

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con  
Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico de *Argemone*  
*ochroleuca*



**Presenta:**

Jorge Alberto Becerra Soto

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2011

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



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

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

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar la Tesis de **Jorge Alberto Becerra Soto**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

---

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz  
Director

---

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda  
Secretario

---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Vocal

---

Dra. Ema Carina Rosas Burgos  
Suplente

## DEDICATORIAS

A *Dios*, por haberme dado vida y salud para llegar a esta etapa de mi vida, así como la oportunidad de disfrutar y compartirla con mi familia y amigos.

A mis *padres* Blanca y Jorge, por todo el amor, confianza, apoyo incondicional, experiencia, motivación y aliento que me han brindado a lo largo de mi vida, que gracias a todo esa fe me impulsa para seguir adelante y alcanzar mis metas, por mí y por ustedes. Dios los bendiga, hoy y siempre.

A mis *hermanas* Claudia y Cynthia, y mi *sobrina* Michelle, por motivarme y ayudarme en todos los momentos difíciles, por estar siempre a mi lado y por creer siempre en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad de Sonora por ser mi hogar durante tantos años, por la formación académica que recibí y por otorgarme las herramientas y facilidades para cumplir con mis estudios de maestría.

A mi director de Tesis, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz por sus siempre atinados consejos, paciencia, apoyo incondicional, confianza y amistad. Siempre me sentiré muy orgulloso de haber sido parte de su equipo de trabajo... ¡Gracias maestro!

A mis sinodales, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda y Dra. Emma Carina Rosas Burgos, gracias por su disponibilidad, apoyo, interés, asesoría y tiempo brindado, los cuales hicieron mi trabajo en este proyecto mucho más fácil... ¡Muchas gracias!

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de una estancia e investigación en su laboratorio, permitiéndome adquirir gran conocimiento y experiencia.

A la M.C. Karla Martínez Robinson del Laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) y a la M.C. Milagros Aguilar del Departamento de Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora, por todas las facilidades y apoyo técnico otorgado.

De manera muy especial, a la Dra. Dora Valencia, así como también a mi querido equipo de los “doritos”, Davisela, Efraín, Zuilma, Lily y Sergio, mil gracias por darme la oportunidad de conocerlos, por brindarme su conocimiento, compartir tantas experiencias, apoyo incondicional y amistad durante todo el transcurso de este proyecto, que sin ustedes toda esta experiencia no hubiera sido la misma. ¡Mil gracias!

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, Ivonne, Adriana, Heriberto, Wenceslao, Iván, Jael, Paola, Paty, Samuel, por toda su ayuda, amistad y tiempo que me brindaron.

Y finalmente a mis amigos Melissa, John Martin, Génesis, Daniela y Franco, a todos ellos que de alguna forma contribuyeron en este proyecto, por escucharme, comprenderme y siempre tener que dar un buen consejo que darme.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	ixx
LISTA DE FIGURAS .....	x
OBJETIVOS.....	xiiiiv
General .....	xiiiiv
Particulares .....	xiiiiv
RESUMEN.....	xivv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Cáncer.....	4
Desarrollo del Cáncer .....	4
Epidemiología del Cáncer.....	6
Tratamiento.....	6
Plantas Medicinales .....	7
Perspectiva Histórica .....	7
Etnobotánica en México .....	8
Productos Naturales .....	10
Componentes Bioactivos de las Plantas Medicinales .....	11
Terpenos.....	14
Compuestos Fenólicos .....	15
Glicósidos .....	15
Alcaloides .....	16
Estudios Fitoquímicos en la Investigación Contra el Cáncer.....	16
<i>Argemone ochroleuca</i> .....	19
El Género Argemone .....	19
Información Taxonómica.....	19
Descripción Botánica .....	20
Distribución Geográfica .....	20
Usos en la Medicina Tradicional.....	20

Estudios Fitoquímicos.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Obtención del Extracto Metanólico.....	24
Obtención de Fracciones del Extracto Metanólico .....	24
Actividad Biológica del Extracto Metanólico y de las Fracciones de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	25
Líneas Celulares.....	25
Evaluación de la Proliferación Celular Mediante el Ensayo de MTT.....	25
Análisis Estadístico .....	26
Fraccionamiento y Purificación de Compuestos Activos .....	26
Fraccionamiento por Cromatografía .....	26
Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).....	27
Caracterización de Compuestos .....	27
Infrarrojo .....	27
Resonancia Magnética Nuclear.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
Obtención del Extracto Metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> y sus Fracciones.....	29
Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico y sus Fracciones .....	29
Fraccionamiento y Purificación de Compuestos Activos .....	40
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Extracto Metanólico y la Fracción Etanólica .....	40
Fraccionamiento por Cromatografía en Columna.....	40
Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Cromatográficas.....	42
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de la Fracción Cromatográfica Activa JF34.....	52
Caracterización Química de Compuestos Activos.....	52
Análisis de Infrarrojo (IR) .....	52
Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	55

Propiedades Bioactivas del Alcaloide Berberina .....	62
CONCLUSIONES .....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Historia de la medicina de productos naturales.....	9
II	Compuestos obtenidos de plantas por extracción con distintos disolvente.....	18
III	Actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones frente a las líneas celulares.....	39
IV	Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	43
V	Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas activas y de las drogas de referencia frente a las líneas celulares.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Etapas en el proceso de carcinogénesis.....	5
2	Elementos básicos del metabolismo primario y metabolismo secundario de plantas.....	12
3	<i>Argemone ochroleuca</i> Sweet.....	21
4	Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la líneas celulares cancerosas M12.A <sup>k</sup> .C3F6, Raw 264.7. HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.....	31
5	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena M12.A <sup>k</sup> .C3F6.....	32
6	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena Raw 264.7.....	33
7	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena HeLa.....	34
8	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena A-549.....	35
9	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena LS-180.....	36
10	Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerígena L929.....	37

11	Comparación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto metanólico y la fracción etanólica.....	41
12	Actividad antiproliferativa de las 41 fracciones cromatográficas obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> frente a la línea celular cancerosa M12.A <sup>k</sup> .C3F6.....	45
13	Actividad antiproliferativa de la fracción cromatográfica JF33 frente a la líneas celulares cancerosas M12.A <sup>k</sup> .C3F6, Raw 264.7. HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.....	46
14	Actividad antiproliferativa de la fracción cromatográfica JF34 frente a la líneas celulares cancerosas M12.A <sup>k</sup> .C3F6, Raw 264.7. HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.....	47
15	Comparación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fracción cromatográfica JF34 con extracto metanólico y fracción etanólica.....	53
16	Espectro de infrarrojo de la fracción cromatográfica 34 (JF34) extraída de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	54
17	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la fracción cromatográfica 34 (JF34) en CD <sub>3</sub> OD, extraída de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	56
18	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la fracción cromatográfica 34 (JF34) en CD <sub>3</sub> OD, extraída de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	58
19	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del alcaloide Berberina (Al-Hayyan, 2006) y de la fracción cromatográfica 34 (JF34) extraída de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	60

20	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del alcaloide Berberina (Al-Hayyan, 2006) y de la fracción cromatográfica 34 (JF34) extraída de la fracción etanólica de <i>Argemone ochroleuca</i> .....	61
----	--	----

## OBJETIVOS

### General

Aislar y caracterizar químicamente los compuestos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*.

### Particulares

- a) Obtener el extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*.
- b) Obtener las fracciones con hexano, acetato de etilo y etanol a partir del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*.
- c) Determinar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico, así como de las distintas fracciones obtenidas de *Argemone ochroleuca*.
- d) Fraccionar por distintas técnicas cromatográficas, como cromatografía en placa fina, en columna y HPLC, las fracciones con actividad antiproliferativa.
- e) Caracterizar químicamente los componentes activos, mediante diferentes técnicas espectroscópicas como infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

## RESUMEN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y, en general, los agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento contra este padecimiento son muy costosos y poseen diversos niveles de toxicidad. Las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer y juegan un papel muy importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Dentro del grupo de plantas que se saben tienen uso medicinal en Sonora se encuentran algunas especies del género *Argemone*. En este trabajo, se evaluó la actividad antiproliferativa de la especie *Argemone ochroleuca*, conocida con el nombre común de cardo blanco.

Para la evaluación *in vitro* de la actividad antiproliferativa de la planta se emplearon distintas líneas celulares cancerosas y una línea celular empleada como control normal. El extracto metanólico mostró valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $18.8 \pm 5.8$ , Raw 264.7 de  $18.2 \pm 2.6$ , HeLa de  $132.6 \pm 13.3$ , A-549 de  $78.8 \pm 3.0$ , LS-180 un valor  $>100$  y para la línea celular normal L929 de  $336.0 \pm 3.3$ . En el caso de las fracciones se observó que la fracción etanólica fue la más activa, mostrando valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $24.2 \pm 1.1$ , Raw 264.7 de  $27.4 \pm 8.3$ , HeLa de  $99.0 \pm 0.2$ , para A-549 un valor  $>100$ , LS-180 de  $63.6 \pm 8.3$  y para la línea celular normal L929 de  $169.6 \pm 4.3$ . Del fraccionamiento por cromatografía en columna de la fracción etanólica se obtuvieron 230 fracciones, de las cuales 2 fueron las más activas (JF33 y JF34). De estas dos, la fracción más activa fue JF34, mostrando valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $2.4 \pm 0.4$ , Raw 264.7 de  $2.7 \pm 0.1$ , HeLa de  $79.5 \pm 11.5$ , A-549 un valor  $>100$ , LS-180 de  $44.5 \pm 0.1$  y para la línea celular normal L929 un valor  $>100$ . Los resultados de IR y RMN indican que la JF34 contiene como componente mayoritario al alcaloide berberina.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y se caracteriza por una alteración del equilibrio entre la proliferación y mecanismos normales de muerte celular (Herrera y García, 2006). Actualmente, se conocen más de cien tipos de cáncer, diferenciados por su etiología, su historia natural y mecanismos. A pesar de la gran evolución del conocimiento básico referente a esta patología, este progreso no se ha reflejado en el desarrollo de técnicas eficientes para su prevención y curación (Kohn y col., 2006; Hemminki y Mutanen, 2001; Verdecchia, 2001). La baja selectividad de los agentes quimioterapéuticos, los diversos niveles de toxicidad en los tejidos normales y el rápido desarrollo de resistencia contra estas drogas conforman los factores limitantes al éxito del tratamiento antineoplásico. Por lo tanto, hay una gran necesidad de desarrollar nuevos y mejores recursos terapéuticos, incluyendo nuevos agentes quimioterapéuticos (Kohn y col., 2006; Verweij y Jonge, 2000).

Actualmente, existe gran interés en el estudio de compuestos alternativos para el tratamiento de diversos padecimientos, incluidos el cáncer, con el fin de no sólo determinar el posible efecto anticancerígeno, sino enfocado también hacia la visualización de los mecanismos de acción que estos tratamientos alternativos tengan contra diversos tipos de cáncer.

El cáncer y las enfermedades infecciosas ocupan una posición primordial con respecto al uso de plantas medicinales como posibles fuentes de medicamentos para su tratamiento, por lo que durante los últimos años el interés en la investigación de productos naturales se ha incrementado, dando como resultado el descubrimiento de medicamentos más eficientes para el tratamiento contra el cáncer (Calixto, 2000; Rates, 2001; Phillipson, 2001).

Desde la antigüedad, las plantas han sido utilizadas como fuentes de compuestos medicinales, y en la actualidad continúan desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la salud humana. Más del 50% de todos los

medicamentos modernos de uso clínico tienen su origen en productos naturales (Suffness y Douros, 1982), los cuales juegan un papel importante en los programas de desarrollo de medicamentos de la industria farmacéutica (Baker y col., 1995; Cordell, 1995).

Las investigaciones sobre la actividad química y biológica de las plantas durante los últimos dos siglos han producido compuestos usados para el desarrollo de la química orgánica sintética moderna y el surgimiento de la química medicinal como ruta importante para el descubrimiento de nuevos y más eficaces agentes terapéuticos (Roja y Rao, 2000). En el estudio de los productos naturales, las tres principales metas son la obtención y caracterización de compuestos bioactivos, la modificación química y síntesis de análogos y finalmente el estudio del mecanismo de acción (Newman y col., 2003).

México posee una de las floras más ricas del planeta, lo que explica la variedad y abundancia de plantas medicinales existentes en el país (aproximadamente 4,000 especies). En el estado de Sonora, existen varios grupos indígenas tales como los Yaquis, Mayos, Pimas, Guarijios, Pápagos y Seris, que han retenido, en mayor o menor grado, el conocimiento del uso de las plantas medicinales de generación en generación. Estos grupos étnicos tienen entre su farmacopea aproximadamente 450 plantas medicinales distintas, entre nativas e introducidas, algunas de las cuales han sido valoradas científicamente por sus propiedades anticancerígenas, antiproliferativas, antioxidantes, antibacteriales y antifúngicas, entre otras (López e Hinojosa, 1988).

Dentro del grupo de plantas que se sabe tienen uso medicinal en Sonora, existen algunas referidas por sus propiedades anticancerígenas, entre éstas se encuentran algunas especies del género *Argemone* (López e Hinojosa, 1988). En éste género se ha reportado la presencia del alcaloide sanguinarina (Devi y

col., 2002), un compuesto al cual se le atribuye un fuerte efecto sobre el proceso de inducción de apoptosis (Yong-Hong y col., 2006).

Por lo anterior, es de gran interés evaluar la actividad antiproliferativa de la especie *Argemone ochroleuca*, la cual es una de las principales especies del género *Argemone*, conocida con nombre común de chicalote o cardo santo. La planta tiene muchos usos dentro de la medicina tradicional de los que destacan el uso del látex para quitar las manchas y carnosidades de los ojos, conciliar el sueño o calmar la tos, se dice que un té de la planta en ayuno combate la diabetes y que las flores aplicadas como emplasto curan la sarna (Calderón, 1991).

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la capacidad antiproliferativa de distintas fracciones obtenidas del extracto metanólico de la especie *Argemone ochroleuca* frente a líneas celulares cancerosas, así como aislar y caracterizar los compuestos responsables de esta actividad. Todo esto con la finalidad de contribuir en la búsqueda de un potencial tratamiento alternativo y eficaz para evitar el desarrollo del cáncer.

## **ANTECEDENTES**

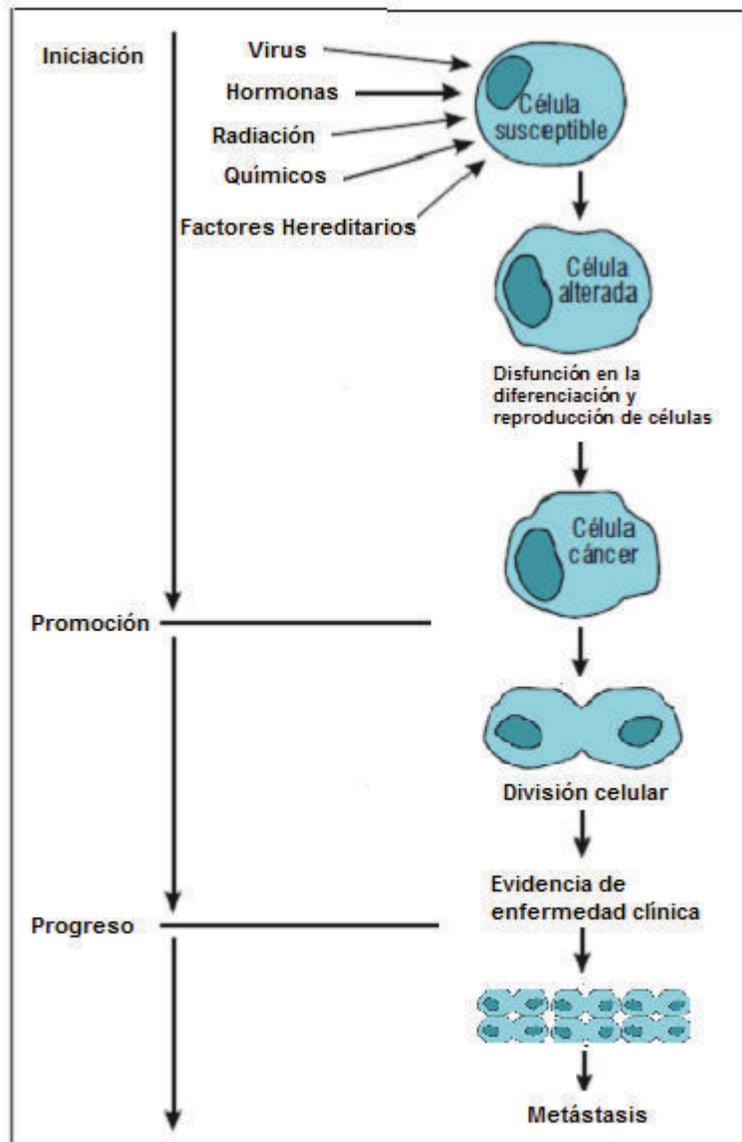
### **Cáncer**

#### **Desarrollo del Cáncer**

El término de cáncer abarca a más de una centena de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal y sin control de células en diferentes partes del cuerpo (Moss, 1998). Las células tumorales suelen derivarse de alguna que ha sufrido cambios en su material genético debido mutaciones o bien a la incorporación del material genético de algún virus oncogénico, y que como resultado no responde a los mecanismos normales de control del ciclo celular (Pacheco, 2001).

