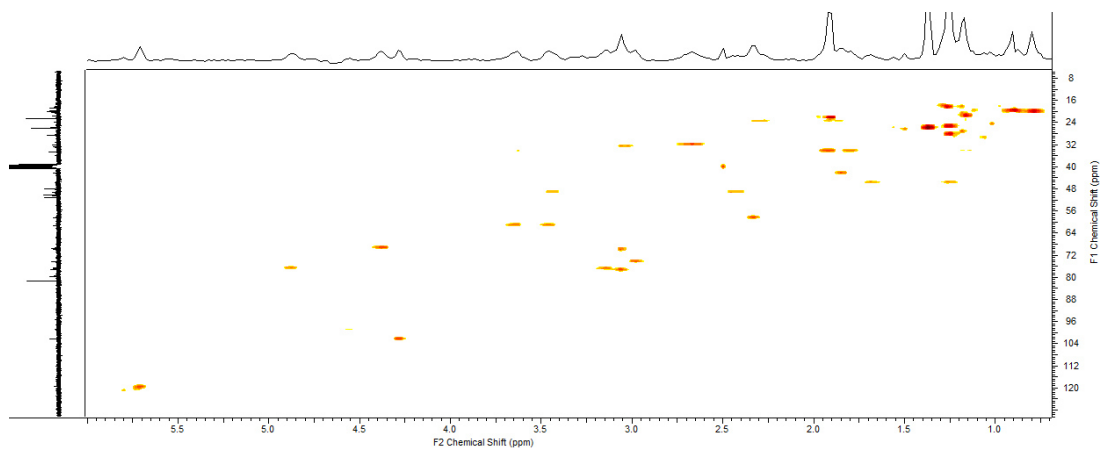
**Figura 103.** Espectro de DEPT-135 del compuesto Is-C1 en DMSO-d6.

En el espectro anterior se pudieron detectar la ausencia de 12 señales previamente observadas en  $^{13}\text{C}$ -RMN, delatando que se tratan de carbonos cuaternarios. Además, se pudieron identificar 6  $\text{CH}_2$  y, por sus desplazamientos químicos, 11 CH y 9  $\text{CH}_3$ . Los resultados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

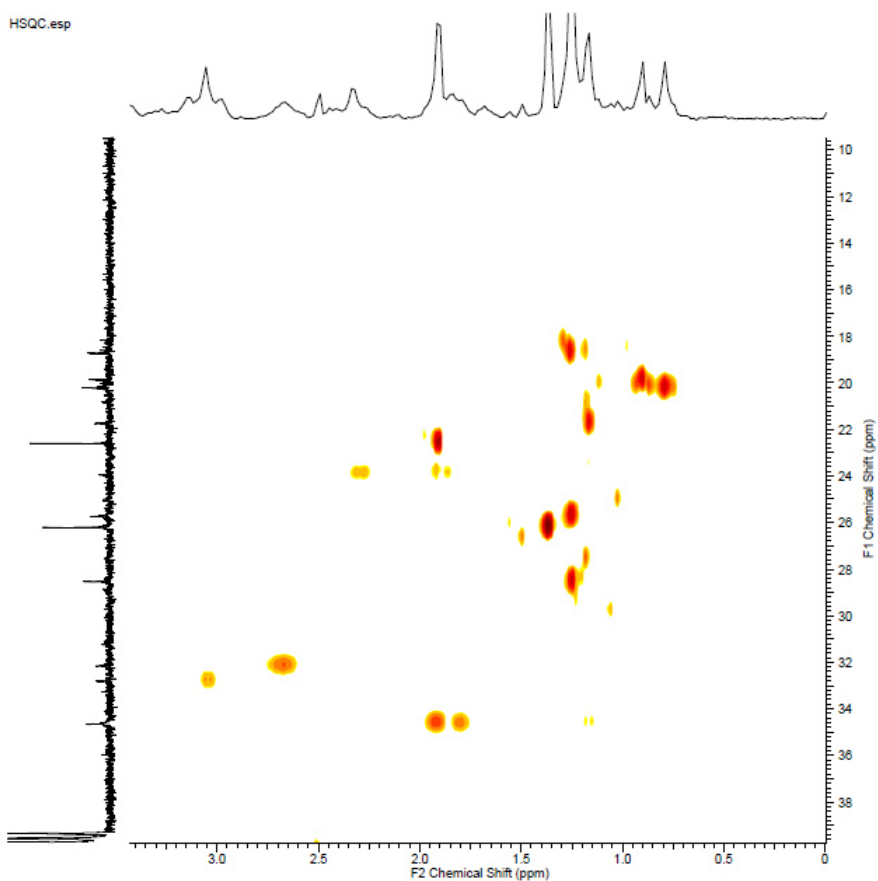
**Tabla 36.** Resumen de señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 de **Is-C1**.

Señal	$\delta$ (ppm)	Tipo de Carbono	Señal	$\delta$ (ppm)	Tipo de Carbono
1	18.72	CH <sub>3</sub>	20	50.44	Cq
2	19.87	CH <sub>3</sub>	21	51.39	Cq
3	20.23	CH <sub>3</sub>	22	58.72	CH
4	21.74	CH <sub>3</sub>	23	61.36	CH <sub>2</sub>
5	22.59	CH <sub>3</sub>	24	69.59	CH
6	23.95	CH <sub>2</sub>	25	70.19	CH
7	25.74	CH <sub>3</sub>	26	74.6	CH
8	26.2	CH <sub>3</sub>	27	76.66	CH
9	26.23	CH <sub>3</sub>	28	76.97	CH
10	28.54	CH <sub>3</sub>	29	77.46	CH
11	32.15	CH <sub>2</sub>	30	79.79	Cq
12	32.81	CH	31	81.63	Cq
13	34.66	CH <sub>2</sub>	32	102.48	CH
14	42.51	CH	33	119.78	CH
15	45.9	CH <sub>2</sub>	34	140.63	Cq
16	47.98	Cq	35	170.1	Cq
17	48.19	Cq	36	211.87	Cq
18	49.21	Cq	37	213.34	Cq
19	49.52	CH <sub>2</sub>	38	215.71	Cq

En la figura 104 se muestra el espectro de HSQC del compuesto **Is-C1**, en el cual podemos observar los acoplamiento C-H a un enlace. Se pudo confirmar que las señales 16, 17, 18, 20, 21, 30, 31, 34, 35, 36, 37 y 38 (ver tabla 32) representaban carbonos cuaternarios ya que no mostraban acoplamiento con ninguna señal de  $^1\text{H}$ . Tras un análisis detallado a campos altos (ver ampliación, figura 105), la señal 6 (23.95 ppm) se pudo identificar como un CH<sub>2</sub> por sus acoplamiento con dos señales distintas de protones (2.28 y 1.91 ppm); de ésta forma se logró diferenciar éste metileno de los metilos con desplazamientos químicos cercanos.