Las células normales crecen y se diferencian a través de una compleja gama de señales bioquímicas; de tal forma que las células nuevas son capaces por sí mismas de interrumpir su crecimiento y diferenciarse en el tipo celular que les corresponde de acuerdo a su herencia genética. Cuando las células pierden su capacidad de respuesta adecuada continúan dividiéndose sin limitaciones originando así las neoplasias (Maldonado y col., 1996). Las células tumorales, aumentan su proliferación, incrementan su tendencia a invadir formándose metástasis (Figura 1), tienden a optimizar los procesos anabólicos implicados en la proliferación tales como la síntesis de DNA y RNA, economizando las funciones catabólicas (catabolismo de pirimidinas); también pueden sintetizar proteínas fetales consideradas como marcadores tumorales como el antígeno carcinoembrionario (DiSaia y col., 1999; Lodish y col., 1999).

El cáncer que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal y se clasifica en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos. Los sarcomas proceden del tejido conectivo como huesos, cartílago



**Figura 1.** Etapas en el proceso de carcinogénesis. Tras la lesión que sufre la célula y el cambio genético (mutación), ésta comienza a dividirse rápidamente sin control, una vez formado el tumor, las células pueden migrar generando metástasis (Avelino, 2005).

nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

### **Epidemiología del Cáncer**

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad. En el año 2007, representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres fue la cuarta con 33,509 muertes (11.8%) (INEGI, 2008). Además, más del 70% de todas las muertes por cáncer se producen en los países de ingresos bajos y medios, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015.

En México, durante 2007 se registraron 514,420 defunciones, 55.4% fueron hombres y 44.6% de mujeres; de estas muertes, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68,815 casos (13.4%). Los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI, 2008).

### **Tratamiento**

El cáncer puede ser tratado mediante cirugía o diferentes terapias como la radioterapia, hormonoterapia, quimioterapia, bioterapia o terapia dirigida. Todas

estas terapias intentan destruir todas las células cancerosas produciendo mínimos efectos secundarios. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos son muy agresivos y en muchos casos deterioran la calidad de vida y estado anímico de los pacientes (Ortiz, 2010). También, los tratamientos que matan células cancerosas generalmente son tóxicos para las células normales. En su mayoría, los métodos actuales aprovechan diferencias relativamente sutiles existentes entre las células normales y las neoplásicas como lo son su velocidad de proliferación, su metabolismo y la sensibilidad a la radiación.

En la naturaleza se tiene un amplio potencial de recursos terapéuticos que puede brindar un beneficio como tratamientos de enfermedades que afectan al humano. Muchos de estos productos farmacéuticos han sido aislados a partir de productos naturales como plantas, animales, organismos marinos y microorganismos. Por ejemplo, el paclitaxel, derivado de plantas, bleomicina y doxorubicina provenientes de microorganismos; dolastina 10 es de origen marino.

Por estas razones, se realizan investigaciones para la búsqueda de compuestos de origen natural que inhiban la proliferación de las células cancerosas, enfocando gran atención a compuestos aislados de plantas medicinales (Avelino, 2005).

## **Plantas Medicinales**

### **Perspectiva Histórica**

El uso terapéutico de las plantas se remonta a la civilización sumeria la cual es considerada la más antigua de la humanidad. Se tienen registros de que Hipócrates utilizó aproximadamente 400 especies diferentes de plantas con fines medicinales. Los productos naturales han desempeñado un papel destacado en los antiguos sistemas de medicina tradicional, como el chino, de

la India y el egipcio, que todavía están en uso común. Según la OMS el 75% de las personas todavía dependen de los medicamentos tradicionales a base de plantas para la atención primaria de salud a nivel mundial (Tabla I).

### **Etnobotánica en México**

La etnobotánica es una ciencia que estudia las relaciones existentes entre el hombre y las plantas en un contexto cultural; es decir, a través del tiempo y en un espacio determinado, intentando recobrar la medicina tradicional de los pueblos indígenas. El uso de las plantas medicinales en México se practica desde tiempos prehispánicos. Con la existencia de población indígena de casi 10 millones de habitantes que dependen de las plantas como terapia medicinal primordial a partir de la gran diversidad de flora (casi 5,000 plantas medicinales), México es un excelente área para llevar a cabo estudios etnofarmacológicos. (Navarro y col., 1996).

En la medicina tradicional mexicana se da el uso de plantas para tratar una amplia gama de infecciones comunes. Prácticamente todas las partes de la planta pueden emplearse: la raíz, el tallo, la corteza, las hojas, las flores, el fruto, la resina o goma y la leche o látex; estos productos vegetales se emplean en forma de cocimiento, té o tisana, polvos, ungüentos, emplastos, gotas, sahumeros; mascados, comidos y bebidos en forma de tinturas. Se reconoce de entre todos éstos a las tisanas, cocimientos, pomadas, ungüentos, cataplasmas, tinturas y baños como los de uso más corriente (Cifuentes y col., 1990; Valdez, 1998; Saldierna y col., 2001).

En el Estado de Sonora persiste aun una variedad de formas biológicas del reino vegetal que constituyen desde milenios, los sustentadores elementales de vida de las comunidades autóctonas (Valenzuela, 2000). Las plantas más conocidas y más empleadas lo son por su demostrada efectividad para curar ciertos males y que crecen en estado silvestre. De hecho, varios grupos indígenas tales como los Yaquis, Mayos, Pimas, Guarijíos, Pápagos y Seris,

**Tabla I.** Historia de la medicina de productos naturales (Sarker y col., 2006).

<b>Periodo</b>	<b>Personaje</b>	<b>Descripción</b>
3000 A.C.	Aryurveda (conocimiento de la vida) Medicina tradicional china	Introdujo las propiedades medicinales de las plantas y otros productos naturales.
1550 A.C.	<i>Ebers Papyrus</i>	Recopiló un gran número de drogas crudas de origen natural (semillas de castor y goma arábrica).
460-377 A.C.	Hipocrates “El Padre de la Medicina”	Describió distintas plantas y animales que podían utilizarse en medicina.
370-287 A.C.	Teofrasto	Describió distintas plantas y animales que podían utilizarse en medicina.
23-79 D.C.	Plinio “El Viejo”	Describió distintas plantas y animales que podían utilizarse en medicina.
60-80 D.C.	Dioscorides	Escribió <i>De Materia Medic</i> , en esta obra describió más 600 plantas medicinales.
131-200 D.C.	Galeno	Practicó la medicina botánica (Farmacia Galénica) y la hizo popular en el oeste.
Siglo 15	Kräuterbach (Herbolaria)	Presentó información y fotografías de plantas medicinales.

han retenido, en mayor o menor grado, el conocimiento del uso de las plantas medicinales de generación en generación (Johnson y col., 1996).

Existe una bibliografía etnobotánica local que describe las especies de plantas más frecuentemente utilizadas por la población para curar infecciones gastrointestinales, respiratorias, urinarias y de la piel. Sin embargo, en la actualidad hay una carencia en los estudios científicos experimentales que confirmen las posibles características antibióticas de una gran cantidad de estos remedios. Los métodos experimentales antimicrobianos *in vitro* proporcionan los datos preliminares requeridos para seleccionar, entre los productos vegetales crudos, aquellos con características potencialmente útiles para llevar a cabo posteriormente los estudios fitoquímicos y farmacológicos correspondientes (Navarro y col., 1996).

### **Productos Naturales**

Los productos naturales provenientes de plantas son valorados por el hombre como fuente de principios activos para uso medicinal (Farnsworth y col., 1992) debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios. Un impresionante número de medicamentos modernos se han derivado de fuentes naturales, muchas basadas en su uso en la medicina tradicional. Durante el último siglo, un buen número de los medicamentos más vendidos se han desarrollado a partir de productos naturales (vincristina de *Vinca rosea*, la morfina de *Papaver somniferum*, Taxol de *Taxus brevifolia*, etc.).

Aproximadamente el 40% de los medicamentos modernos en uso, se han desarrollado a partir de productos naturales. Según Cragg y col. en 1995, el 39% de los 520 nuevos medicamentos aprobados entre 1983 y 1994 fueron los productos naturales o sus derivados, y del 60-80% de los fármacos antibacterianos y contra el cáncer eran de origen natural. En el año 2000, aproximadamente el 60% de todos los medicamentos en ensayos clínicos para múltiples tipos de cáncer era de origen natural. En 2001, ocho (simvastatina,

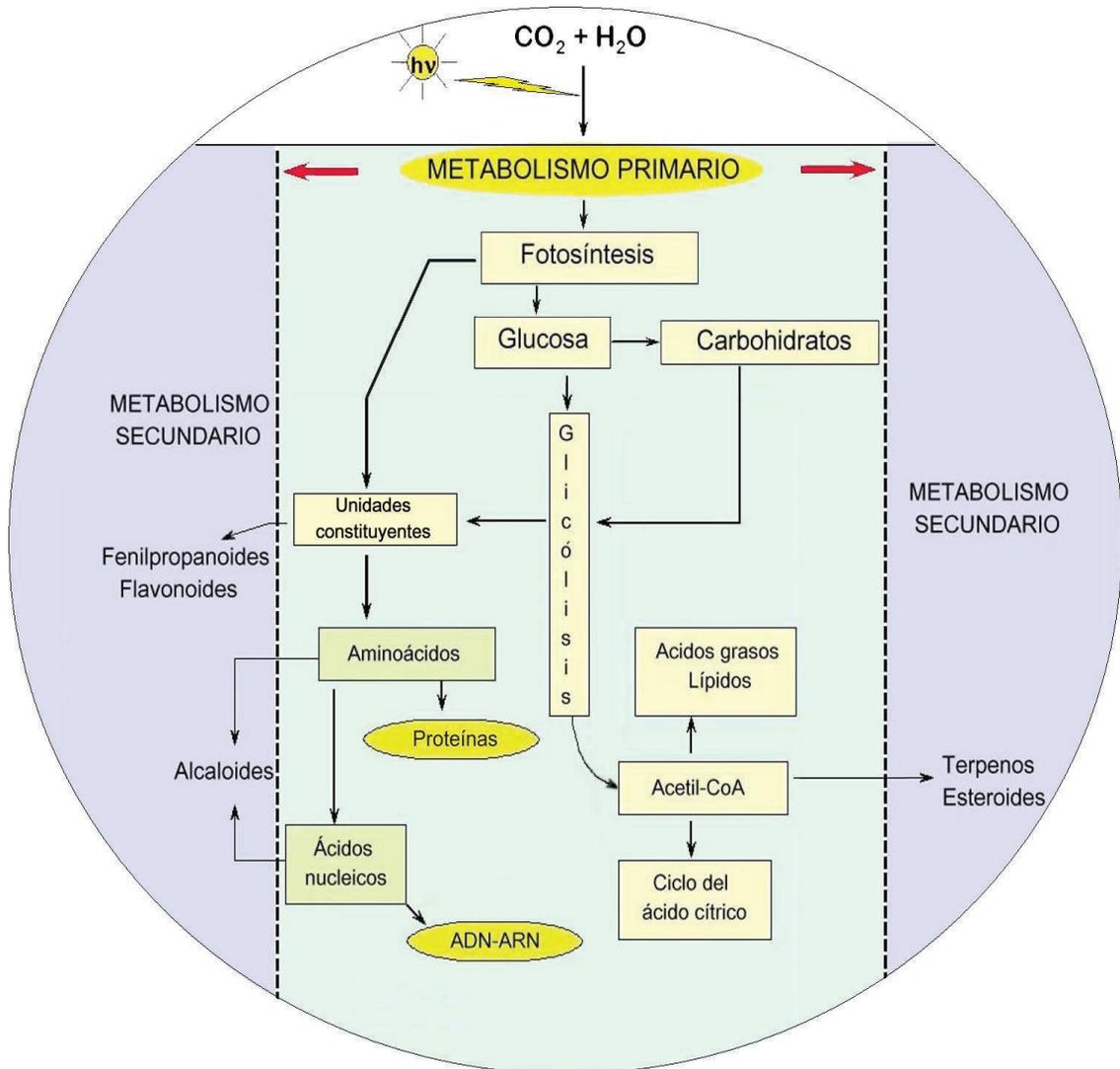
pravastatina, amoxicilina, ácido clavulánico, azitromicina, ceftriaxona, ciclosporina, y paclitaxel) de los 30 medicamentos más vendidos eran los productos naturales o sus derivados, y los ocho medicamentos juntos acumularon 16 billones de dólares en ventas en Estados Unidos.

Los productos naturales contribuyen de manera importante a la búsqueda de nuevos medicamentos, por ejemplo, medicamentos sintetizados a partir de compuestos aislados que se pueden utilizar sin modificaciones a su estructura química (por ejemplo, vincristina de *Catharanthus roseus*), por las características y propiedades químicas de los compuestos aislados que ofrecen las bases para que a partir de ellos puedan sintetizarse moléculas más complejas (por ejemplo, diosgenina de *Dioscorea floribunda* para la síntesis de los anticonceptivos orales) e indicando nuevos mecanismos de acción farmacológico que permite la síntesis completa de nuevos medicamentos análogos (por ejemplo análogos sintéticos de la penicilina por *Penicillium notatum*).

Además, la introducción y desarrollo de varias técnicas nuevas y muy específicas de ensayos biológicos *in vitro*, métodos cromatográficos y espectroscópicos, en especial la resonancia magnética nuclear (RMN), han hecho mucho más fácil para detectar, aislar e identificar posibles compuestos con potencial de drogas de forma rápida y con precisión.

### **Componentes Bioactivos de las Plantas Medicinales**

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Figura 2).



**Figura 2.** Elementos básicos del metabolismo primario y metabolismo secundario de plantas (Ávalos y Pérez Urría, 2009).

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios) (Figura 2).

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.(Ávalos y Pérez Urría, 2009).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales:

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- **Glicósidos.** Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- **Alcaloides.**

### Terpenos

Los terpenos o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono (C)). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

El grupo de los terpenos incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas).

Muchos terpenoides tienen un importante valor fisiológico y comercial. Por ejemplo su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc. (Ávalos y Pérez Urría, 2009).

## **Compuestos Fenólicos**

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides.

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como taninos, cumarinas y los lignanos. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Las cumarinas son una amplia familia de lactonas que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Los flavonoides tienen esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación. Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas (Ávalos y Pérez Urría, 2009).

## **Glicósidos**

Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos.

Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Estos compuestos dan a lugar a propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón. Los glicósidos cardíacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la

planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Ávalos y Pérez Urría, 2009).

### **Alcaloides**

Los alcaloides son un grupo grande y heterogéneo de moléculas nitrogenadas que se derivan de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos). Se clasifican según sus anillos heterocíclicos (McKee, 2003) y se pueden dividir en 5 grupos: alcaloides isoquinoléicos, alcaloides quinolozídicos, alcaloides pirrolizídicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Sepulveda, 2003).

Los alcaloides tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7.2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, a mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos (Ávalos y Pérez Urría, 2009).

### **Estudios Fitoquímicos en la Investigación Contra el Cáncer**

La Fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales.

Para la investigación de principios activos extraídos de plantas con aplicación terapéutica ante el cáncer se recomienda seguir una serie de

estrategias dentro de un programa de investigación bien establecido, dicha investigación requiere de un esfuerzo multidisciplinario de expertos en diferentes campos (McChesney, 1993). El Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (NCI) resume estas estrategias en 5 etapas:

**Etapa 1.** Adquisición de la muestra; para lo cual se requiere de una fuente natural confiable, análisis de bases de datos, la recolección, clasificación taxonómica y literatura especializada.