**Figura 104.** Espectro de HSQC sin ampliar del compuesto Is-C1.



**Figura 105.** Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-3.5 ppm; 13C: 0-40 ppm) del compuesto Is-C1.

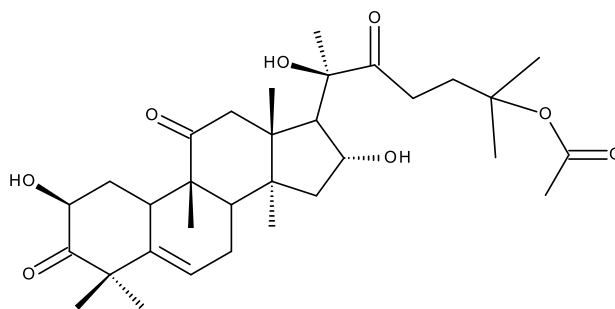
A pesar de los esfuerzos realizados no se consiguió llegar a una estructura molecular definitiva, sin embargo, se pudo concluir que la sustancia se trataba de una cucurbitacina debido a la presencia de señales características de las mismas, además de que éstas mostraban una gran similitud con las señales de la literatura consultada (Jacobs *et al.*, 1990; ver tabla 33)

**Tabla 37.** Comparación de las señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **Is-C1** con las del compuesto **3** descrito por Jacobs *et al.*

Señal	$\delta$ (ppm) de Is-C1	$\delta$ (ppm) de 3 <sup>b</sup>	Señal	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) de 3 <sup>b</sup>
<b>1</b>	18.72	18.7	<b>20</b>	50.44	50.2
<b>2</b>	19.87	19.8	<b>21</b>	51.39	50.6
<b>3</b>	20.23	20	<b>22</b>	58.72	57.8
<b>4</b>	21.74	21.2	<b>23</b>	61.36	-
<b>5</b>	22.59	22.4	<b>24</b>	69.59	70.8
<b>6</b>	23.95	23.8	<b>25</b>	70.19	71.6
<b>7</b>	25.74	24.4	<b>26</b>	74.6	-
<b>8</b>	26.2	25.8	<b>27</b>	76.66	-
<b>9</b>	26.23	26.1	<b>28</b>	76.97	-
<b>10</b>	28.54	29.3	<b>29</b>	77.46	-
<b>11</b>	32.15	30.6	<b>30</b>	79.79	78.9
<b>12</b>	32.81	33.7	<b>31</b>	81.63	81.2
<b>13</b>	34.66	34.7	<b>32</b>	102.48	-
<b>14</b>	42.51	35.9	<b>33</b>	119.78	120.4
<b>15</b>	45.9	42.3	<b>34</b>	140.63	140.3
<b>16</b>	47.98	45.4	<b>35</b>	170.1	170.3
<b>17</b>	48.19	48.3	<b>36</b>	211.87	212.1
<b>18</b>	49.21	48.4	<b>37</b>	213.34	213
<b>19</b>	49.52	48.7	<b>38</b>	215.71	213.9

Analizando la tabla comparativa anterior se puede observar que la cucurbitacina **3** (ver figura 106), un derivado de Cucurbitacina B, posee casi el mismo número de señales y desplazamientos químicos que el nuestro, difiriendo en **3** la ausencia de las señales a 61.36, 74.6, 76.66, 76.97, 77.46 y 102.48 ppm. Estas últimas señales podrían

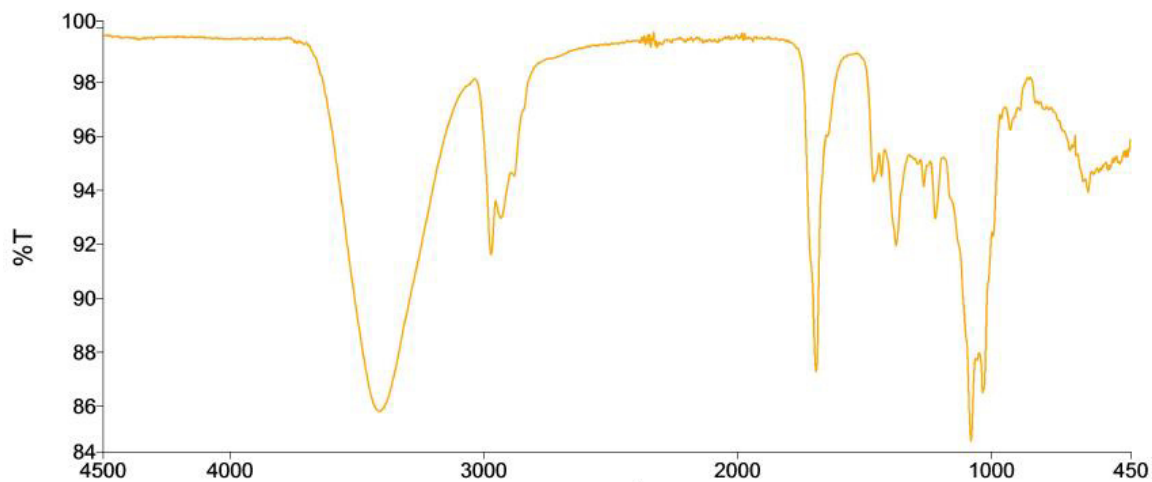
pertenecer a un glúcido unido a la molécula principal, esto propuesto tras haber comparado con los desplazamientos químicos de cucurbitacinas glicosiladas en la literatura (Seger *et al.*, 2005); de ser así, **Is-C1** podría tratarse una cucurbitacina glicosilada.



**Figura 106.** Compuesto 3, un derivado de Cucurbitacina B y posible estructura base de Is-C1.

#### 6.4.7 Análisis espectroscópico del compuesto **Is-C2**

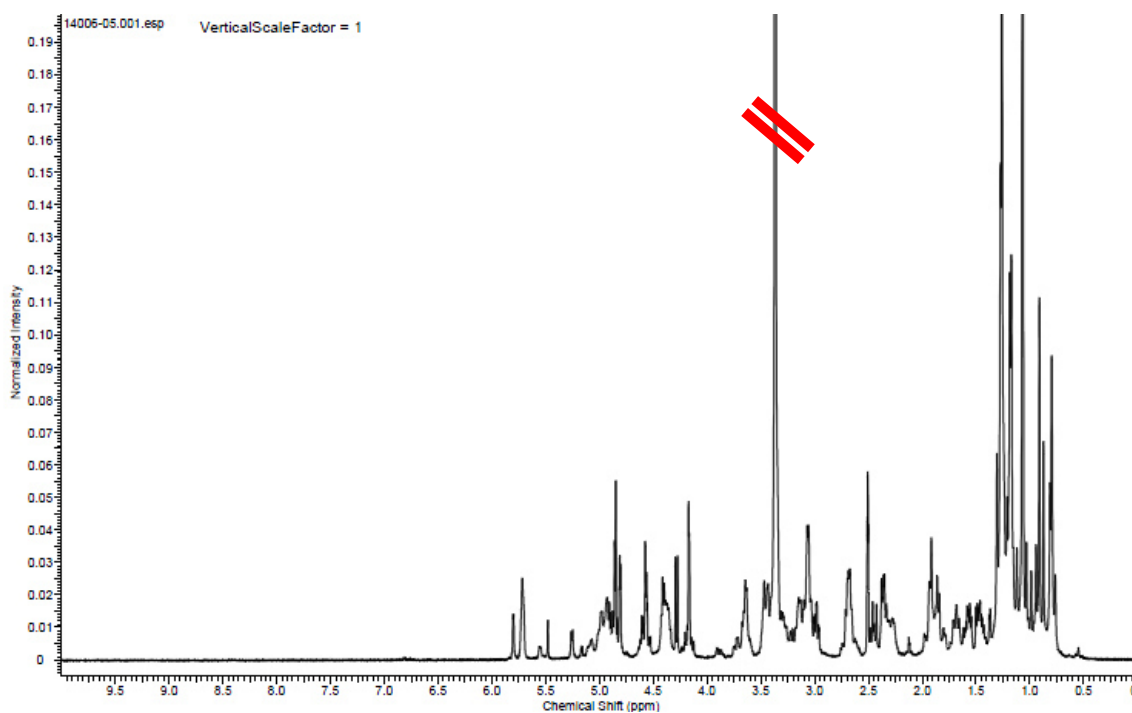
##### 6.4.7.1 Análisis de IR-ATR



**Figura 107.** Espectro de IR/ATR del compuesto Is-C2.

En el espectro de IR/ATR del compuesto **Is-C2** las señales de absorción más importantes fueron las siguientes:  $\nu_{\max} = 3411, 2973, 2934, 1689 \text{ cm}^{-1}$ , muy similares a los exhibidos por el compuesto **Is-C1**. Estos datos revelan que la molécula es de naturaleza alifática. La banda amplia a  $3411 \text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos funcionales OH. Las bandas a  $2973$  y  $2934 \text{ cm}^{-1}$  revelan la presencia de grupos metilos y metilenos. La banda a  $1689 \text{ cm}^{-1}$  indica que la molécula tiene grupos carbonilo, y por su intensidad sugiere que puedan tratarse más de uno.

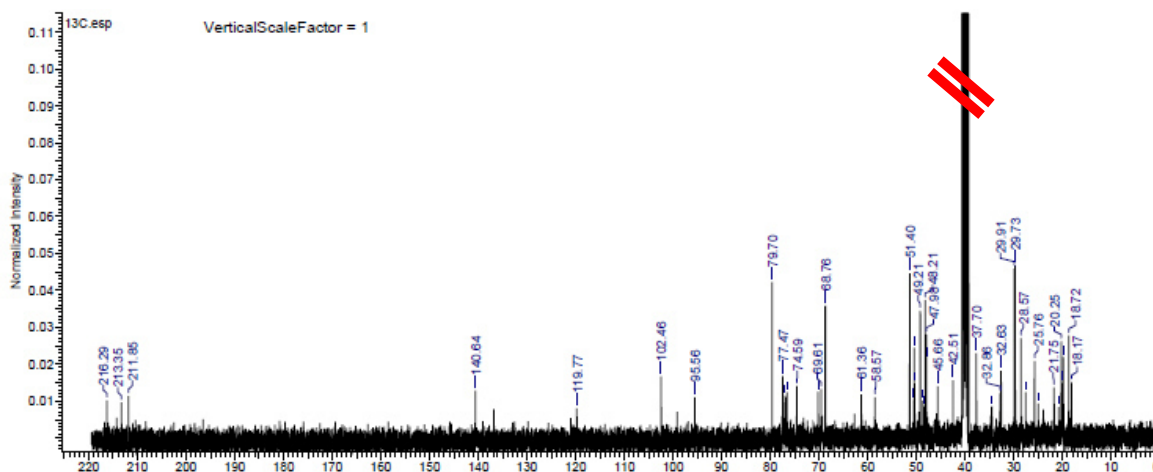
#### 6.4.7.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$



**Figura 108.** Espectro general de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto Is-C2 en DMSO- $d_6$ .

Las señales pertenecientes al H<sub>2</sub>O (3.37 ppm) y del DMSO sin deutero (2.51 ppm) de la figura anterior fueron descartadas. Hecho esto se procedió analizar el resto de señales. Al no detectarse señales por encima de las 7 ppm se confirma que la estructura no es de carácter aromático, sino alifático. Por la presencia de múltiples señales ruido fue difícil hacer un análisis claro de éste espectro, pero las señales más destacadas fueron las siguientes: señal A (5.72 ppm) que sugiere la presencia de un hidrógeno unido a carbono olefínico. un grupo de señales entre 4 y 5 ppm probablemente representen hidrógenos de alcoholes. En el rango de 0.75-1.35 ppm se pueden apreciar múltiples señales pertenecientes de grupos metilos.

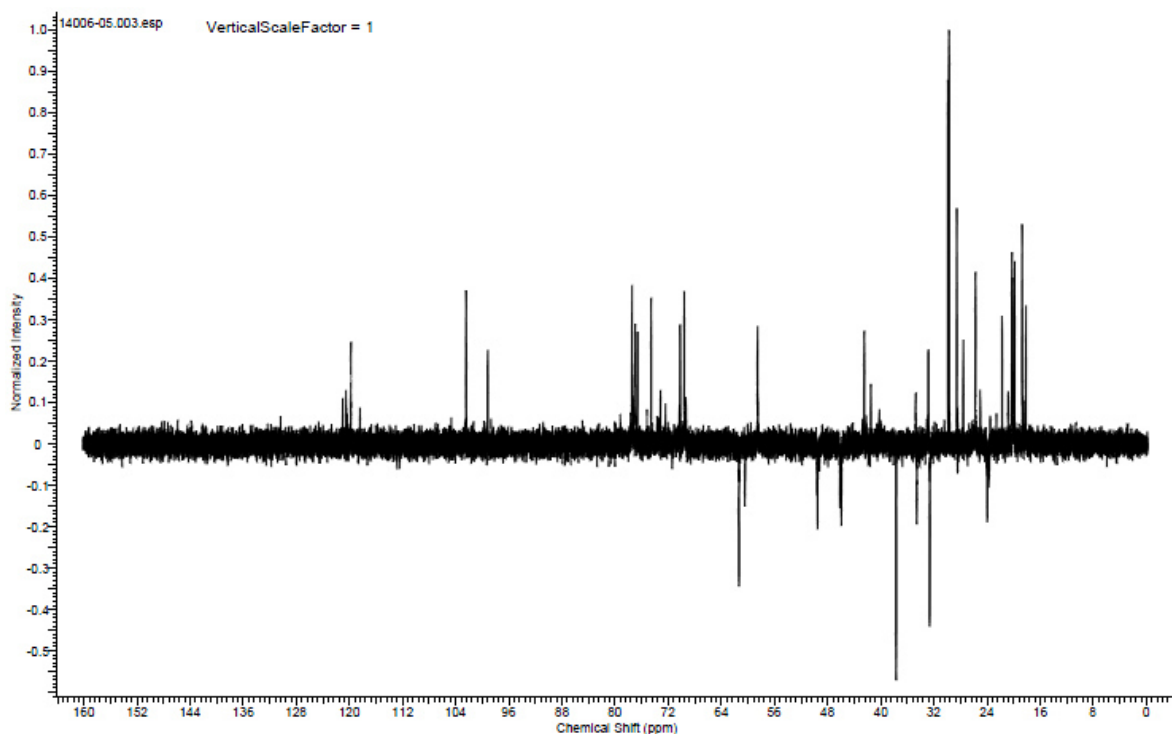
#### 6.4.7.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C



**Figura 109.** Espectro general de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto Is-C2 en DMSO-d<sub>6</sub>.

Tras el análisis de <sup>13</sup>C del compuesto **Is-C2** y descartando la señal propia del solvente sin deutero (39.9 ppm), se pudieron apreciar 48 señales correspondientes al compuesto

mencionado, aunque algunas de estas pudieran tratarse de señales contaminantes. Destacan las señales a 216.29, 213.35 y 211.85 ppm que representan carbonos de grupos carbonilos. A diferencia de **Is-C1**, **Is-C2** no posee una señal a 170.09 ppm o cercano, lo cual significa que ésta molécula no posee grupos éster. Las señales 140.64 y 119.77 ppm pertenecen a carbonos olefínicos. El resto de señales a campos más altos corresponden a carbonos alifáticos. Un análisis de DEPT-135 fue realizado (figura 110).



**Figura 110.** Espectro general de DEPT-135 del compuesto Is-C2 en DMSO-d<sub>6</sub>.



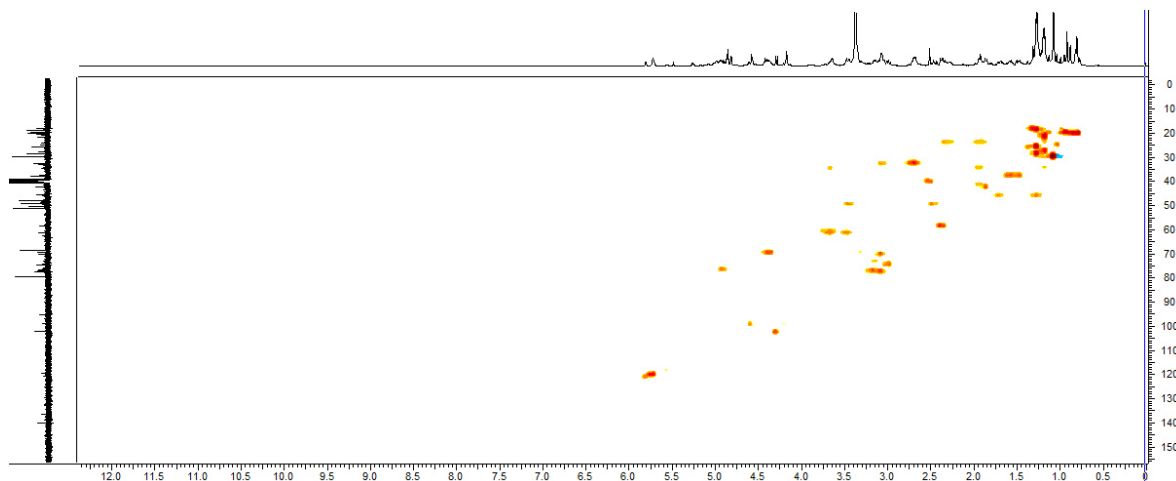
**Tabla 38.** Resumen de señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 de **Is-C2**.