**Etapa 2.** El material vegetal recolectado tras un proceso de secado, se somete a la extracción con diferentes solventes, obteniéndose un extracto crudo (completo). Es importante la forma y tipo de solventes empleados para la preparación de los extractos, así como el tipo de extracción que de ellas se realiza, ya que de esto dependen los posibles compuestos bioactivos que se extraerán y como consecuencia las actividades que de ellos se deriven, la Tabla II nos muestra el tipo de compuestos químicos que se obtienen cuando el material vegetal se extrae con un sólo solvente.

**Etapa 3.** Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de los extractos crudos empleando ensayos a corto plazo, estos resultados deben correlacionarse con los de la etapa 5. Para el fraccionamiento se utilizan comúnmente técnicas cromatográficas como en columna, de afinidad, de exclusión de tamaño, etc.

**Etapa 4.** Pruebas de inhibición de la carcinogénesis de los extractos crudos, sus fracciones y compuestos purificados en cultivos de órganos o modelos animales.

**Etapa 5.** Síntesis y modificación de los principios activos aislados después de los proyectos anteriores, una vez que haya sido elucidada su estructura química, preparando una serie de compuestos derivados y observando la relación entre estructura y actividad, así como su mecanismo de acción (McChesney, 1993; Pezzuto, 1995).

**Tabla II.** Compuestos obtenidos de plantas por extracción con distintos disolventes (Avelino, 2005).

<b>Agua</b>	<b>Etanol</b>	<b>Metanol</b>	<b>Cloroformo</b>	<b>Diclorometano</b>
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides
Almidones	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides	
Taninos	Poliacetilenos	Saponinas		
Saponinas	Flavonoles	Taninos		
Terpenoides	Terpenoides	Xantoxilinas		
Polipéptidos	Esteroles	Totaroles		
Lecitinas	Alcaloides	Lactonas		
	Propóleo	Flavonas		
		Fenonas		
		Polifenoles		

También debe evaluarse la toxicidad de los compuestos, su aplicación en tratamientos clínicos y su comercialización.

### ***Argemone ochroleuca***

#### **El Género Argemone**

El género *Argemone* pertenece a la familia *Papaveraceae* y está constituido por 28 especies con numerosas subespecies y variedades identificadas (Stermitz y col., 1969). Hay poco más de 20 especies distribuidas en regiones templadas y tropicales casi exclusivamente de América, aunque una de ellas, *Argemone mexicana* L. ha sido introducida a muchas otras partes del mundo. En México, con frecuencia se les denomina “chicalote”. Las especies del Valle de México con frecuencia han sido confundidas con *Argemone mexicana* L. que habitan en lugares más cálidos. Por lo que en esta misma región pueden encontrarse dos especies: *Argemone ochroleuca* Sweet y *Argemone platyceras* Link & Otto (Calderón, 1991).

#### **Información Taxonómica**

<b>Reino</b>	<i>Plantae.</i>
<b>Phylum</b>	<i>Magnoliophyta.</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida.</i>
<b>Orden</b>	<i>Papaverales.</i>
<b>Familia</b>	<i>Papaveraceae.</i>
<b>Género</b>	<i>Argemone.</i>
<b>Especie</b>	<i>ochroleuca.</i>
<b>Nombre Científico</b>	<i>Argemone ochroleuca</i> subsp. <i>ochroleuca</i> Sweet.
<b>Autor del nombre</b>	Sweet.

### **Descripción Botánica**

De acuerdo con Calderón (1991) son plantas herbáceas de 30 cm a 1.2 m de alto, anuales o perennes con látex acuoso blanquecino o amarillento hasta anaranjado o rojizo, erectas o ascendentes, por lo común espinosas, tallos con frecuencia muy ramificados, hojas a menudo dispuestas tanto en roseta basal como alternas sobre el tallo. Sus hojas son lanceoladas de hasta de 35 cm de largo, botones oblongos de 8 a 18 mm de largo por 4 a 11 mm de ancho con 3 ó más espinas finas sobre cada sépalo, cuerno apical y su espina de 5 a 12 mm de largo. Tiene flores de 3 a 7 cm de diámetro; con 6 pétalos amarillos a blancos o color crema, lanceolados; estambres numerosos (20 a 75) con filamentos y anteras amarillas. Sus frutos y semillas son similares a una cápsula 3 a 6 cm., con espinas más bien esparcidas, extendidas, blanquecinas, gruesas, de 6 a 12 mm de largo, a veces mezcladas con otras más pequeñas; semillas globoso apiculadas, de 1.5 a 2 mm de diámetro (Figura 3).

### **Distribución Geográfica**

Planta nativa de México, se distribuye del sur de Estados Unidos hasta regiones mesoamericanas de México. Se desarrolla principalmente en ecosistemas de bosque de pino-encino y en zonas áridas. Se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

### **Usos en la Medicina Tradicional**

La especie *Argemone ochroleuca* es conocida con diversos nombres comunes, entre los que se encuentran: cardo blanco, amapola espinosa pálida, chicalote pálido, hierba del diablo, espinosilla. Cuenta con una gran trayectoria de uso medicinal en México, la referencia más antigua encontrada, corresponde al



**Figura 3.** *Argemone ochroleuca* Sweet (CONABIO, 2000).

Códice Florentino del siglo XVI, que menciona que era utilizada para aliviar el dolor de ojos al aplicar unas gotas del látex de la planta en ellos. En el siglo XX, el Instituto Médico Nacional señaló su utilidad como: antiescabiático, cicatrizante, contra algunas enfermedades de los ojos y contra dermatosis. Posteriormente se reportaron sus usos como anticonvulsivo, antidiarreico, antiespasmódico, antitusígeno, hipnótico, narcótico y analgésico, así como para tratar enfermedades articulares (Sánchez, 2007).

El cardo blanco posee propiedades sudoríficas, el jugo de esta planta se usa contra la hidropesía, las semillas son vomitivas y purgantes, lo mismo que el aceite que se extrae de ellas. En Brasil se usan cataplasmas para curar las úlceras y los bubones sífilíticos. Además, se usa para las enfermedades hepáticas: protege, sana y reconstituye. Algunas personas la utilizan en forma de té para la diabetes. Esta especie es principalmente recomendada para curar el "mal de ojo" al cual los otomíes denominan yiato, afección que se manifiesta por tener los ojos irritados o infectados. Asimismo, es muy frecuente su uso en problemas dermatológicos. Por otra parte, se sugiere tomar la infusión de las semillas antes de acostarse para combatir el insomnio. La infusión hecha con los pétalos, se emplea para aliviar la tos, tomando una taza durante dos días, en la mañana y en noche. Para curar la bilis y en casos de diabetes, se bebe en ayunas el cocimiento de las hojas, al que se le agrega látex. También se recomienda aplicar masajes con el látex sobre las encías inflamadas, y poner las hojas machacadas en las sienes cuando hay dolor de cabeza. Se menciona su uso medicinal contra gingivitis, reumas, mal de orín, mal de ojo, y aire malo. Se le atribuyen propiedades como antiespasmódico y narcótico. En estos casos las fuentes no mencionan qué parte de la planta se ocupa ni cómo (Sánchez, 2007).

## **Estudios Fitoquímicos**

Se conocen varios estudios con la principal especie del género *Argemone*, que es *Argemone mexicana*. De esta se ha reportado la presencia principalmente de alcaloides como berberina, protopina, sanguinarina e isoquinolinas, también de flavonoides, compuestos fenólicos, aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos (Stermitz y col., 1969; Bhardwaj y col., 1982; Saleh y col., 1987; Fletcher y col., 1993). Chang en 2003 reportó el aislamiento de varios alcaloides de benzofenantridina y bencilisoquinolina con actividad antitumoral y antiproliferativa en *Argemone mexicana*.

Han sido reportadas diversas actividades farmacológicas del género *Argemone* entre las que se encuentran: anti-inflamatoria (Sukumar y col., 1984), antimicrobiana (Zavala y col., 1997), espasmolítica en íleon de cobayo (Piacente y col., 1997) y antiprotozoaria contra *Plasmodium falciparum* (Bourdy y col., 2004). Adicionalmente, Fernandez y colaboradores publicaron que el flavonoide isoquercitrina aislado de *Argemone platyceras* inhibe las contracciones inducidas por carbacol y leucotrieno D4 en vías aéreas de cobayo (Fernández y col., 2005).

Sin embargo se conocen pocos reportes acerca del estudio químico de la especie *Argemone ochroleuca*. Se han identificado ácidos grasos (Fletcher y col., 1993) y diversos alcaloides, tales como: sanguinarina, queleritrina, protopina, berberina, dihidrosanguinarina, dihidroquelerithrina,  $\alpha$ -allocriptopina, heleritrina, queilantifolina, scouletrina, reticulina y coptisina (Haisova y Slavik, 1973; Israilov y col., 1986; Chelombit'ko y Nazarova, 1988; Takken y col., 1993). Sánchez en 2007, reportó el mecanismo de acción relajante de berberina en anillos de tráquea de cobayo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención del Extracto Metanólico**

La planta fue colectada en el municipio de Santa Ana, Sonora y la especie fue identificada por el Herbario de la Universidad de Sonora. El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se homogenizó a un tamaño de malla de 2-3 mm en un molino tipo Wiley. A una cantidad determinada del homogenizado, se le adicionó metanol (1:10 peso/vol) y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación periódica. Se filtró en papel Whatman No. 2 y posteriormente el extracto metanólico recolectado se concentró en un evaporador rotatorio a 40°C bajo presión reducida.

### **Obtención de Fracciones del Extracto Metanólico**

El extracto metanólico se fraccionó con los solventes: hexano, acetato de etilo y etanol. Se realizaron tres lavados con 400 mL de cada uno de los solventes, con agitación constante por al menos 12 horas. El volumen de solvente obtenido (1,200 mL) fue evaporado en un rotavapor a una temperatura de 50°C y a presión reducida. Se obtuvieron cuatro fracciones de distinta polaridad del extracto metanólico, la primera (F1) fue la fracción de hexano, la segunda (F2) la fracción de acetato de etilo, la tercera (F3) la fracción de etanol y (F4) el residuo.

Una vez obtenido el extracto metanólico y sus fracciones se procedió a la preparación de soluciones primarias de 40 mg/mL y se congelaron para su uso posterior en los ensayos de proliferación frente a distintas líneas celulares cancerosas.

## **Actividad Biológica del Extracto Metanólico y de las Fracciones de *Argemone ochroleuca***

### **Líneas Celulares**

Se emplearon las líneas celulares cancerosas murinas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 (linfoma de células B) y Raw 264.7 (macrófago/monocito transformado por virus de leucemia de Abelson). Además se emplearon líneas celulares cancerosas humanas HeLa (adenocarcinoma de cérvix), A-549 (adenocarcinoma de pulmón) y LS-180 (adenocarcinoma de colon). Como control de células normales se empleó la línea celular murina L929 (tejido conectivo). Todas las células fueron obtenidas en *American Type Culture Collection* (ATCC). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5% con suero fetal bovino a una temperatura de 37°C, y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Evaluación de la Proliferación Celular Mediante el Ensayo de MTT**

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos y compuestos obtenidos de la planta, se utilizaron las líneas celulares descritas anteriormente. Estas células se incubaron a una concentración de 10,000 células/pozo, en placas de 96 pozos de fondo plano en presencia de diferentes concentraciones (diluciones seriadas desde 400 µg/mL hasta 6.25 µg/mL) de los extractos a estudiar y por triplicado. Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 80-90% en incubadora, por un periodo de 48 horas. Posteriormente, se añadió la sal de MTT y se incubó por 4 horas para evaluar la proliferación celular (Velázquez y col., 2007).

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que mide la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas (reductasas), presentes sólo en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración

amarilla [bromuro de 3-(4,5-dimetitiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio], para reducirlo a cristales de formazán de color azul-púrpura, dichos cristales son impermeables a la membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas. Los cristales de formazán resultantes se solubilizan con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se lee a 570nm - 655nm en un lector de ELISA (Velázquez y col., 2007).

### **Análisis Estadístico**

Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos de actividad antiproliferativa se realizaron gráficas de concentración/proliferación calculadas con el programa GRAPH PAD PRISM 3.

Después para obtener los valores de la concentración inhibitoria de crecimiento 50 (IC<sub>50</sub>) se creó una base de datos en el paquete Microsoft Excel 2007 y se calculó mediante un análisis de regresión lineal (ecuación de la recta:  $y = m x + b$ ), esto para las gráficas que mostraran un comportamiento dosis-dependiente. En el caso de los valores que no mostraran este comportamiento el valor de IC<sub>50</sub> se calculó por medio de una regresión no lineal logarítmica (ecuación de la recta:  $y = m \ln x + b$ ).

Finalmente se llevó a cabo un análisis de comparación de medias por medio de la prueba de Tukey (P<0.05) haciendo uso del programa SAS (SAS Institute, 2005). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

## **Fraccionamiento y Purificación de Compuestos Activos**

### **Fraccionamiento por Cromatografía**

Las fracciones de la planta que presentaron actividad biológica se fraccionaron mediante cromatografía en columna de sílica gel (Liu y col., 2008) (Instituto de Química, UNAM). Para esto se utilizaron 5 gramos de la fracción activa, se sometieron a cromatografía en columna con sílica gel 30-70 mesh como fase

estacionaria y como fase móvil una mezcla hexano, acetato de etilo, etanol y agua en gradiente. Se colectaron fracciones de un volumen de 200 a 250 mL y posteriormente se procedió a la evaporación del disolvente. Se realizó una cromatografía en capa fina para juntar las fracciones con patrones cromatográficos similares. Esto se llevó a cabo utilizando cromatofolios de sílica gel 60 (0.20 mm) F254 (Alltech) que se revelaron mediante una lámpara de UV (Spectroline CM-10) y exposición a sulfato cérico.

### **Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)**

Para la separación e identificación de compuestos mediante HPLC (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007), se utilizó un equipo RP-HPLC Varian Pro-Star 320 (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD), equipado con una columna Lichrospher 100 RP-18 (150x4mm, 5µm de tamaño de partícula) y como fase móvil un gradiente de metanol (A) y ácido fórmico 5% (B), a un flujo de 1 mL/min, iniciando con 30% de B por 15 min, hasta alcanzar 40% de B a los 20 min, 45% a los 30 min, 60% a los 50 min y 80% a los 52 min, manteniéndose así por 60 min. Para el seguimiento de las fracciones, se utilizó un detector UV-Vis (Varian) a 280 nm.

## **Caracterización de Compuestos**

### **Infrarrojo**

El análisis por Infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer Modelo Spectrum GX, formando pastillas con bromuro de potasio.

### **Resonancia Magnética Nuclear**

Los análisis por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un espectrómetro Bruker modelo Avance 400, que opera a 400 MHz, usando tetrametilsilano como

referencia interna. Los compuestos se disolvieron en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Nonin-Lecomte y col., 2006) (Departamento de Polímeros, UNISON).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención del Extracto Metanólico de *Argemone ochroleuca* y sus Fracciones

Para la obtención del extracto crudo metanólico se emplearon 1.3 kg de material vegetal, el cual una vez seco fue llevado a molienda hasta obtener un polvo homogéneo. De la extracción con metanol se obtuvieron 150 g de extracto metanólico (12% de rendimiento).

Una vez obtenido el extracto metanólico, se fraccionó utilizando disolventes en orden creciente de polaridad, siendo hexano, acetato de etilo y etanol. A partir de 75 g del extracto metanólico, se obtuvieron 15 g de fracción hexánica (20% de rendimiento), 10 g de fracción de acetato de etilo (13% de rendimiento), 8 g de fracción etanólica (11% de rendimiento) y 40 g de fracción residual (53% de rendimiento).

### Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico y sus Fracciones

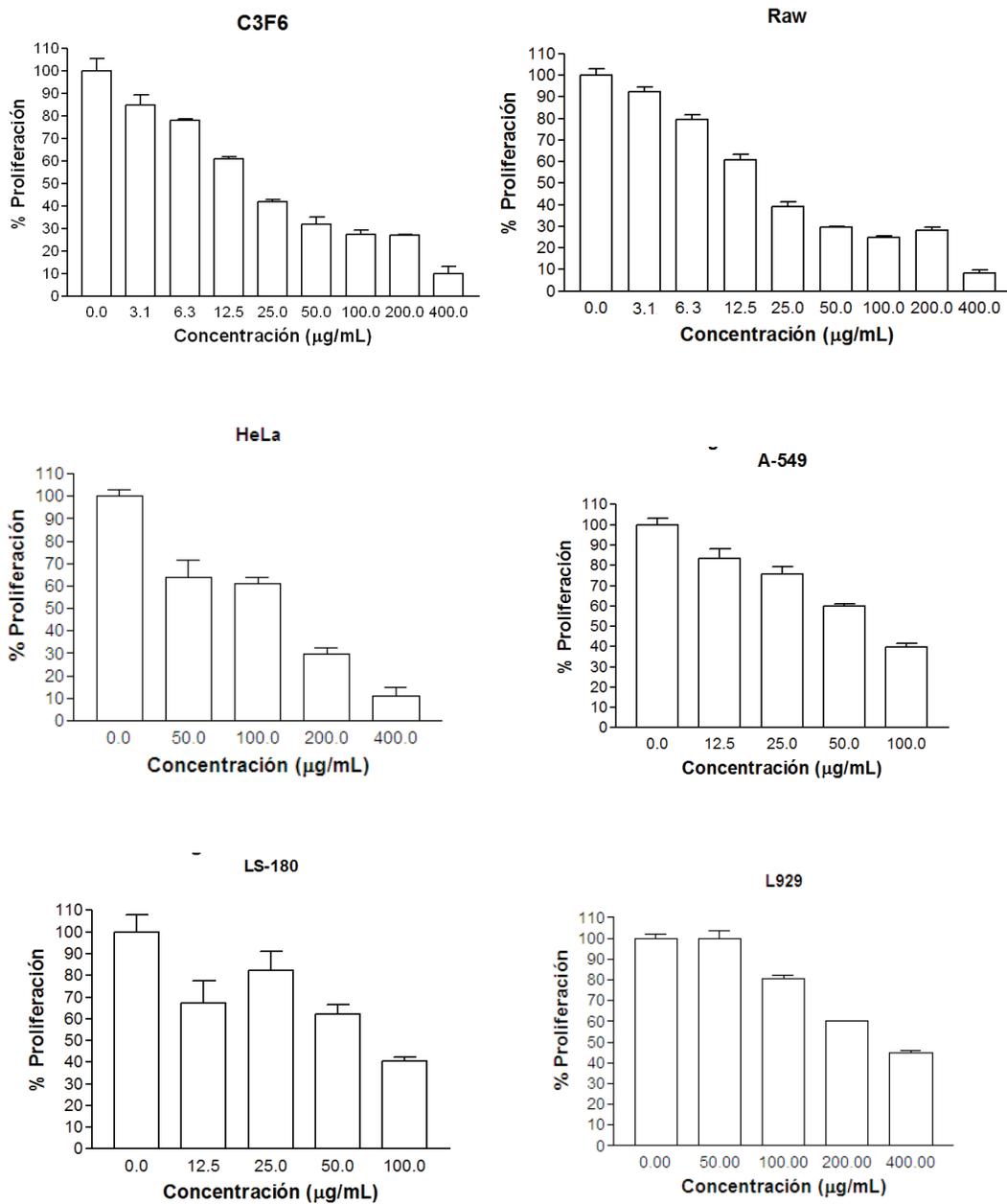
Para la evaluación de la actividad del extracto metanólico y las fracciones de *Argemone ochroleuca* se realizó el método colorimétrico del MTT, utilizando diversas líneas celulares cancerosas y una línea celular no cancerosa como control. En este trabajo, la actividad de los extractos se consideró alta si el IC<sub>50</sub> era  $\leq 30$   $\mu\text{g/mL}$ , media entre 30 – 100  $\mu\text{g/mL}$  y baja  $>100$   $\mu\text{g/mL}$  (Suffness y Pezzuto 1990; Moo-Puc, 2009).

Primeramente se evaluó la actividad del extracto crudo metanólico en una gama de concentraciones desde 3.1 hasta 400  $\mu\text{g/mL}$ , encontrando una actividad antiproliferativa importante, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> para M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $18.8 \pm 5.8$   $\mu\text{g/mL}$ , para Raw 264.7 de  $18.2 \pm 2.6$   $\mu\text{g/mL}$ , para HeLa,  $132.6 \pm 13.3$   $\mu\text{g/mL}$ , en el caso de A-549 de  $78.8 \pm 3.0$   $\mu\text{g/mL}$  y finalmente para LS-180 de  $>100$   $\mu\text{g/mL}$ . Observando los resultados anteriores se puede destacar que el extracto metanólico tuvo una mayor actividad en las líneas

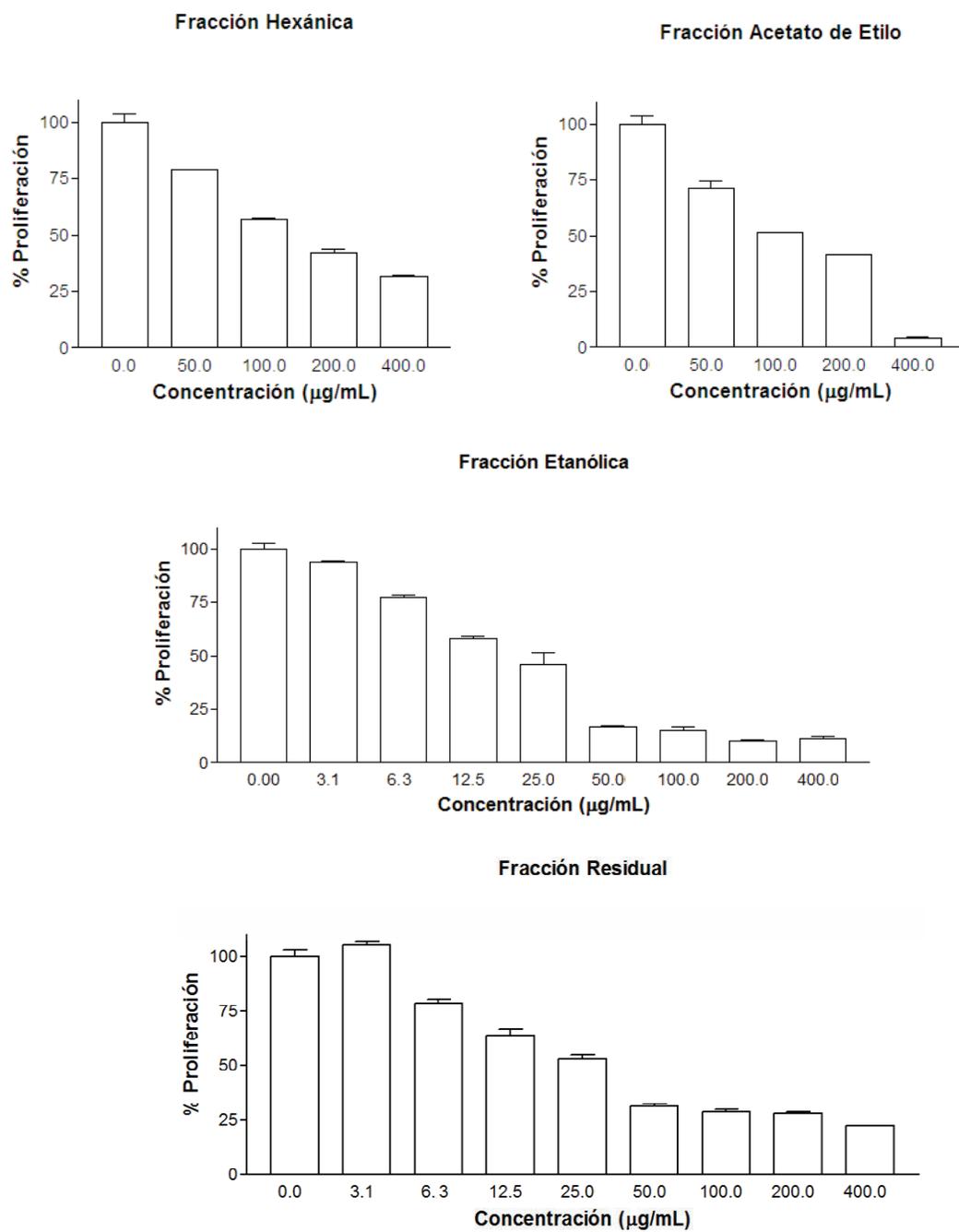
celulares M12.A<sup>k</sup>.C3F6 y Raw 264.7. En el caso de la línea celular no cancerígena L929 se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 336.0±3.3 µg/mL, concentración mucho mayor que las que tuvieron efecto en las líneas celulares cancerosas, indicando esto una cierta especificidad de los extractos contra las líneas celulares cancerosas en comparación con nuestro control de crecimiento celular normal (Figura 4).

Una vez obtenida la información de actividad antiproliferativa del extracto metanólico, se procedió a evaluar la actividad de las fracciones obtenidas del mismo. En el caso de la línea celular M12.A<sup>k</sup>.C3F6 (Figura 5) se observó una actividad baja para la fracción hexánica y actividad media de acetato de etilo, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> de 128.5±7.4 y 75.5±4.5 µg/mL respectivamente, mientras que para las fracciones etanólica y residual se observó una actividad alta con valores de IC<sub>50</sub> de 24.2±1.1 y 29.5±3.4 µg/mL respectivamente. Para la línea celular Raw 264.7 (Figura 6) se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> para la fracción hexánica de 122.4±8.5 µg/mL y para acetato de etilo de 84.5±4.6 µg/mL, mientras que para la fracción etanólica se obtuvo un valor de 27.4±8.3 y para la residual de 32.3±6.0 µg/mL. Para la línea celular HeLa (Figura 7) se observó una menor actividad para todas las fracciones. Para las fracciones hexánica y de acetato de etilo se observó una actividad baja, obteniendo en el caso de la hexánica un valor de IC<sub>50</sub> de 384.3±1.0 µg/mL y para la de acetato de etilo se obtuvo un valor de 329.8±0.5 µg/mL. Para la fracción etanólica y residual, se observó una actividad media (99±0.2 µg/mL) y baja (158.0±28.0 µg/mL).

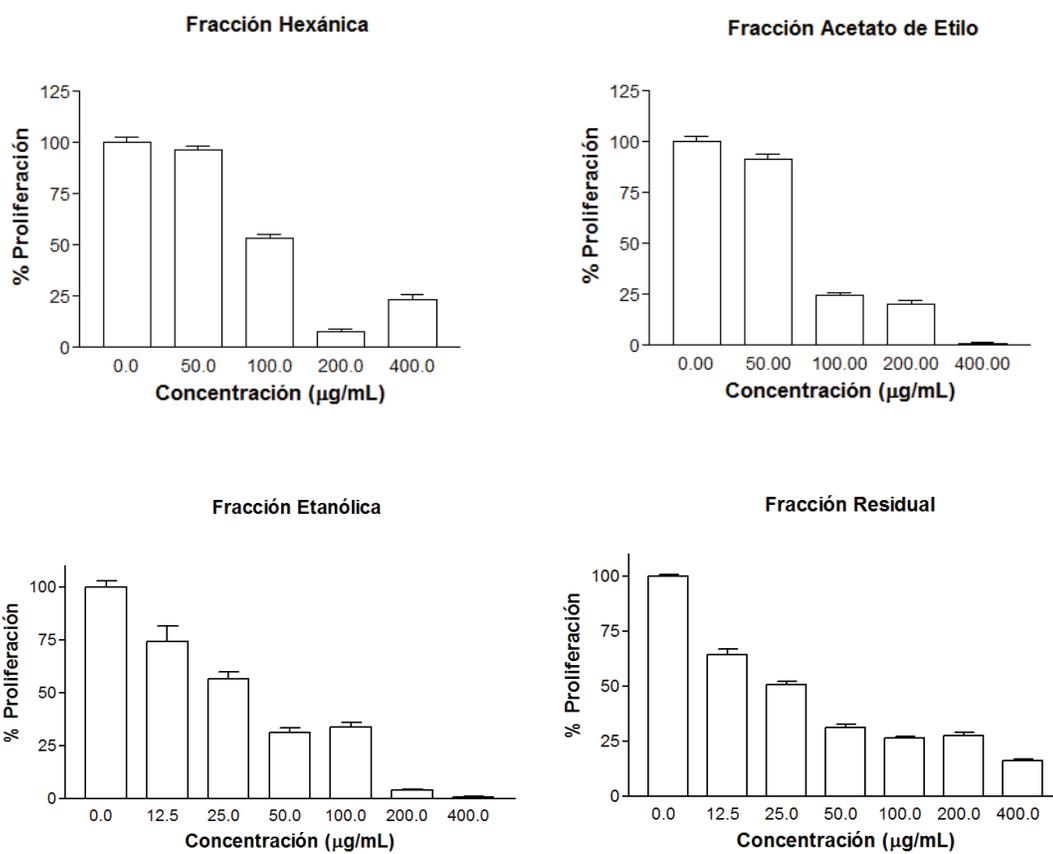
Para la línea celular A-549 (Figura 8) se observó una actividad moderada, obteniendo para todas las fracciones valores de IC<sub>50</sub> >100 µg/mL. En el caso de la línea celular LS-180 (Figura 9), para las fracciones hexánica y de acetato de etilo se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> >100 µg/mL, mientras que para las fracciones etanólica y residual se obtuvieron valores de 63.6±8.3 y 71.6±7.5 µg/mL, respectivamente. Finalmente para la línea celular control L929 (Figura 10) se observó una baja actividad antiproliferativa para todas las fracciones,



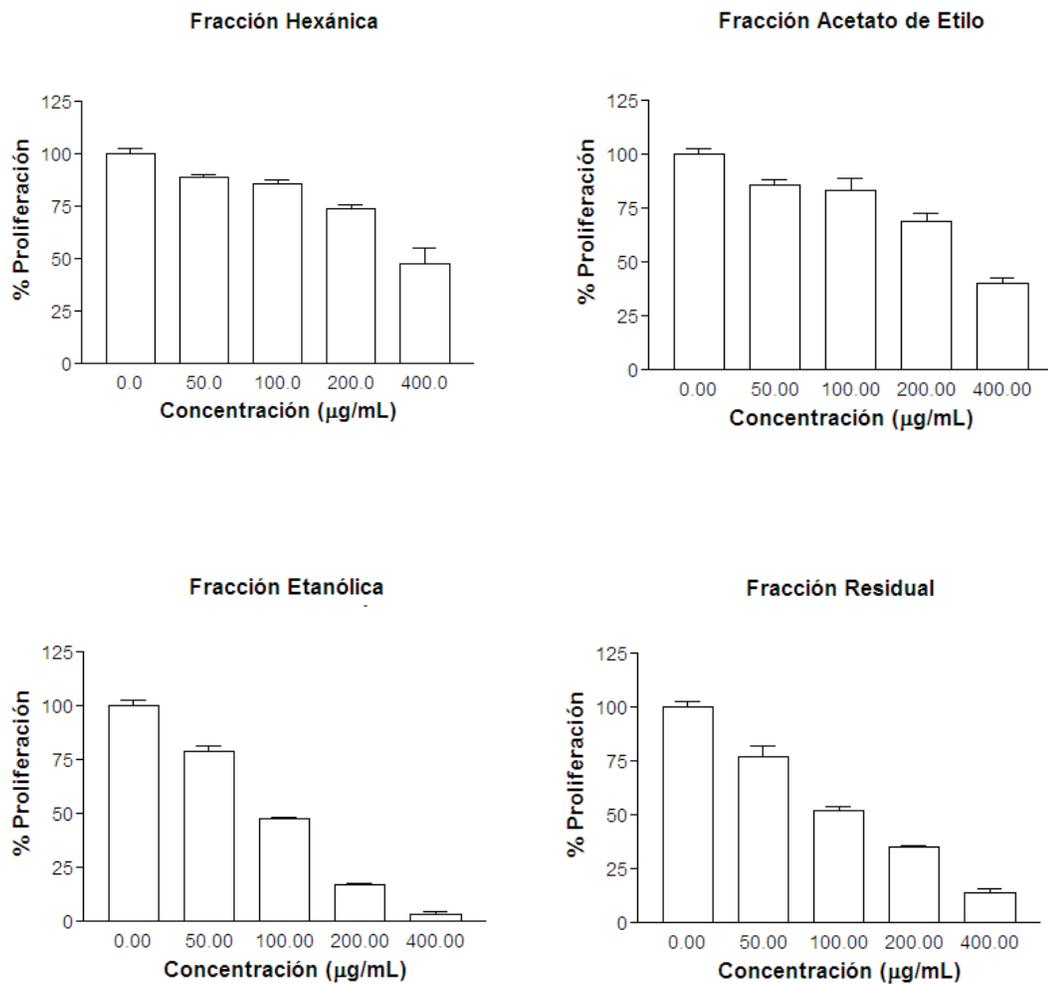
**Figura 4.** Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6, Raw 264.7. HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.