<b>Señal</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Tipo de Carbono</b>	<b>Señal</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>	<b>Tipo de Carbono</b>
<b>1</b>	18.17	CH <sub>3</sub>	<b>25</b>	48.69	Cq
<b>2</b>	18.72	CH <sub>3</sub>	<b>26</b>	49.21	Cq
<b>3</b>	19.85	CH <sub>3</sub>	<b>27</b>	50.4	Cq
<b>4</b>	20.18	CH <sub>3</sub>	<b>28</b>	50.48	Cq
<b>5</b>	20.25	CH <sub>3</sub>	<b>29</b>	50.56	Cq
<b>6</b>	20.84	CH <sub>3</sub>	<b>30</b>	51.4	Cq
<b>7</b>	21.75	CH <sub>3</sub>	<b>31</b>	58.57	CH
<b>8</b>	23.97	CH <sub>2</sub>	<b>32</b>	61.36	CH <sub>2</sub>
<b>9</b>	25.02	CH <sub>3</sub>	<b>33</b>	68.76	Cq
<b>10</b>	25.76	CH <sub>3</sub>	<b>34</b>	69.61	CH
<b>11</b>	27.58	CH <sub>3</sub>	<b>35</b>	70.21	CH
<b>12</b>	28.57	CH <sub>3</sub>	<b>36</b>	74.59	CH
<b>13</b>	29.73	CH <sub>3</sub>	<b>37</b>	76.64	CH
<b>14</b>	29.91	CH <sub>3</sub>	<b>38</b>	76.97	CH
<b>15</b>	32.63	CH <sub>2</sub>	<b>39</b>	77.47	CH
<b>16</b>	32.86	CH	<b>40</b>	79.7	Cq
<b>17</b>	34.58	CH <sub>2</sub>	<b>41</b>	95.56	Cq
<b>18</b>	37.7	CH <sub>2</sub>	<b>42</b>	99.19	CH
<b>19</b>	42.51	CH	<b>43</b>	102.46	CH
<b>20</b>	45.93	CH <sub>2</sub>	<b>44</b>	119.77	CH
<b>21</b>	47.98	Cq	<b>45</b>	140.64	Cq
<b>22</b>	48	Cq	<b>46</b>	211.85	Cq
<b>23</b>	48.21	Cq	<b>47</b>	213.35	Cq
<b>24</b>	48.46	Cq	<b>48</b>	216.29	Cq

En el espectro DEPT-135 se pudieron detectar la ausencia de 17 señales previamente observadas en  $^{13}\text{C}$ -RMN, delatando que se tratan de carbonos cuaternarios. Además, se pudieron identificar 6  $\text{CH}_2$  y, por sus desplazamientos químicos, 12 CH y 13  $\text{CH}_3$ . Los resultados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

#### 6.4.7.4 Análisis de HSQC de **Is-C2**

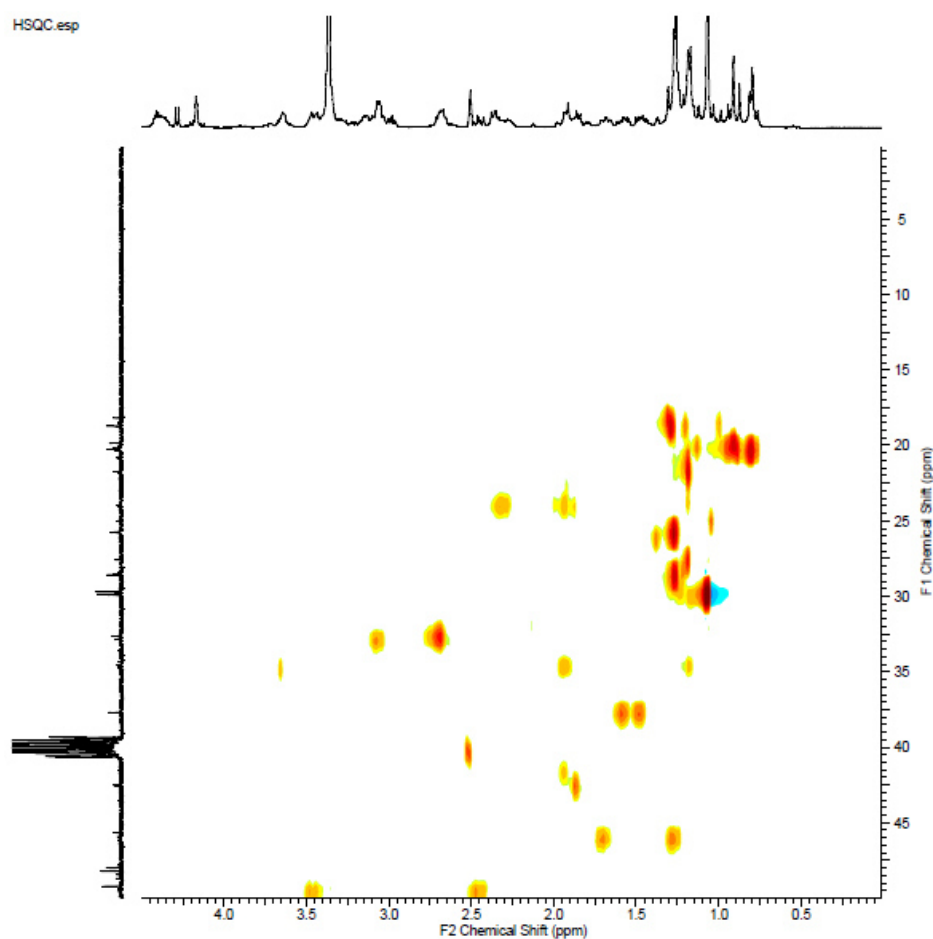
Un análisis de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) de **Is-C2** fue llevado a cabo con el fin de identificar los acoplamientos directos entre carbonos e hidrógenos.



**Figura 111.** Espectro de HSQC sin ampliar del compuesto Is-C2.

Durante el desarrollo de éste experimento se pudo confirmar las señales de carbonos cuaternarios que previamente se habían identificado en DEPT-135, ya que no mostraban

ningún acoplamiento con alguna señal de protones. Además, se consiguió revalidar la identidad de los carbonos metilenos ya que sus señales presentaban doble acoplamiento a diferentes desplazamientos químicos, y gracias a esto se logró diferenciar el metileno (señal 8, 23.97 ppm; ver ampliación, figura 112) del resto de metilos a desplazamientos cercanos.



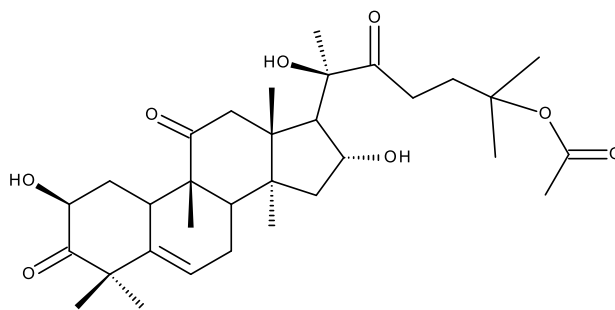
**Figura 112.** Espectro de HSQC ampliado (1H: 0-4.5 ppm; 13C: 0-50 ppm) del compuesto Is-C2.

Los resultados del análisis de HSQC se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 39.** Resumen de acoplamientos entre las señales de carbonos e hidrógenos del compuesto **Is-C2**.