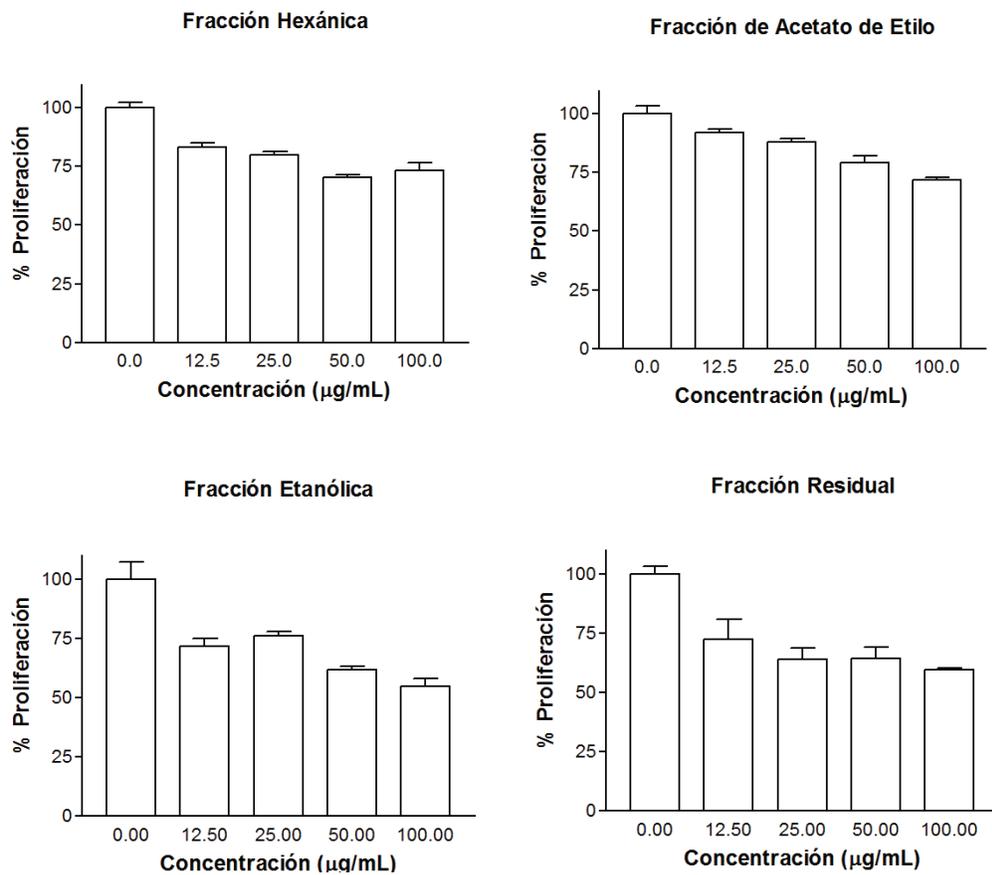
**Figura 5.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular cancerosa M12.A<sup>k</sup>.C3F6.



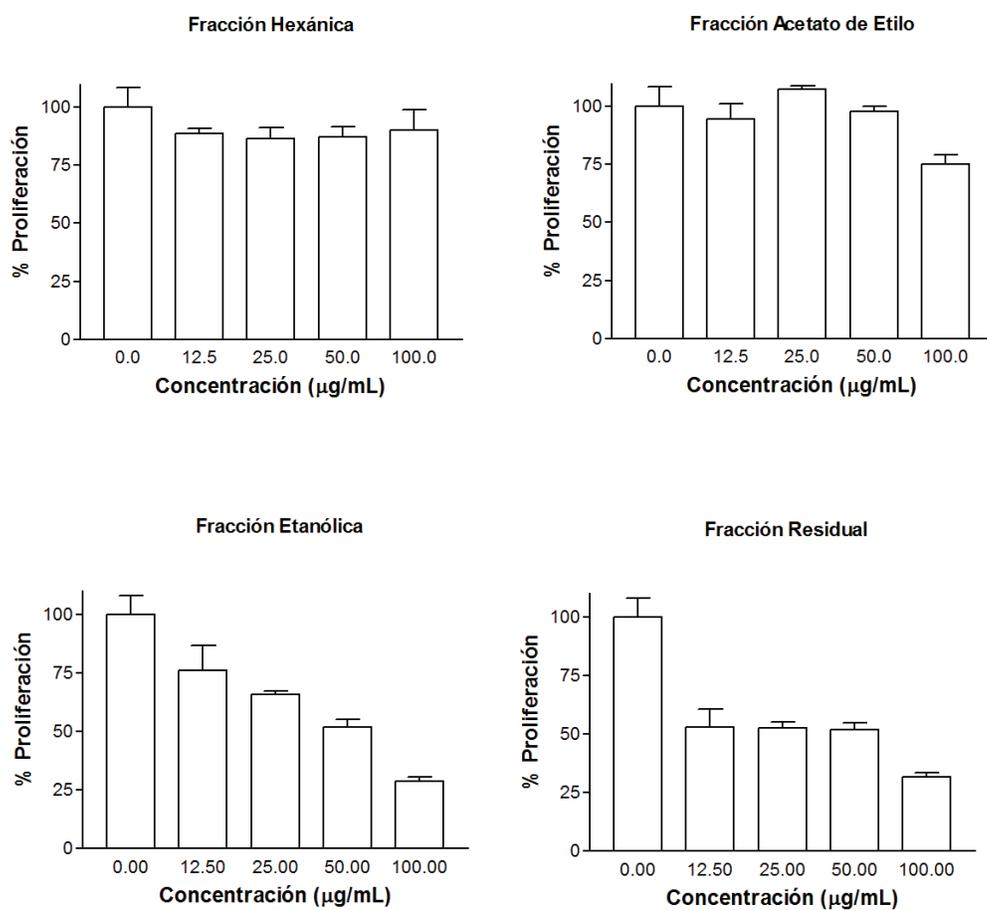
**Figura 6.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular cancerosa Raw 264.7.



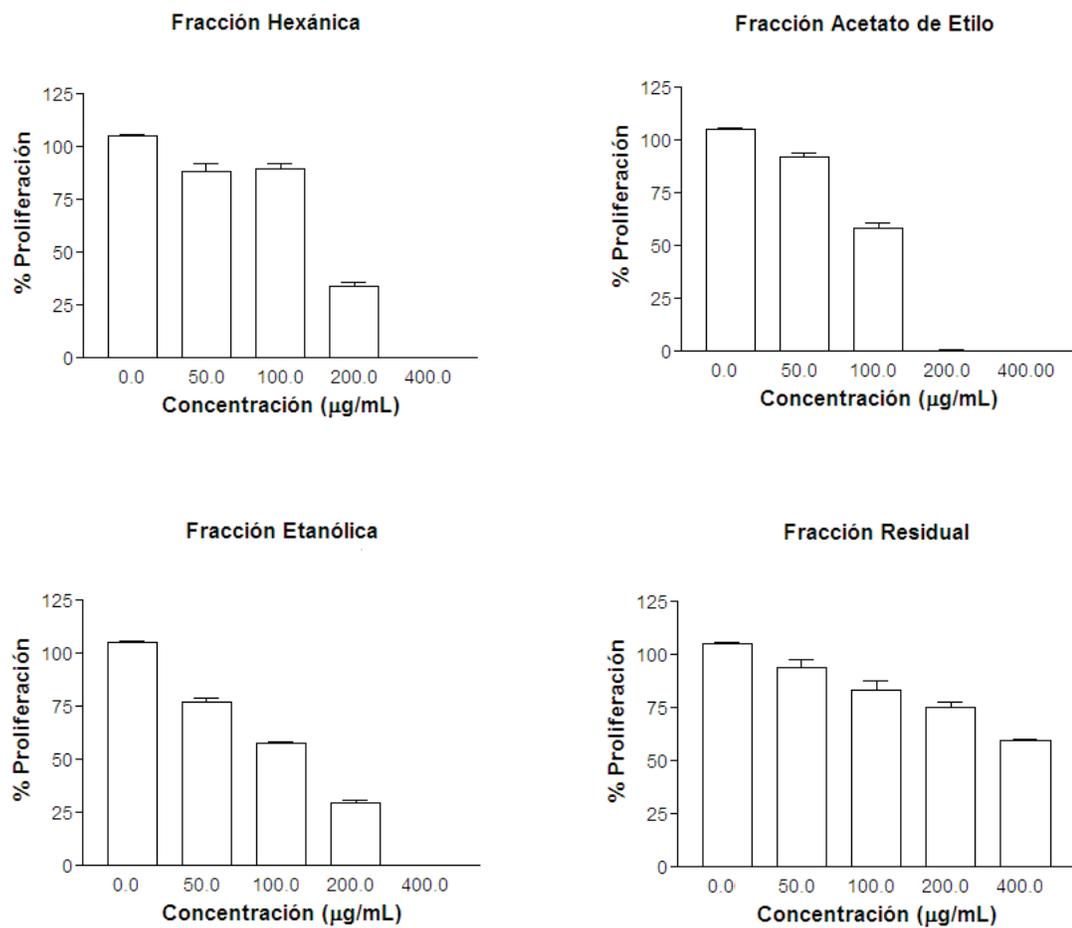
**Figura 7.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular cancerosa HeLa.



**Figura 8.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular cancerosa A-549.



**Figura 9.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular cancerosa LS-180.



**Figura 10.** Actividad antiproliferativa de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* frente a la línea celular normal L929.

obteniendo valores de  $IC_{50}$  para la fracción hexánica de  $200.2 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ , acetato de etilo de  $132.5 \pm 14.3 \mu\text{g/mL}$ , etanólica de  $169.6 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$  y para la residual de  $346.2 \pm 17.6 \mu\text{g/mL}$ . En la Tabla III se presenta un resumen de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones frente a las líneas celulares.

Al comparar estos resultados se puede destacar un estudio realizado por Uddin en 2001, en el cual se evaluó la actividad citotóxica de extractos metanólicos obtenidos de 16 plantas de la flora de Bangladesh, entre ellas *Argemone mexicana*, contra 3 líneas celulares cancerosas humanas (AGS de estómago, HT-29 de colon y MDA-MB-435S de mama) utilizando el ensayo de MTT. Ellos encontraron una baja actividad del extracto metanólico, resultando en un valor de  $IC_{50} > 2500 \mu\text{g/mL}$ , valor muy por encima de lo encontrado en el presente trabajo. Otro estudio relevante es el realizado por Kumar (2010), donde probó el extracto metanólico de *Argemone mexicana* contra distintas líneas celulares humanas cancerosas (A-549 de pulmón, Hep-2 de hígado, HT-29 de colon, IMR-32 de neuroblastoma), empleando el método de Sulforodamida B, el cual mide inhibición celular y es comparable con el método del MTT utilizado en este estudio. Empleó una concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$  del extracto metanólico y se reportaron valores de inhibición del 83% en la línea celular A-549, sin actividad para Hep-2, para HT-29 99% y para IMR-32 96%; en el caso del extracto metanólico se obtuvieron valores de inhibición a  $100 \mu\text{g/mL}$  entre 70 y 80%, valores muy relacionados con lo reportado.

**Tabla III.** Actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones frente a las líneas celulares.

Extracto / Fracción	IC <sub>50</sub> * (µg/mL)					
	M12.A <sup>k</sup> .C3F6	Raw 264.7	HeLa	A-549	LS-180	L929
<b>Metanólico</b>	18.8±5.8 <sup>D</sup>	18.2±2.6 <sup>D</sup>	132.6±13.3 <sup>C</sup>	78.8±3.0	>100	336.0±3.3 <sup>A</sup>
<b>Hexánica</b>	128.5±7.4 <sup>A</sup>	122.4±8.5 <sup>A</sup>	384.3±1.0 <sup>A</sup>	>100	>100	200.2±1.8 <sup>B</sup>
<b>Acetato de Etilo</b>	75.5±4.5 <sup>B</sup>	84.5±4.6 <sup>B</sup>	329.8±0.5 <sup>B</sup>	>100	>100	132.5±14.3 <sup>D</sup>
<b>Etanólica</b>	24.2±1.1 <sup>C</sup>	27.4±8.3 <sup>D</sup>	99.0±0.2 <sup>D</sup>	>100	63.6±8.3 <sup>A</sup>	169.6±4.3 <sup>C</sup>
<b>Residual</b>	29.5±3.4 <sup>C</sup>	32.3±6.0 <sup>C</sup>	158.0±28.0 <sup>C</sup>	>100	71.6±7.5 <sup>A</sup>	346.2±17.6 <sup>A</sup>

\* Valores promedio de tres repeticiones ± error estándar. Valores con letra distinta dentro de una misma columna son diferentes ( $P<0.05$ ).

## **Fraccionamiento y Purificación de Compuestos Activos**

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Extracto Metanólico y la Fracción Etanólica**

Se realizó un HPLC del extracto metanólico y de la fracción etanólica, la cual resultó ser la que tuvo mayor actividad antiproliferativa, esto para comparar la diferencia del número de compuestos presentes en su perfil químico (Figura 11). Los resultados sugieren que en la fracción etanólica se conservan la totalidad de las señales presentes en el extracto metanólico, variando sólo en proporción de los picos, algunos de ellos expresándose en menor grado (11.500, 21.717, 24.331, 26.048 minutos) y otros con mayor intensidad (22.772, 31.500, 36.976, 38.450 y 65.626 minutos).

Debido a las condiciones del HPLC, el cual es de fase reversa, se puede inferir que la mayoría de los picos que aparecieron antes de los 30 minutos de la cromatografía se pueden tratar de compuestos de naturaleza muy polar, debido a que el disolvente mayoritario es agua, mientras que el resto de las señales las cuales aparecen después de este tiempo son mayormente afines al metanol, indicando compuestos con un menor grado de polaridad en comparación.

### **Fraccionamiento por Cromatografía en Columna**

Se determinó que la fracción con mayor actividad antiproliferativa fue la fracción etanólica y ésta se fraccionó por columna.

Antes de llevar a cabo el fraccionamiento, se determinó la mezcla de disolventes que permitiría separar de una manera adecuada a la muestra. Para esto se utilizaron cromatofolios de sílica gel de 2.5 x 7 cm y como mezclas de disolventes hexano/acetato de etilo 75:25, 7:3, 6:4, 1:1, acetato de etilo, acetato de etilo/metanol 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, obteniendo que la mezcla acetato/metanol a cualquier proporción proporcionó la mejor separación de la muestra.



Del fraccionamiento por columna se obtuvieron 230 fracciones y se juntaron por semejanza en la cromatografía en capa fina, obteniendo finalmente 41 fracciones. El porcentaje de recuperación de la columna fue de 70%. En la Tabla IV se resumen los detalles de las fracciones colectadas durante la cromatografía.

### **Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Cromatográficas**

Se probó la actividad antiproliferativa de las 41 fracciones cromatográficas obtenidas del fraccionamiento en columna a una concentración de 50 µg/mL contra la línea celular cancerígena M12.A<sup>k</sup>.C3F6, resultando que sólo 2 de las 41 fracciones (JF33, JF34) alcanzaron valores de IC<sub>50</sub> < 50 µg/mL (Figura 12). Posteriormente, se evaluaron las 2 fracciones más activas contra la línea celular M12.A<sup>k</sup>.C3F6 en una gama de concentraciones de 100 a 0.781 µg/mL, observando una alta actividad con valores de IC<sub>50</sub> para JF33 de 3.4±0.6 µg/mL, mientras que para JF34 de 2.4±0.4 µg/mL (Figura 13 y 14).