<b>Señal</b>	<b><sup>13</sup>C (δ)</b>	<b><sup>1</sup>H (δ)</b>	<b>Señal</b>	<b><sup>13</sup>C (δ)</b>	<b><sup>1</sup>H (δ)</b>
<b>1</b>	18.17	1.32	<b>25</b>	48.69	-
<b>2</b>	18.72	1.26	<b>26</b>	49.21	-
<b>3</b>	19.85	0.91	<b>27</b>	50.4	-
<b>4</b>	20.18	0.88	<b>28</b>	50.48	-
<b>5</b>	20.25	0.81	<b>29</b>	50.56	-
<b>6</b>	20.84	0.81	<b>30</b>	51.4	-
<b>7</b>	21.75	1.17	<b>31</b>	58.57	2.37
<b>8</b>	23.97	2.34, 1.9	<b>32</b>	61.36	3.65, 3.47
<b>9</b>	25.02	1.04	<b>33</b>	68.76	-
<b>10</b>	25.76	1.26	<b>34</b>	69.61	4.38
<b>11</b>	27.58	1.2	<b>35</b>	70.21	3.06
<b>12</b>	28.57	1.26	<b>36</b>	74.59	2.99
<b>13</b>	29.73	1.07	<b>37</b>	76.64	4.9
<b>14</b>	29.91	1.07	<b>38</b>	76.97	3.16
<b>15</b>	32.63	2.7	<b>39</b>	77.47	3.06
<b>16</b>	32.86	3.06	<b>40</b>	79.7	-
<b>17</b>	34.58	1.9, 1.18	<b>41</b>	95.56	-
<b>18</b>	37.7	1.58, 1.48	<b>42</b>	99.19	4.57
<b>19</b>	42.51	1.86	<b>43</b>	102.46	4.28
<b>20</b>	45.93	1.7, 1.26	<b>44</b>	119.77	5.71
<b>21</b>	47.98	-	<b>45</b>	140.64	-
<b>22</b>	48	-	<b>46</b>	211.85	-
<b>23</b>	48.21	-	<b>47</b>	213.35	-
<b>24</b>	48.46	-	<b>48</b>	216.29	-

Reuniendo toda la información de los análisis espectroscópicos realizados a **Is-C2** no fue posible llegar a una estructura exacta debido a la presencia de muchas señales contaminantes, sin embargo, este compuesto presenta señales muy similares a **Is-C1**, con la principal diferencia de que **Is-C2** posee mayor cantidad de carbonos y no contiene un grupo éster. Esto sugiere que **Is-C2** se trate de una cucurbitacina (figura 113).



**Figura 113.** Posible estructura base de Is-C2.

## 7. DISCUSIÓN

La incidencia en las últimas décadas del cáncer son alarmantes y, aunque este padecimiento ha estado presente a lo largo de la existencia de la humanidad, el origen de muchos tipos de cánceres es aún desconocido, siendo hasta hace relativamente poco que se han comenzado a entender sus mecanismos de acción. Debido a que esta enfermedad no respeta género ni edad, a que se detecta en prácticamente toda población humana y a que los tratamientos para su cura son excesivamente costosos y con poca garantía de su efectividad, los investigadores se ven en la necesidad de constantemente buscar nuevas alternativas terapéuticas. Los metabolitos secundarios de plantas han demostrado ser una excelente alternativa de nuevos compuestos para el combate de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. El taxol, vincristina, vinblastina, topotecán, irinotecán, entre otros, son claros ejemplos de sustancias naturales con una importante actividad anticancerígena (Lee, 2004). Pero esto no se acaba ahí, en los últimos años se han intensificado los esfuerzos en el diseño y síntesis de nuevas drogas quimioterapéuticas derivadas de productos naturales que sean más eficaces en comparación a lo que actualmente se ofrece en el mercado (Gordaliza, 2007); el Phenoxodyol, Emodina, Indirubina, Silvestrol, por mencionar algunos, son derivados semisintéticos con prometedores resultados para el tratamiento del cáncer (Nirmala *et al.*, 2011).

El uso de medicinas herbales es popularmente muy conocido, sin embargo, la utilización de la planta entera o de sus extractos crudos, aunque ciertamente efectivo, posee algunas desventajas como la inconsistencia de su composición dependiendo del área geográfica y época de colecta, la presencia de componentes indeseados que causen efectos antagonistas y/o tóxicos y la pérdida de actividad biológica debido a un mal manejo del material vegetal. En cambio el aislamiento, caracterización y test biológico de sustancias puras a partir de fuentes naturales nos ofrece las siguientes ventajas: las sustancias puras pueden ser administradas en dosis conocidas y precisas, puede conducir al desarrollo de ensayos analíticos para compuestos particulares o para las clases de compuestos y permite una determinación estructural, que puede conllevar a un pronóstico de actividad biológica de compuestos similares y a la producción de sustancias semisintéticas que exhiban mejores resultados (Colegate y Molyneux, 2008).

Por supuesto lo anterior siempre respaldándose en el conocimiento etnobotánico de la medicina tradicional, práctica que en México es utilizada desde la antigüedad. La presente investigación se basó en este fundamento, donde las plantas elegidas, *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora*, son especies endémicas de zonas áridas de México. El efecto inhibitorio sobre la línea celular de cáncer murino L5178Y-R fue evaluada, revelando que todos los extractos crudos de ambas plantas poseían actividad biológica significativa, siendo los extractos derivados del cactus los más destacados. A partir de éstos resultados se decidió realizar un fraccionamiento biodirigido gracias al cual se pudieron aislar e identificar seis sustancias de *P. marginatus* (**Pm-C1, Pm-C2, Pm-C3, Pm-C4, Pm-C5 y Pm-C6**) y dos de *I. sonora* (**Is-C1 e Is-C2**).

Los anteriores resultados pueden ser respaldados por diversos estudios. Las plantas de climas áridos crecen en presencia de factores hostiles como altas temperaturas, intensa radiación solar y carencia de agua, lo que las ha obligado a crear eficientes sistemas de defensa como la producción de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, saponinas, terpenos, flavonoides, entre otros. Este mismo sistema de defensa ha demostrado también poseer actividad protectora y curativa contra el cáncer (Harlev *et al.*, 2012). Además, estudios recientes han revelado actividad antineoplásica de plantas de zonas áridas del Norte de México contra tumores malignos y benignos de pacientes humanos (López *et al.*, 2009, 2010, 2012). En el caso particular de las cactáceas, éstas son conocidas por su amplio rango de actividades biológicas como antioxidantes, antidiabética, reguladores de presión sanguínea, psicoactivos e incluso anticancerígena (Shetty *et al.*, 2011). Uno de los miembros de ésta familia más estudiado por sus bondades medicinales es el nopal, *Opuntia ficus-indica*, mismo que ha revelado actividad apoptótica e inhibidora de crecimiento sobre células cancerígenas de ovario, cérvix y vejiga (Zou *et al.*, 2005).

Otra especie del género *Opuntia*, *Opuntia humifusa*, demostró actividad antioxidante, antiinflamatoria y apoptótica sobre células humanas de cáncer de colon (SD480) y mama (MCF7), a nivel de extracto crudo (Kim *et al.*, 2013).

En el caso del cactus que elegimos para este estudio, *Pachycereus marginatus*, cabe mencionar que no se ha realizado nunca antes ningún experimento científico para evaluar su actividad anticancerígena, sin embargo, el cactus *Lophocereus schottii*, especie estrechamente relacionada con *P. marginatus*, ha revelado en previos estudios actividad citotóxica *in vitro* sobre la línea celular HeLa de cáncer de cérvix humano e *in vitro e in vivo* sobre la línea celular de linfoma murino L5178Y-R (Morales-Rubio *et al.*, 2006;



Quintanilla *et al.*, 2011; Orozco-Barocio *et al.*, 2013). Esto demuestra que los resultados aquí mostrados representan nueva información con respecto a la actividad biológica de los cactus, en especial de *P. marginatus*.

En base a los análisis de  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -NMR únicamente se pudo llegar a la conclusión de que el compuesto **Pm-C1** se trata de uno o más compuestos de cadena larga alifática.

Mediante análisis mono y bidimensionales ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC), y por comparación con datos espectroscópicos ya reportados en la literatura científica (Akihisa y Matsumoto, 1987), se determinó que los sólidos **Pm-C2** y **Pm-C3** son el mismo compuesto, Lofenol. Esta sustancia ha sido aislada con anterioridad de especies como *Lophocereus schottii*, *Tieghemella heckelii* y *Dracaena cochinchinensis* (Djerassi *et al.*, 1958; Gossé *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006), pero nunca antes se había descrito en *P. marginatus*. Esto supone un resultado novedoso en el campo de la fitoquímica de esta planta. A pesar de que **Pm-C2** y **Pm-C3** se tratan del mismo compuesto, la actividad citotóxica exhibida por estos no fue la misma, 66 % y 48 % a la misma concentración de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; esto puede ser debido a que **Pm-C2** presenta un poco más impurezas que **Pm-C3**, mismas que podrían tener su propia actividad citotóxica. La citotoxicidad del Lofenol sobre células cancerígenas ya se ha evaluado en previos estudios; posee una actividad importante sobre la línea tumoral PC12 (He *et al.*, 2006).

La identificación de **Pm-C5** se llevó a cabo gracias a análisis mono y bidimensionales ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT-135, COSY, HSQC) y comparando con datos reportados en la literatura (Patra *et al.*, 2010; Chatuverdula y Prakash, 2012), resultando ser el  $\beta$ -

sitosterol que, como en el caso del Lofenol, se trata de un compuesto perteneciente a la familia de los fitoesteroles. La actividad biológica sobre el linfoma L5178Y-R fue notable, 41 % desde 31.25  $\mu\text{g/mL}$  y siguiendo una curva dosis-respuesta. Se sabe que los fitoesteroles, incluyendo el  $\beta$ -sitosterol y probablemente el Lofenol, actúan de manera preventiva, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes y, consecuentemente, protegiendo a las células de un estrés oxidativo y de una posible carcinogénesis (Woyengo *et al.*, 2009; Awad y Fink, 2000). En el caso concreto del  $\beta$ -sitosterol, se tiene documentado que induce la anti-proliferación y la apoptosis en células leucémicas U937 humanas (Park *et al.*, 2007).

La identidad de **Pm-C6** fue determinada mediante la interpretación conjunta de las técnicas de IR-ATR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT-135, COSY y HSQC, así como la comparación con los datos reportados en la base de datos de la Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB), siendo la del ácido palmítico, un ácido graso muy común en la naturaleza. Este compuesto exhibió la mayor actividad citotóxica en nuestra investigación contra el linfoma murino, 69 % desde 31.25  $\mu\text{g/mL}$  y aumentando. Investigaciones previas han revelado que algunos ácidos grasos, incluido el ácido palmítico, poseen actividad citotóxica sobre células cancerígenas de colon, células de melanoma y células tumorales de cerebro (Yoo *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1998), y estos mismo estudios sugieren que el mecanismo de acción de los ácidos grasos es vía fragmentación del ADN y por inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3.

En el caso de **Is-C1** e **Is-C2** estos fueron identificados como compuestos tipo cucurbitacinas; ambos demostraron una citotoxicidad moderada, 17 y 55 % a 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ,

respectivamente. Reportes previos han demostrado que algunas cucurbitacinas poseen actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares de cáncer; las Cucurbitacinas D y F exhibieron una significativa actividad *in vitro* sobre las líneas tumorales humanas A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 y HCT 15 (Kim *et al.*, 1997). La Cucurbitacina I inhibe el crecimiento tumoral de ratones con melanoma inmunológicamente comprometidos e incrementa la sobrevivencia de los mismos (Blaskovich *et al.*, 2003). Además, experimentos con la Cucurbitacina D han develado su mecanismo de acción que podría prevenir la proliferación de células cancerígenas: es una inhibidora de la maquinaria de la chaperona HSP90, molécula biológica que facilita la maduración de proteínas recién sintetizadas, incluida las proteínas que formarán parte de la oncogénesis (Hall *et al.*, 2015), esto sugiere que el resto de las cucurbitacinas pudieran actuar de manera similar.

Todos los compuestos aislados tanto de *P. marginatus* como de *I. sonorae* revelaron citotoxicidad sobre el linfoma murino, sin embargo, esta actividad fue menor en comparación con la del extracto del cual se derivaban. Esto puede deberse a que los extractos crudos poseen una actividad sinergista, es decir, a que la mezcla de dos o más sustancias de estas plantas posee mayor actividad biológica que la suma de las actividades de los compuestos por separado.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos consecutivos hexánico, clorofórmico y metanólico, así como extractos no consecutivos metanólicos de *Pachycereus marginatus*, siendo el extracto no consecutivo el que brindó mayor rendimiento, 16.2 % sobre 13.8 % del extracto consecutivo.
2. Tanto los extractos crudos consecutivos y no consecutivo de *Pachycereus marginatus* revelaron actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R muy sobresaliente, aproximadamente 90 % desde 3.9 µg/mL.
3. Las particiones con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico no consecutivos de *Pachycereus marginatus* revelaron actividad citotóxica baja.
4. Producto del fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de *P. marginatus* se aislaron 5 compuestos.
5. Mediante técnicas espectroscópicas (IR-ATR, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, DEPT 135, HSQC, HMBC) se lograron elucidar la estructura de algunos de los compuestos aislados de *P. marginatus* y evaluar su actividad citotóxica frente al linfoma L5178Y-R.
  - a. Se determinó que **Pm-C1** es una mezcla de compuestos poco polares, con actividad citotóxica de 50 % desde 31.25 µg/mL y siguiendo una curva dosis-respuesta.
  - b. **Pm-C2** y **Pm-C3** corresponden al mismo compuesto, Lofenol, con una citotoxicidad de 40 % a 31.25 µg/mL y 48 % a 62.5 µg/mL, respectivamente El Lofenol es la primera vez que se reporta en *P. marginatus*.
  - c. **Pm-C4** es un compuesto esteroidal, con una citotoxicidad de 41 % a 31.25 µg/mL.

- d. **Pm-C5** es un fitoesterol identificado como  $\beta$ -sitosterol, con una actividad sobre el linfoma de 40 % a 31.25  $\mu\text{g/mL}$ . Nunca se había reportado con anterioridad en *P. marginatus*.
  - e. La identidad de **Pm-C6** fue la del Ácido palmítico, nunca descrito en *P. marginatus*, con una actividad citotóxica de 70 % a  $\mu\text{g/mL}$ .
6. Se obtuvieron extractos consecutivos hexánico, clorofórmico y metanólico, así como extractos no consecutivos metanólicos de *Ibervillea sonorae*, siendo el procedimiento consecutivo el que brindó mayor rendimiento, 18.5 % sobre 13.8 % del extracto no consecutivo.
7. Todos los extractos de *I. sonorae* demostraron citotoxicidad sobre la línea L5178Y-R, siendo el extracto clorofórmico el más activo, 60 % desde 7.9  $\mu\text{g/mL}$ .
8. Las particiones con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico no consecutivo de *Ibervillea sonorae* revelaron actividad citotóxica baja.
9. Producto del fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico no consecutivo de *I. sonorae* se aislaron 2 compuestos.
10. Mediante técnicas espectroscópicas (IR-ATR,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT 135, HSQC, HMBC) se lograron elucidar parcialmente la estructura de los compuestos aislados de *I. sonorae* y evaluar su actividad citotóxica frente al linfoma L5178Y-R.
  - a. **Is-C1** e **Is-C2**, aislados de *I. sonorae*, corresponden a dos cucurbitacinas, con citotoxicidades de 55 % a 62.5  $\mu\text{g/mL}$  y 57 % a 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

## 9. PERSPECTIVAS

Los resultados reportados en la presente investigación demuestran que las plantas *Pachycereus marginatus* e *Ibervillea sonora* poseen actividad citotóxica sobre una línea de cáncer murino, siendo *P. marginatus* el más activo, y no sólo a nivel de extracto crudo, sino también a nivel de compuestos puros. Demuestran, además, el gran potencial etnobotánico y terapéutico de ambas especies.