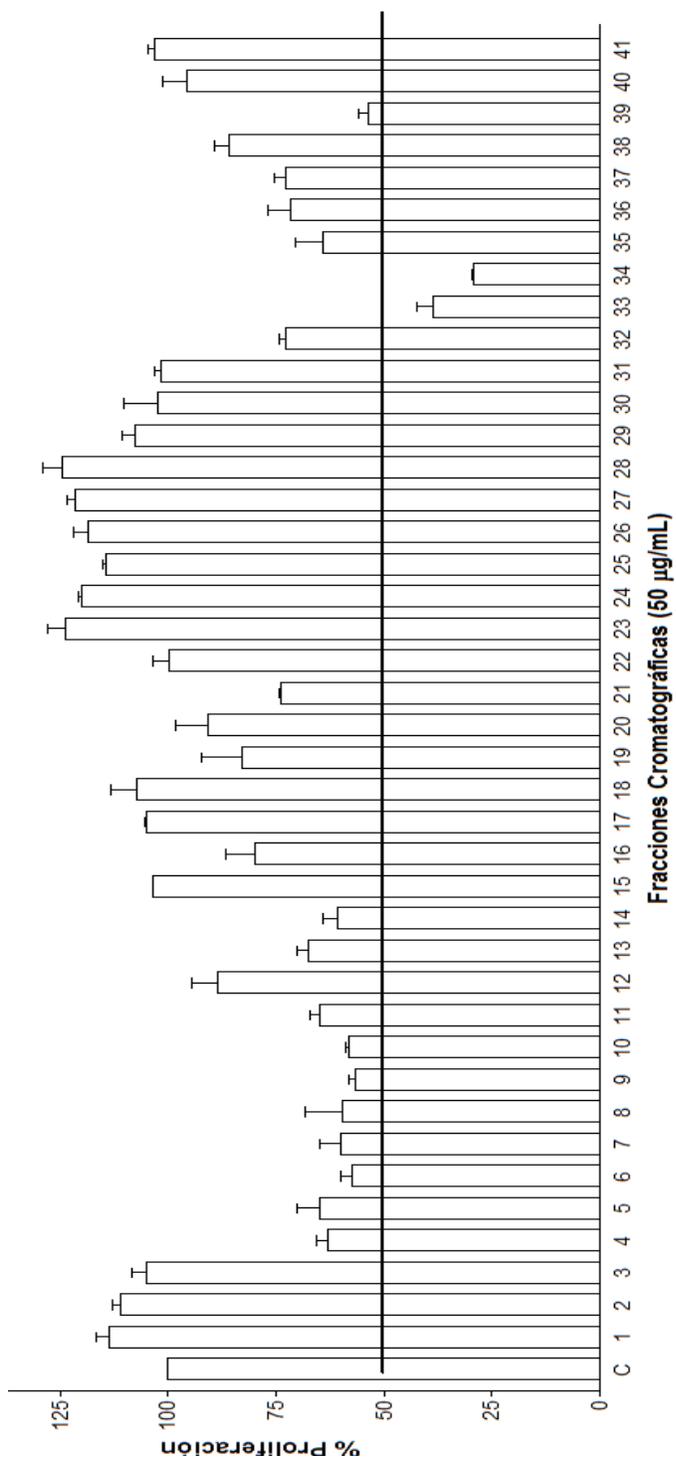
Después las 2 fracciones más activas fueron probadas contra las otras líneas celulares cancerosas. Para Raw 264.7, se observó una actividad alta, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> para JF33 de 5.4±0.1 µg/mL y para JF34 de 2.7±0.1 µg/mL. En el caso de la línea celular HeLa se observó una actividad media, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> para JF33 de 83.3±22.2 µg/mL y para JF34 de 79.5±11.5 µg/mL. Para la línea celular A-549 se observó una baja actividad para ambas fracciones, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> >100 µg/mL. En el caso de la línea celular LS-180 se obtuvieron para JF33 valores de IC<sub>50</sub> de 83.0±6.9 µg/mL y para JF34 de 44.5±0.1 µg/mL. Finalmente, contra la línea celular normal L929, un valor de IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL, indicándonos esto una especificidad

**Tabla IV.** Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca*.

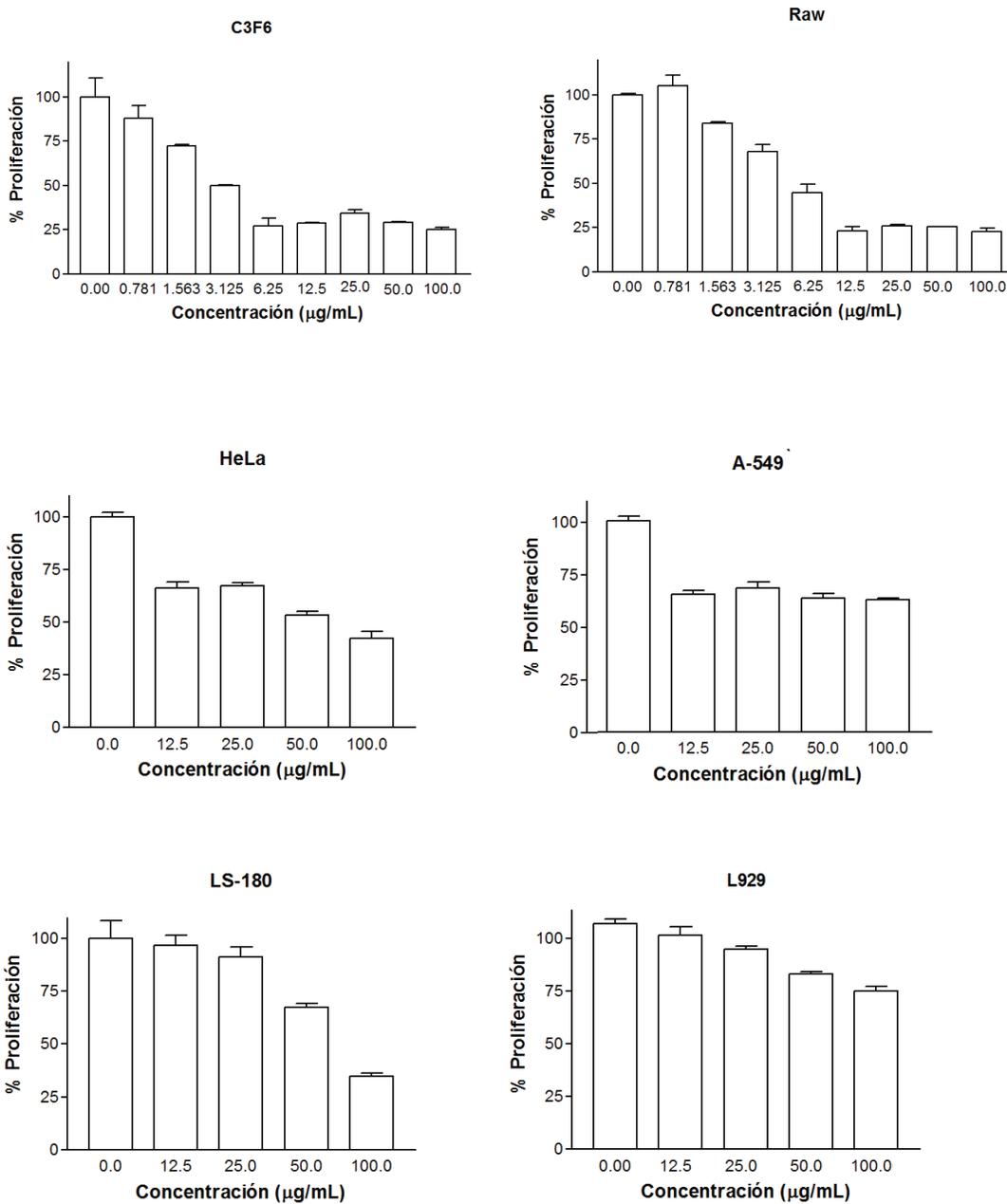
Fracción	Disolvente en columna	Peso (mg)	Rendimiento (%)
JF1 (1-2)	Hex	5.4	0.108
JF2 (3)	Hex/AcOEt 1:1	1.7	0.034
JF3 (4-5)	Hex/AcOEt 1:1	129.8	2.596
JF4 (6-7)	Hex/AcOEt 1:1	36.5	0.73
JF5 (8-13)	Hex/AcOEt 1:1	17.5	0.35
JF6 (14-17)	Hex/AcOEt 1:1	12.9	0.258
JF7 (18-19)	Hex/AcOEt 1:1	7.6	0.152
JF8 (20-25)	Hex/AcOEt 1:1	14.7	0.294
JF9 (26-27)	Hex/AcOEt 1:1	3.8	0.076
JF10 (28-31)	Hex/AcOEt 1:1	9.6	0.192
JF11 (32-36)	Hex/AcOEt 3:7	59.4	1.188
JF12 (37,39,40, 41)	Hex/AcOEt 3:7	25.2	0.504
JF13 (38)	Hex/AcOEt 3:7	7.4	0.148
JF14 (42)	Hex/AcOEt 3:7	10.7	0.214
JF15 (43-45)	AcOEt	29.4	0.588
JF16 (46-56)	AcOEt	62.2	1.244
JF17 (57-62)	AcOEt	33	0.66
JF18 (63-66)	AcOEt/MeOH 95:5	61.9	1.238
JF19 (67)	AcOEt/MeOH 95:5	16.7	0.334
JF20 (68-71)	AcOEt/MeOH 95:5	30.6	0.612
JF21 (72)	AcOEt/MeOH 95:5	6.4	0.128
JF22 (73)	AcOEt/MeOH 95:5	12.7	0.254
JF23 (74-76)	AcOEt/MeOH 95:5	9.7	0.194
JF24 (77-80)	AcOEt/MeOH 95:5	13.8	0.276
JF25 (81-88)	AcOEt/MeOH 95:5	30.9	0.618

**Tabla IV.** Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca* (Continuación).

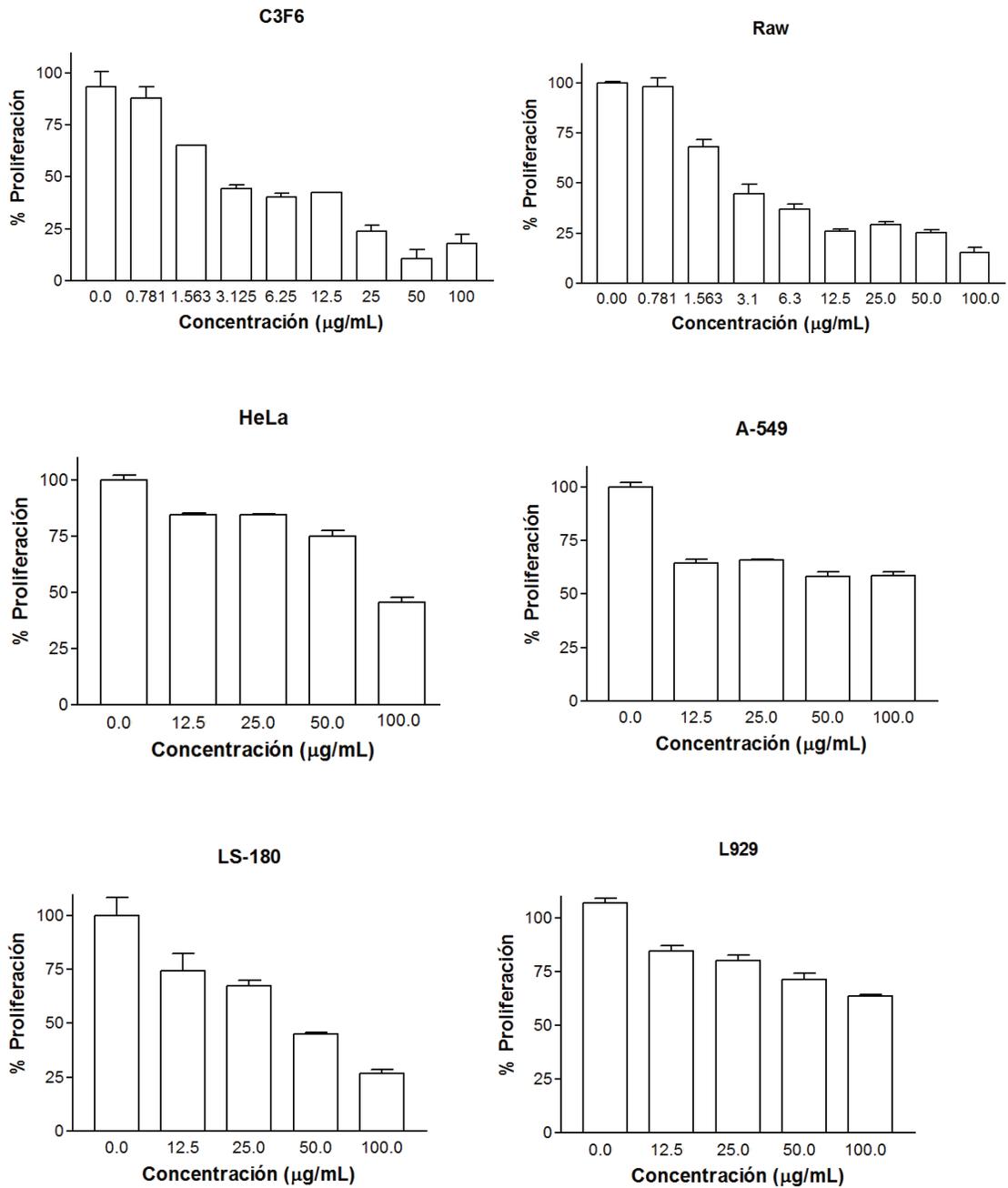
JF26 (89-97)	AcOEt/MeOH 95:5	22	0.44
JF27 (98-105)	AcOEt/MeOH 9:1	300.8	6.016
JF28 (106-113)	AcOEt/MeOH 9:1	121.7	2.434
JF29 (114-121)	AcOEt/MeOH 9:1	84.4	1.688
JF30 (122-125)	AcOEt/MeOH 9:1	26.9	0.538
JF31 (126)	AcOEt/MeOH 7:3	34.5	0.69
JF32 (127)	AcOEt/MeOH 7:3	140.5	2.81
JF33 (128-129)	AcOEt/MeOH 7:3	310.5	6.21
JF34 (130-137)	AcOEt/MeOH 7:3	262.2	5.244
JF35 (138-153)	AcOEt/MeOH 7:3	133.9	2.678
JF36 (154-162)	AcOEt/MeOH 1:1	284.7	5.694
JF37 (163-185)	163-176 AcOEt/MeOH 1:1 177-185 MeOH	187.5	3.75
JF38 (186-201)	MeOH	103.2	2.064
JF39 (202-210)	MeOH/H <sub>2</sub> O 9:1	100.4	2.008
JF40 (211-221)	MeOH/H <sub>2</sub> O 9:1	87.6	1.752
JF41 (222-230)	MeOH/H <sub>2</sub> O 7:3	2.0	0.04



**Figura 12.** Actividad antiproliferativa de las 41 fracciones cromatográficas obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca* frente a la línea cancerosa M12.A<sup>k</sup>.C3F6.



**Figura 13.** Actividad antiproliferativa de la fracción cromatográfica JF33 frente a las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6, Raw 264.7, HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.



**Figura 14.** Actividad antiproliferativa de la fracción cromatográfica JF34 frente a las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6, Raw 264.7. HeLa, A-549, LS-180 y la línea celular normal L929.

de los extractos contra las líneas celulares cancerosas en comparación con nuestro control de célula normal (Figura 13, 14).

Como se puede observar en los resultados anteriormente mostrados, las concentraciones probadas así como el grado de actividad de las fracciones cromatográficas es mayor que el extracto metanólico y las fracciones obtenidas del mismo. Esto indica que el fraccionamiento cromatográfico incrementa el grado de actividad biológica.

Además de probar la actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas, se evaluó de manera adicional la actividad antiproliferativa de una serie de drogas conocidas por su actividad anticancerígena y antitumoral, esto para comparar el grado de actividad de las fracciones con respecto a compuestos ya usados en la actualidad. Las drogas utilizadas fueron doxorubicina, 5-fluoracilo y colchicina.

Doxorrubicina es un antibiótico quimioterapéutico perteneciente a la familia de las antraciclinas, cuyo mecanismo de acción es complejo y se piensa que actúa mediante intercalación en el ADN. Se sabe que al intercalarse inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos, pues dificulta el avance de la enzima topoisomerasa II, deteniendo así el proceso de replicación del ADN. En el caso de doxorubicina se obtuvieron los siguientes valores de  $IC_{50}$  para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $0.6 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  ( $0.5 - 1 \mu\text{M}$ ), Raw 264.7 de  $0.8 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$  ( $0.125 - 0.25 \mu\text{M}$ ), HeLa de  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  ( $1.25 - 2.5 \mu\text{M}$ ), para A-549 de  $1.9 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$  ( $2 - 4 \mu\text{M}$ ) y LS-180 de  $2.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  ( $2 - 4 \mu\text{M}$ ) y finalmente para la línea celular normal L929 se encontró un valor  $>60 \mu\text{g/mL}$  ( $>100 \mu\text{M}$ ).

5-Fluoracil es un análogo de pirimidina perteneciente a una familia de medicamentos conocidos como antimetabolitos y es empleado como un potente agente antitumoral, debido a que interviene en la síntesis de ADN e inhibe en cierto grado la formación de ARN, uniéndose de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. Para 5-

Fluoracil se obtuvieron los siguientes valores de  $IC_{50}$  para las líneas celulares cancerosas, para M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $1.9 \pm 0.6$  (1.25 - 2.5  $\mu$ M), Raw 264.7 de  $0.6 \pm 0.1$  (0.5 - 1  $\mu$ M), para HeLa, A-549, LS-180 y para la línea celular normal L929 se obtuvo un valor  $>130.08 \mu$ g/mL ( $>100 \mu$ M).

Colchicina es un alcaloide aislado de varias especies del género *Colchicum* y se utiliza como fármaco antimitótico que detiene o inhibe la división celular en metafase o en anafase, previniendo la proliferación celular. Para esta droga, en la mayoría de las líneas celulares, se reportan rangos de valores debido a que todos los experimentos muestran una inhibición similar a las diferentes concentraciones evaluadas, es decir, su comportamiento no fue dosis dependiente, de tal forma que no se puede calcular la  $IC_{50}$ . Se obtuvieron los siguientes valores de  $IC_{50}$  para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 se obtuvo un valor  $>39.94 \mu$ g/mL ( $>100 \mu$ M), Raw 264.7 de  $0.06 \pm 0.02 \mu$ g/mL (0.05 - 1  $\mu$ M), para HeLa un valor  $>39.94 \mu$ g/mL ( $>100 \mu$ M), para A-549 un valor de  $0.9 \pm 0.3$  (0.1 - 12.5  $\mu$ M), y para LS-180 se obtuvo un valor de  $3.6 \pm 0.4 \mu$ g/mL (0.1 - 12.5  $\mu$ M), y finalmente para la línea celular normal L929 se obtuvo un rango  $>39.94 \mu$ g/mL ( $>100 \mu$ M).

En la Tabla V se resumen los resultados de la actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas activas y de las drogas de referencia. Al analizar y comparar los resultados obtenidos, se pudo observar que los valores de  $IC_{50}$  resultantes de las drogas tanto para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 y Raw 264.7 y la línea celular normal L929, se encuentran en rangos de concentraciones cercanos a los de las fracciones cromatográficas. Es de gran importancia resaltar este hecho, debido a que los compuestos utilizados como drogas de referencia están plenamente caracterizados, por lo tanto su actividad es mayor a concentraciones muy bajas, mientras que en las fracciones cromatográficas pueden encontrarse presente más de un compuesto.

**Tabla V.** Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas activas y de las drogas de referencia frente a las líneas celulares.

Fracción Droga	IC <sub>50</sub> * (µg/mL)				
	M12.A <sup>k</sup> .C3F6	Raw264.7	HeLa	A-549	L929
<b>JF33</b>	3.4±0.6 <sup>A</sup>	5.4±0.1 <sup>A</sup>	83.3±22.2 <sup>A</sup>	>100**	83.0±6.9 <sup>A</sup>
<b>JF34</b>	2.4±0.4 <sup>B</sup>	2.7±0.1 <sup>B</sup>	79.5±11.5 <sup>A</sup>	>100**	44.5±0.1 <sup>B</sup>
<b>Doxorrubicina</b>	0.6 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.8±0.2 <sup>C</sup>	2.3±0.3 <sup>B</sup>	1.9±0.7 <sup>A</sup>	2.5±0.3 <sup>C</sup>
<b>5-Fluoracil</b>	1.9 ± 0.6 <sup>B</sup>	0.6±0.1 <sup>C</sup>	>130.08**	>130.08**	>130.08**
<b>Colchicina</b>	>39.94**	0.06±0.02 <sup>D</sup>	>39.94**	0.9±0.3 <sup>B</sup>	3.6±0.4 <sup>C</sup>

\* Valores promedio de tres repeticiones ± error estándar. Valores con letra distinta dentro de una misma columna son diferentes ( $P<0.05$ ).

\*\* Concentración máxima probada a la cual no se alcanzaron valores de IC<sub>50</sub>

También se observó que el grado de actividad de las drogas fue distinto para las líneas celulares cancerosas humanas HeLa, A-549 y LS-180, observando una menor actividad antiproliferativa por parte de las fracciones cromatográficas en comparación con las otras dos líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 y Raw 264.7. Esto puede deberse al grado de sensibilidad de la línea celular, determinado a si es de origen humano o murino, o también el tipo de cáncer del que se derivó, afectando de esta manera el grado de actividad de las fracciones.

Finalmente se pudo resaltar que se mantuvo un grado distinto de actividad para la línea celular normal L929, siendo menos afectada por las drogas de referencia, indicándonos esto también una cierta especificidad contra las líneas celulares cancerosas en comparación con nuestro control de célula normal.

En un estudio realizado por Chwen en 2003, se evaluó el efecto citotóxico de 11 alcaloides del tipo benzofenantridina y bencilisoquinolina aislados de *Argemone mexicana*, a una concentración de 150  $\mu$ M contra 2 líneas celulares cancerosas (Hone-1 de carcinoma nasofaríngeo y NUGC de cáncer estomacal) por el método de MTT, obteniendo valores de inhibición del 90 al 100%. Otro estudio es el de Ulrichová en 2001, en donde evaluó 3 alcaloides cuaternarios del tipo benzofenantridina aislados del extracto metanólico de *Macleaya cordata*, por el método del MTT a un rango de concentraciones de 0.1 a 100  $\mu$ M contra hepatocitos humanos y porcinos, encontrando valores de IC<sub>50</sub> entre 25 y 50  $\mu$ M.

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de la Fracción Cromatográfica Activa JF34**

Después de la evaluación de la actividad antiproliferativa de las 2 fracciones cromatográficas activas, se determinó que la fracción JF34 tuvo mejores resultados, por lo que se le realizó un HPLC para determinar su perfil químico. En la Figura 15 podemos observar la comparación entre el extracto metanólico, la fracción etanólica y la fracción cromatográfica JF34. Se debe hacer notar que la mayoría de las señales han desaparecido, y las pocas señales conservadas están aumentadas en gran proporción en la fracción JF34 (27.139, 31.500, 38.450, 49.900, 60.733 y 62.101 minutos). Esto nos sugiere que la variación en presencia y proporción de las señales podrían tratarse de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de la fracción cromatográfica JF34.

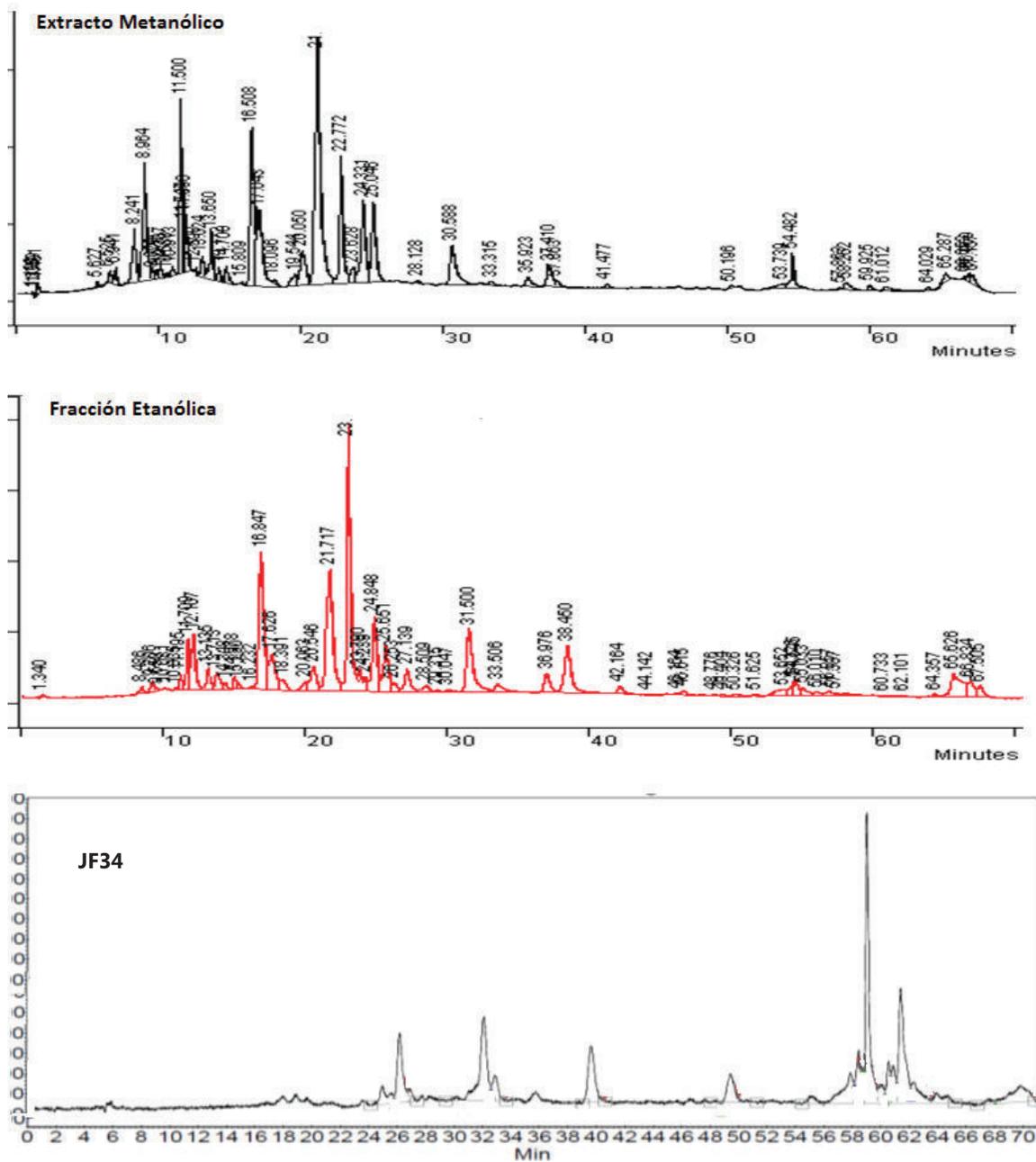
### **Caracterización Química de Compuestos Activos**

#### **Análisis de Infrarrojo (IR)**

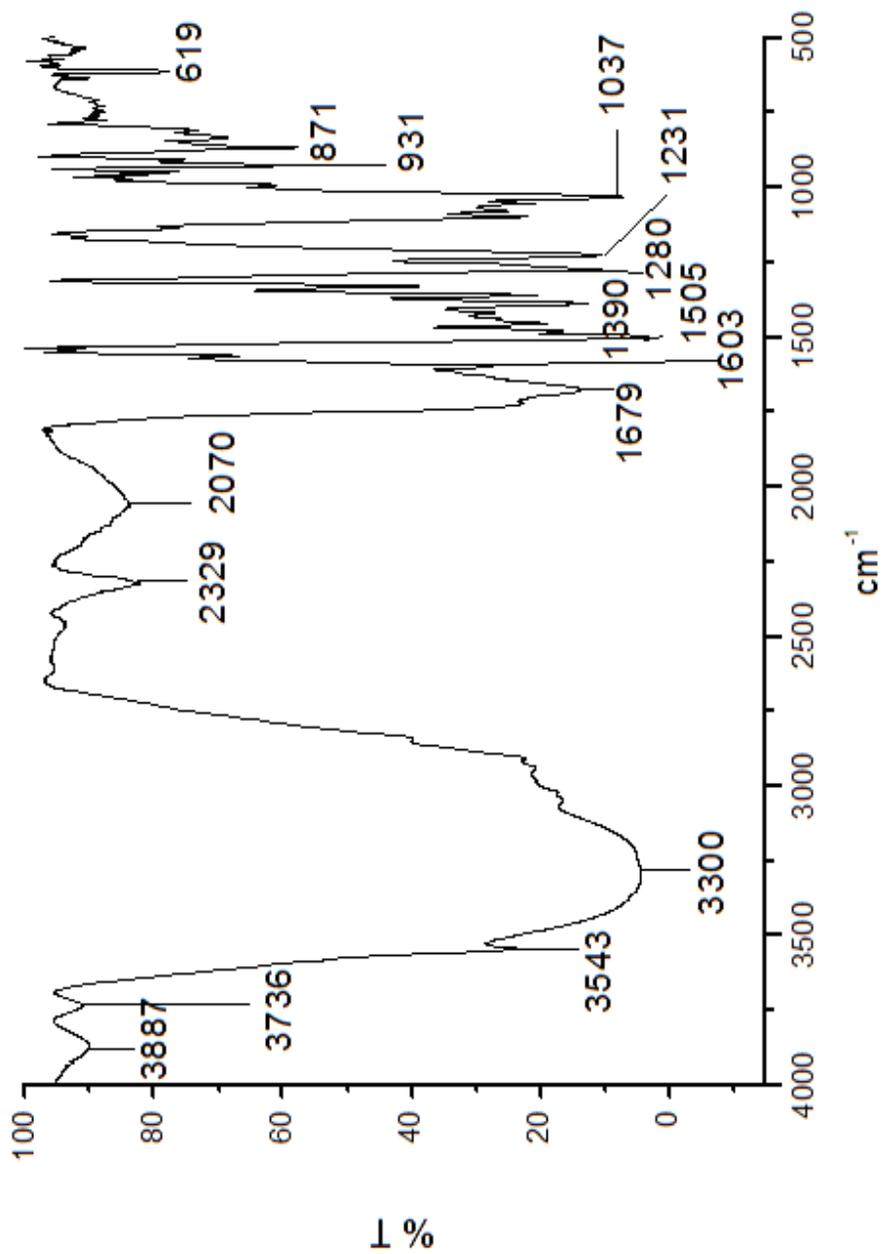
La absorción de las moléculas orgánicas presentes en la fracción JF34 (Figura 16) presentó bandas en la región 900 – 600  $\text{cm}^{-1}$  y en la región 2070  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los sobre tonos característicos de anillos aromáticos.

Los estiramientos a 1037  $\text{cm}^{-1}$  son ocasionados por enlaces C-O y la absorción a 1231, 1280 y 1390  $\text{cm}^{-1}$  se pueden asignar a estiramiento C-N de compuestos aromáticos aminados. Las señales a 1603 y 1679  $\text{cm}^{-1}$  pueden corresponder a enlaces C=C, C=O y C=N. La banda observada a 2329  $\text{cm}^{-1}$  puede asignarse a triple enlaces carbono - carbono y carbono - nitrógeno. La banda a 3300  $\text{cm}^{-1}$  se debe a estiramientos O-H (Silverstein, 2007).

La bibliografía menciona que el ion amonio muestra una fuerte banda de flexión a los 1429  $\text{cm}^{-1}$ . El grupo  $\text{NH}_3^+$  de la sal de una amina primaria absorbe



**Figura 15.** Comparación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fracción cromatográfica JF34 con extracto metanólico y fracción etanólica.



**Figura 16.** Espectro de infrarrojo de la fracción cromatográfica 34 (JF34) extraída de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca*.

cerca de 1600-1575 y 1550-1504  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas son originadas por flexiones asimétricas y simétricas del  $\text{NH}_3^+$ , las cuales se presentan como una banda débil de flexión asimétrica del  $\text{NH}_3^+$  a 1660-1610  $\text{cm}^{-1}$  y una fuerte banda de flexión simétrica cerca de 1550-1480  $\text{cm}^{-1}$ , además se ha reportado que una banda de absorción 1665  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos amina carbonilo (Chwen, 2003).

Lo anterior concuerda con las bandas del espectro para la fracción 34 donde se tienen bandas a 1505 y 1670  $\text{cm}^{-1}$ , por lo cual el ion amonio podría estar presente en la fracción.