Entre las perspectivas futuras se considera evaluar la citotoxicidad de las plantas sobre otras líneas de cáncer, así como sobre líneas de células normales para determinar su toxicidad. Asimismo, se plantea también tratar de aislar compuestos puros de los extractos clorofórmico y metanólico, en el caso de *P. marginatus*, y de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico en el caso de *I. sonora*.

## 10. LITERATURA CITADA

Achenbach H, Horn K, Domínguez XA, Rombold C, Gómez-López EG. 1993. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry* 33:437-445.

Adams DJ, Wahl ML, Flowers JL, Sen B, Colvin M, Dewhirst MW, Manikumar G, Wani MC. 2005. Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 57:145–154.

Ahmad I, Aqil F, Ahmad F, Owais M. 2006. Herbal Medicines: Prospects and Constrains. In: *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*; Ahmad I, Aqil F and Owais M (eds.). Wiley VCH; Germany, pp. 59-75.

Akihisa T, Matsumoto T. 1987. <sup>13</sup>C-NMR spectra of sterols and triterpene alcohols. *Journal of the Japan Oil Chemists' Society* 36:301-319.

Alarcón-Aguilar FJ, Calzada-Bermejo F, Hernández-Galicia E, Ruiz-Ángeles C, Roman-Ramos R. 2005. *Journal of Ethnopharmacology* 97:447–452.

Alonso-Castro AJ. 2014. Use of medicinal fauna in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 152:53–70.

ACS. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2015*. Disponible en el sitio red:

<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>  
[Revisado el 10 de Agosto de 2015].

Andrade LN, de Lima TM, Curi R, Castrucci AM. 2005. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro* 19:553-560.

Arias-Toledo AA, Valverde-Valdés MT, Reyes-Santiago J. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. UNAM: México, pp. 35.

Arias S, Terrazas T, Arreola-Nava HJ, Vázquez-Sánchez M, Cameron KM. 2005. Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *Journal of Plant Research* 118:317-328.

Awad AB, Fink CS. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition* 130:2127-2130.

BDMTM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en el [sitio red:  
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Lophocereus%20schottii&id=7982](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Lophocereus%20schottii&id=7982)  
[Revisado el 5 de agosto de 2015].

Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M. 1983. Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during *in vitro* growth of L5178Y murine lymphoma cells. *Cancer Research* 43:4736-4742.

Beer JZ, Jacobson ED, Evans HH, Szumiel I. 1984. X-ray and UV Mutagenesis in two L5178Y cell strains differing in tumorigenicity, radiosensitivity, and DNA repair. *The British Journal of Cancer Supplement* 6:107-111.



Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebt SM. 2003. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a selective janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Research* 63:1270-1279.

BMRB-PA. Biological Magnetic Resonance Data Bank. Disponible en el sitio red: [http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol\\_summary/show\\_data.php?molName=palmitic\\_acid&id=bmse000590](http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?molName=palmitic_acid&id=bmse000590)  
[Revisado el 15 de Julio de 2015].

BMRB-BS. Biological Magnetic Resonance Data Bank. Disponible en el sitio red: [http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol\\_summary/show\\_data.php?molName=beta\\_sitosterol&id=bmse000477&whichTab=1](http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?molName=beta_sitosterol&id=bmse000477&whichTab=1)  
[Revisado el 5 de agosto de 2015].

Borisy GG, Taylor EW. 1967. The Mechanism of action of Colchicine. Binding of Colchicine- <sup>3</sup>H to cellular protein. *Journal of Cell Biology* 34:525-533.

Boyd M, Paul KD. 1995. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* 34:91-109.

Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México Volumen 1. Universidad Nacional Autónoma de México: México, pp. 571.

Cannell RJP. 1998. *Natural Products Isolation*. Humana Press: Totowa, New Jersey pp. 265-269.

Chatuverdula VSP, Prakash I. 2012. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 1:239-242.

Colegate SM, Molyneux RJ. 2008. An Introduction and Overview. In: Bioactive Natural Products: Detection Isolation and Structure Determination. Colegate SM and Molyneux RJ (eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 1-9.

CONABIO. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en la red: <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html> [Revisado el 15 de Julio de 2015].

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Betts D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. 2004. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 351:337-345.

Djerassi C, Smith CR, Marfey SP, McDonald RN, Lemin AJ, Figdor SK, Estrada H. 1954. Alkaloid studies. 111. Isolation of Pilocereine and anhalonidine from four cactus species. *Journal of the American Chemical Society* 76:3215-3217.

Djerassi C, Krakower GW, Lemin AJ, Liu LH, Mills JS, Villotti R. 1958. The neutral constituents of the cactus *Lophocereus schottii*. The structure of Lophenol4a-methyl-a7-cholesten-3p-ol-A link in sterol biogenesis. *Journal of the American Chemical Society* 80:6284-6292.

Dzido TH, Tuzimski T. 2008. Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. In: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J and Kowalska T. (eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168.

Ellingboe J, Nyström E, Sjövall J. 1970. Liquid-gel chromatography on lipophilic-hydrophobic Sephadex derivatives. *Journal of Lipid Research* 11:266-273.

Field LD, Sternhell S, Kalman JR. 2008. Organic Structures from Spectra. Wiley & Sons Inc.: West Sussex, England, pp. 21-32.

Gordaliza M. 2007. Natural Products as Leads to Anticancer Drugs. *Clinical and Translational Oncology* 9:767-776.

Gossé B, Anatole G, Amissa AA, Ito Y. 2002. Chemical analysis of the seed of the ripe fruit of *Tieghemella heckelii*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25:2873-2882.

Gross JH. 2004. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer-Verlag: Germany, pp. 223-243.

Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27:1-93.E

Halberstein RA. 2005. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology* 15:686-699.

Hall JA, Seedarala S, Rice N, Kopel L, Halaweish F, Blag BSJ. 2015. Cucurbitacin D is a disruptor of the HSP90 chaperone machinery. *Journal of Natural Products* 78:873-879.

Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. 2012. Anticancer attributes of desert plants: a review. *Anti-Cancer Drugs* 23:255-271.

Harlev E, Nevo E, Solowey E, Bishayee A. 2013. Cancer preventive and curative attributes of plants of the cactaceae family: a review. *Planta Medica* 79:713-722.

Hartmann S, Naso JD, Bhattacharya D. 2002. Phylogenetic origins of *Lophocereus* (cactaceae) and the senita cactus-senita moth pollination mutualism. *American Journal of Botany* 89:1085-1092.

Harvey AL. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 13:894-901.

He L, Liu Y, Shi J, Pei Q. 2006. Synthesis and antitumor activity of cholest-4 $\alpha$ -methyl-7-en-3 $\beta$ -ol derivatives. *Steroids* 71:476-483.

Houghton PJ, Raman A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman & Hall: London, pp. 82-84.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en el sitio red: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587> [Revisado el 10 de agosto de 2015].

Jacobs H, Singh T, Reynolds WF, McLean S. 1990. Isolation and  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments of cucurbitacins from *Cayaponia angustiloba*, *Cayaponia racemosa*, and *Gurania subumbellata*. *Journal of Natural Products* 53:1600-1605.

Jacobsen NE. 2007. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. Wiley & Sons Inc.: New Jersey, pp. 74-118.

Jardón-Delgado A, Magos-Guerrero GA, Martínez-Vázquez M. 2014. Isolation of a new anti-inflammatory 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 Octanorcucurbitacin-type triterpene from *Ibervillea sonorae*. *Natural Products Communications* 9:15-16.

Jones CG, Firm RD. 1991. On the Evolution of Plant Secondary Chemical Diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 333:273-280.

Kamboj VP. 2000. Herbal medicine. *Current Science* 78:35-39.

Kim DK, Choi SH, Lee JO, Ryu SY, Park DK, Shin DH, Jung JH, Pyo SK, Lee KR, Zee OP. 1997. Cytotoxic constituents of *Sorbia sorbifolia* var. *stellipila*. *Archives of Pharmacal Research* 20:85-87.

Kim J, Jho KH, Choi YH, Nam SY. 2013. Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. *Food & Function* 4:661-688.

Lee KH. 2004. Current developments in the discovery and design of new drugs candidates from plant natural products leads. *Journal of Natural Products* 67:273-283.

Lira R, Caballero J. 2002. Ethnobotany of the wild Mexican cucurbitaceae. *Economy Botany* 56:380-398.

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4, 5-Dimethylazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* 69:581-593.

López MCA, Quintanilla LR, Serrano GLB, Rosales QE, Pérez FJA, Saldaña RL. 2009. A new type of phytotherapeutic approach with angiosperms from arid zones of northern Mexico in patients with malignant and benign tumors. *Planta Medica* 75:PE13.

López MCA, Quintanilla LR, Rosales E, Pérez JA, Saldaña L. 2010. Long-term follow-up of patients with phytotherapy as only causal treatment for malignant and benign tumors. *Planta Medica* 76:P125.

López-Moreno CA., Quintanilla-Licea R. 2012. Phytotherapy with angiosperms from arid zones of northern Mexico in patients with malignant and benign tumors. *European Journal of Cancer* 48:752.

Macomber RS. 1998. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley & Sons Inc.: USA, pp. 1-46.

Mitchell AD, Myhr BC, Rudd CJ, Caspary WJ, Dunkel VC. 1988. Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: Methods used and chemicals evaluated. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 12:1-18.

Mitchell TN, Costisella B. 2007. *NMR-From Spectra to Structures: An Experimental Approach*, Second edition. Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, pp. 3-38.

Morales-Rubio ME, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Rivas-Morales C, Arévalo-Niño K, Treviño-Neávez JF, Carranza-Rosales P, Cruz-Vega DE. 2006. Actividad biológica de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose. 2o Congreso Nacional de Química Médica, Querétaro, Querétaro, México, septiembre 4-8.

Morales DM, Siles S. 2013. Identificación de los principales componentes de la raíz de wereque, extraíbles en medio acuoso, por GC-MS. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4:15-21.

Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. 2013. Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine* 4:1231-1235.

Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70:461-477.

Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75:311-335.

Nirmala MJ, Samundeeswari A, Sankar PD. 2011. Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology* 1:1-14.

Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* 59:365-378.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Disponible en el sitio red: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/> [Revisado el 10 de agosto de 2015].

Orozco-Barocio A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Arreola-Nava HJ. 2013. Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: a Mexican medicinal plant. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 10:397-404.

Park C, Moon DO, Rhu CH, Choi BT, Lee WH, Kim GY, Choi YH. 2007.  $\beta$ -sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30:1317-1323.

Pasto DJ, Johnson CR. 1974. *Determinación de Estructuras Orgánicas*. Ed. Reverteté, S.A.: Barcelona, pp. 24-52.

Patra A, Jha S, Murthy PN, Manik, Sharone A. 2010. Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 1:95-100.

Pérez-Castorena AL, Oropeza RF, Vázquez AR, Martínez M, Maldonado E. 2006. Labdanes and Withanolides from *Physalis coztomatl*. *Journal of Natural Products* 69:1029-1033.

Qian F, Hanahan D, Weissman IL. 2001. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3976-3981.

Quintanilla-Licea R, Verde-Star MJ, Gómez-Flores R, Samaniego-Escamilla MA, Morado-Castillo R, Hernández-Martínez HC. 2011. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de *Lophocereus schottii* e *Ibervillea sonora* en contra del linfoma murino L5178Y-R. Revista Latinoamericana de Química 38SE:109.

Ramer G, Lendl B. 2013. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc. Libro en línea. DOI: 10.1002/9780470027318

Rivera-Ramírez F, Escalona-Cardoso GN, Garduño-Siciliano L, Galaviz-Hernández C, Paniagua-Castro N. 2011. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:1-6.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilembaum R, Johnson DH. 2006. Paclitaxel-Carboplatin alone or with Bevacizumab for non-small cell Lung Cancer. The New England Journal of Medicine 355:2542-2550.

Schellens JHM, Creemers GJ, Beijnen JH, Rosing H, de Boer-Dennert M, McDonald M, Davies B, Verweij J. 1996. Bioavailability and pharmacokinetics of oral topotecan: a new topoisomerase I inhibitor. British Journal of Cancer 73:1268-1271.

Secretaría de Salud. Disponible en el sitio red: [www.spss.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html](http://www.spss.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html) [Revisado el 10 de Julio de 2015].

Seeger C, Sturm S, Mair ME, Ellmerer EP, Stuppner H. 2005. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). Magnetic Resonance in Chemistry 43:489-491.



Seidel V. 2006. Initial and Bulk extraction. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI. (eds.). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 27-46.

Shetty AA, Rana MK, Preetham SP. 2011. Cactus: a medicinal food. *Journal of Food Science and Technology* 49:530-536.

Siddiqui M, Rajkumar SV. 2012. The high cost of cancer drugs and what we can do about it. *Mayo Clinic Proceedings* 87:935-943.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Seventh edition. Wiley & Sons Inc.: USA, pp. 127-340.

Singla R, Negi A, Singh V. 2014. Indole based alkaloid in cancer: an overview. *Pharmatuto Magazine* 2:76-82.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA. 2004. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advance Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 351:1502-1512.

Taylor L. 2000. Plant based drugs and medicines. Disponible en el Sitio Red: <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>  
[Revisado 28 de febrero de 2012].

Thakur DS. 2011. Topoisomerase II inhibitors in cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 3:1173-1181.

Tseng CY, Mane JY, Winter P, Johnson L, Huzil T, Izbicka E, Luduena RF, Tuszyński JA. 2010. Quantitative analysis of the effect of tubulin isotype expression on sensitivity of cancer cell lines to a set of novel colchicine derivatives. *Molecular Cancer* 9:131.

Unger SE, Cooks RG. 1980. Chemotaxonomy of columnar Mexican cacti by mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Natural Products* 43:288-293.

Veeresham C. 2012. Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 3:200-201.

Vega-Avila E, Espejo-Serna A, Alarcón-Aguilar F, Velasco-Lezama R. 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 52:78-82.

Vogler B, Setzer WN. 2006. Characterization of Natural Products. In: *Natural Products of Plants*; Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J and Brielmann H. (eds.). Taylor & Francis Group: Boca Ratón, Florida, USA, pp. 319-386.

Weckert E, Hümmer K, Dominguez XA, Horn K, Achenbach H. 1993. The absolute configuration of Kinoic C. *Phytochemistry* 33:447-448.

Williams JR, Leaver HA, Ironside JW, Miller EP, Whittle IR, Gregor A. 1998. Apoptosis in human primary brain tumours: actions of arachidonic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58:193-200.

Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH. 2009. Anticancer effects of phytoosterols. *European Journal of Clinical Nutrition* 63:813-820.

Yoo YC, Shin BH, Hong JH, Lee J, Chee HY, Song KS, Lee KB. 2007. *Archives of Pharmacal Research* 30:361-365.

Zapata-Bustos R, Alonso-Castro AJ, Gómez-Sánchez M, Salazar-Olivo LA. 2014. *Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 152:546-552.

Zou D, Molly B, Garcia F, Feugang JM, Wang J, Zang R, Liu H, Zou C. 2005.  
Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal* 4:25.

## 11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mario Ángel Samaniego Escamilla

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Química de Productos Naturales

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *PACHYCEREUS MARGINATUS* (DC.) BRITTON & ROSE E *IBERVILLEA SONORAE* (WATSON) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R

Campo de Estudio: Ciencias de la Vida.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 1 de noviembre de 1987, hijo de Mario Samaniego Viesca y Elsa Escamilla Galindo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2008.