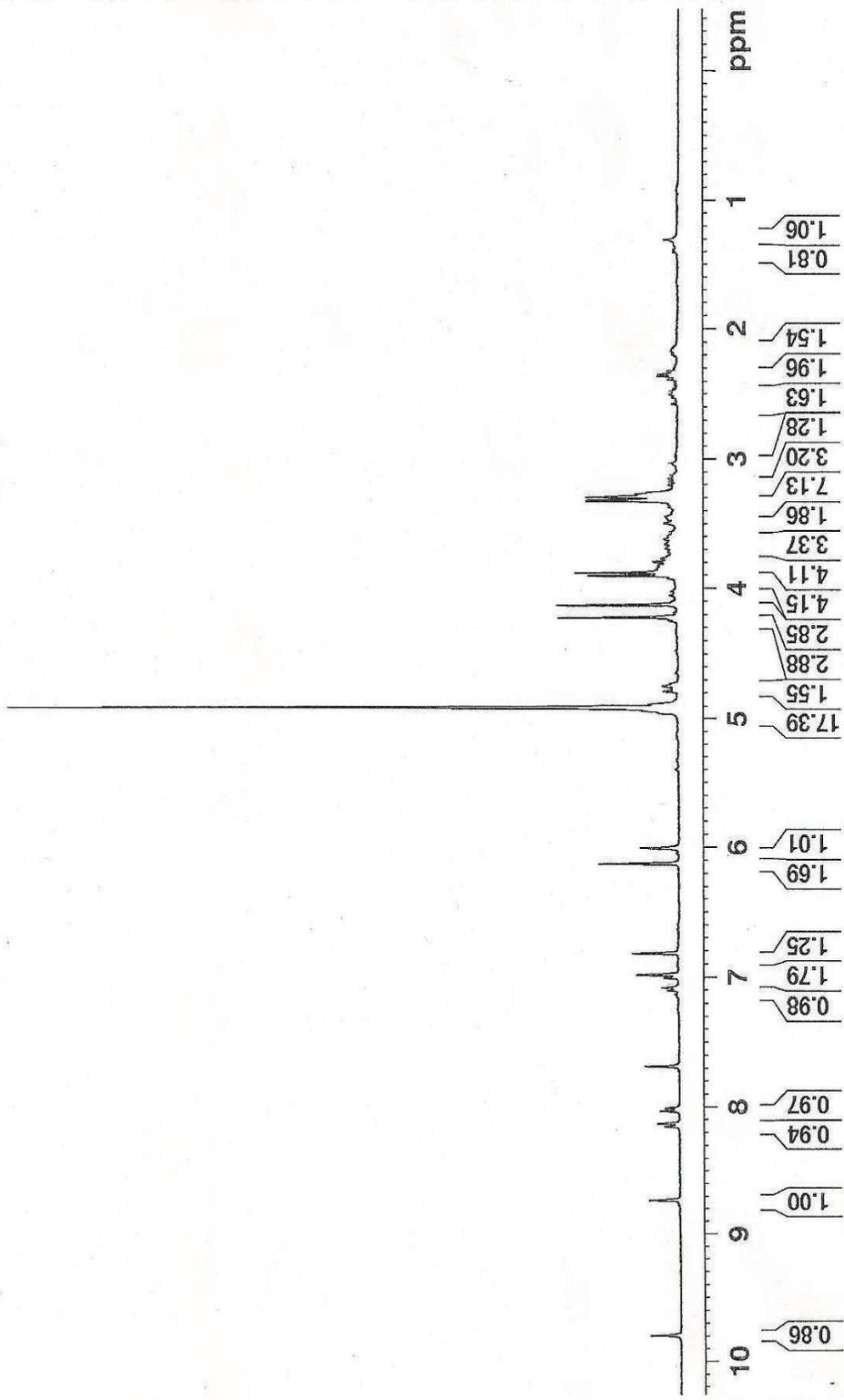
### **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los resultados de RMN de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) de la fracción 34 (Figura 17) muestran la presencia de dos singuletes de campo bajo en las regiones cercanas de 9.0 y 8.0 ppm (partes por millón. En la bibliografía se indica que las señales en la región de 8.0 ppm son características de sales de amonio (Buitimea, 2010).

También se observan señales sencillas y dobles en la región de 7.0 ppm y una señal a 6.0 ppm), indicando la presencia de estructuras aromáticas. Las señales observadas a 6.0 ppm se asignan a desplazamientos químicos de estructuras de anillos aromáticos fusionados y esta reportado que corresponden a desplazamientos químicos de protones en anillos heterocíclicos tipo metilendioxi ( $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ) (Silverstein, 2007).

En la región 3.0 y 5.0 ppm se identificaron señales que pueden pertenecer a enlaces tipo alqueno ( $\text{C=C}$ ), éteres ( $\text{RO-CH}$ ), C-O y C-N (Buitimea, 2010). También se hace referencia a estas señales en la bibliografía a que corresponden a protones de grupos metileno (Al-Hayyan, 2006).

Los desplazamientos químicos observados a 2.0 ppm se identificaron como señales que pueden pertenecer protones en enlaces del tipo  $\text{R-COCH}$  y alcanos saturados ( $\text{R-H}$ ) y arilos ( $\text{Ar-CH}$ ).



**Figura 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción cromatográfica 34 (JF34) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , extraída de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca*.

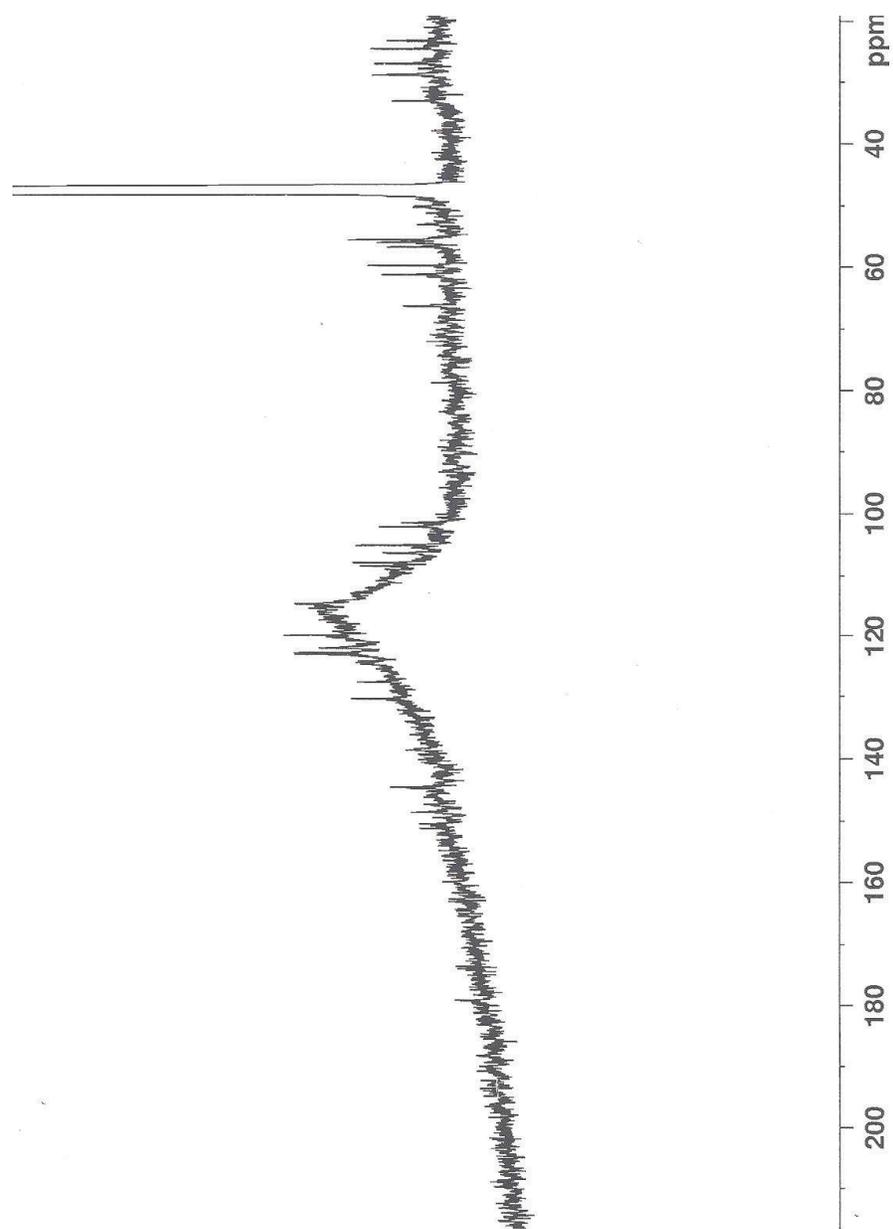
Según las referencias consultadas acerca de las señales obtenidas para la fracción 34 son característicos de alcaloides cuaternarios del tipo de la protoberberina (Shama, 1972).

Los resultados de IR y RMN  $^1\text{H}$  sugieren que el o los posibles compuestos identificados en la fracción JF34 contienen grupos amonio, uniones del tipo  $\text{OCH}_2\text{O}$  y grupos aromáticos. De acuerdo a la bibliografía los tipos de metabolitos que poseen este tipo de grupos químicos son los alcaloides, los cuales se encuentran en los vegetales como sales de ácidos orgánicos (Domínguez, 1979).

Los alcaloides de isoquinolínicos se caracterizan estructuralmente por tener en común un esqueleto de isoquinolina, frecuentemente tetrahydroisoquinolina. Modificaciones posteriores en su estructura, tales como 9 anillos y sustituyentes, conducen a una amplia variedad estructural (Díaz, 2003).

También se llevó a cabo una RMN de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) de la fracción 34 (Figura 18) en la cual se obtuvieron señales con poca claridad, esto debido a que la concentración de la muestra no fue la adecuada para realizar este análisis, ya que se encontraba muy diluida. Sin embargo se pudieron detectar una serie de señales en campo bajo entre 160 y 140 ppm, señales que según lo reportado pueden pertenecer a estructuras aromáticas y enlaces  $\text{C}=\text{C}$ , así como también una serie de señales en campo alto, entre 70 y 40 ppm, que pudieran adjudicarse a estructuras con enlaces  $\text{C}-\text{O}$ ,  $\text{C}-\text{N}$ ,  $\text{C}-\text{Ar}$ , las cuales estuvieron en concordancia con los resultados encontrados en IR y RMN  $^1\text{H}$ .

En un estudio realizado en Arabia Saudita sobre *Argemone ochroleuca* se caracterizaron 8 alcaloides de bencilisoquinolina (Al-Hayyan, 2006). Entre estos se identificaron alcaloides de benzofenantridina que presentan propiedades físicas, químicas y características estructurales con la fracción 34, estos son: sanguinarina, reportado como cristales blancos, solubles en cloroformo y metanol, exhibiendo una fluorescencia color naranja en solución;



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la fracción cromatográfica 34 (JF34) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , extraída de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca*.

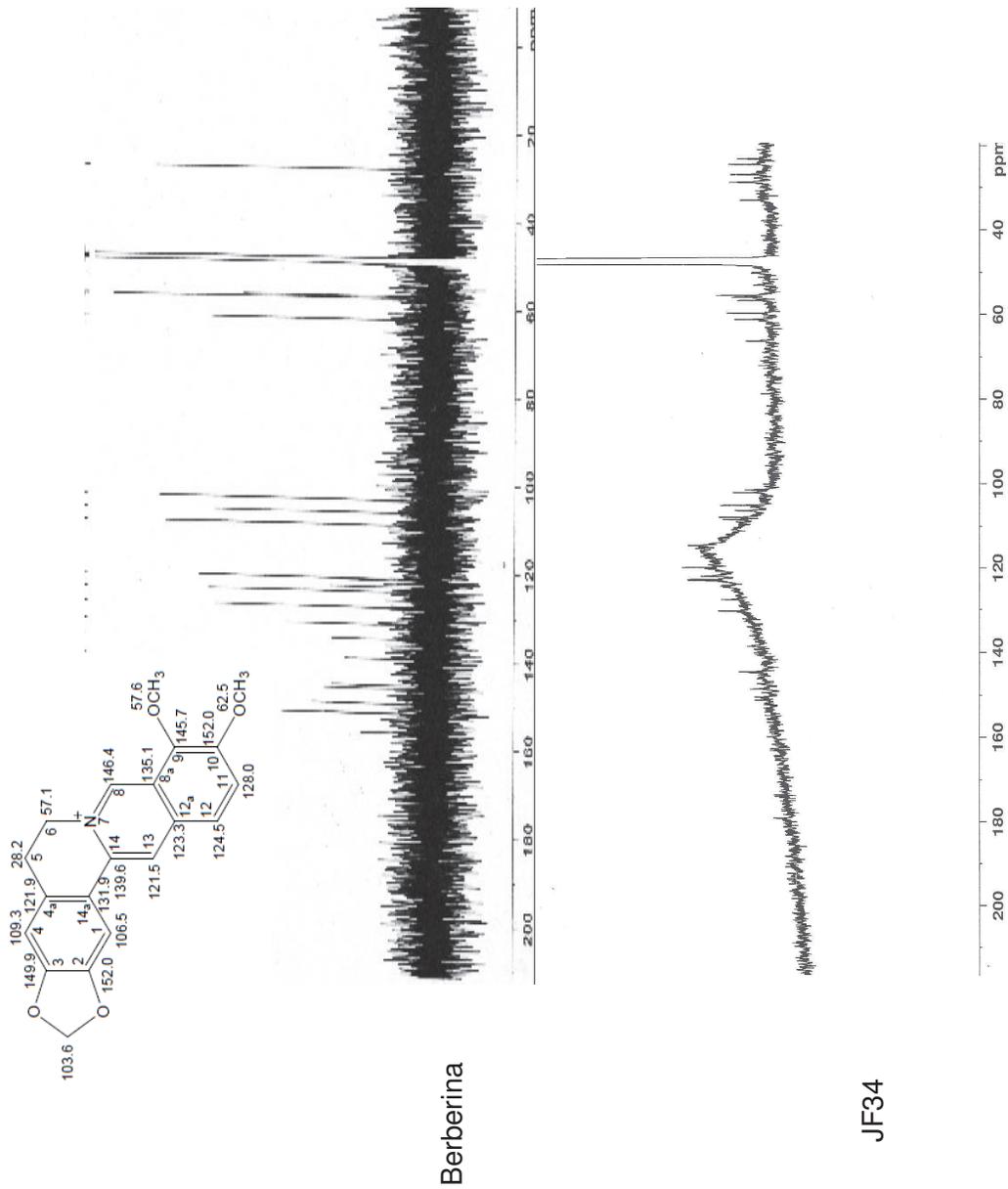
queleritrina, reportado como cristales rosas, solubles en cloroformo y metanol, exhibiendo una fluorescencia amarilla bajo luz U.V.; y (-)8 acetonildihidroqueleritrina, reportado como cristales amarillos, solubles en cloroformo y metanol, exhibiendo una fluorescencia amarilla bajo luz U.V.; además de un alcaloide cuaternario protoberberínico, la berberina, reportado como cristales amarillos, solubles en cloroformo y metanol, con una fluorescencia amarilla en U.V.

Dentro de las propiedades que posee la fracción JF34 podemos destacar que se presentó en forma de cristales amarillos, soluble en metanol, de un color amarillo fluorescente en solución, además de que presenta una fluorescencia amarilla en U.V.

De acuerdo a la información reportada en la bibliografía y considerando las características de la fracción JF34, se pueden relacionar a los compuestos presentes en la muestra con estructuras químicas del tipo de la berberina. Haciendo una comparación con los espectros de RMN  $^1\text{H}$  reportados para este alcaloide, se vio una alta similitud (Figura 19). En la Figura 20 se puede observar que la mayoría de las señales registradas en el espectro reportado para berberina están en el espectro que se obtuvo de la fracción 34. También al comparar el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  reportado para berberina con el obtenido para JF34 se pudo observar de que la mayoría de las señales estuvieron presentes y se encontraron en la misma región que las reportadas, lo cual se puede observar en la Figura 21 y 22.

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la fracción JF34 se puede observar que aparecen otras señales adicionales, aparte de las asignadas para berberina, lo que nos puede indicar la presencia de otros compuestos presentes en la muestra y que no fueron identificados. Se reporta en la bibliografía de que los alcaloides se encuentran en forma de sales de ácidos orgánicos, es decir, el alcaloide unido a un contraion, en un enlace anión-catión. En general, se encuentran en





Berberina

JF34

**Figura 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del alcaloide Berberina (Al-Hayyan, 2006) y de la fracción cromatográfica 34 (JF34) extraída de la fracción etanólica de *Argemone ochroleuca*. Las muestras se encuentran disueltas en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

las plantas formando sales con el ácido acético, oxálico, láctico, málico, tartárico y cítrico.

### **Propiedades Bioactivas del Alcaloide Berberina**

Numerosas propiedades farmacológicas se han adjudicado a berberina algunas de las reportadas han sido antibacterianas, anti-inflamatorias, antimaláricas y antileishmaniasis (Szeto, 2002), así como la potenciador de la diferenciación de las células normales inducida por el factor de crecimiento nervioso (Shigeta, 2002). También esta reportado que inhibe la secreción intestinal de iones, la contracción del músculo liso y taquiarritmias ventriculares, que antagoniza el efecto del cólera y de las enterotoxinas termoestables de *Escherichia coli*. Otras propiedades de la berberina incluyen la elevación del número de plaquetas en pacientes con trombocitopenia primaria y secundaria, la estimulación de la secreción de bilis y bilirrubina. Además, la berberina inhibe la transcriptasa reversa del VIH-1 (Al-Hayyan, 2006)

El uso clínico más común de berberina incluye el tratamiento de la diarrea bacteriana, parásitos intestinales e infecciones oculares causadas por *Chlamydia trachomatis*. Algunos estudios también sugieren que la administración parenteral puede desempeñar un papel en la prevención de la aparición de taquiarritmias ventriculares y muerte coronaria súbita después de una lesión de isquemia miocárdica (Birdsall, 1997; Szeto, 2002). Esta reportado también el mecanismo de acción relajante de berberina de en anillos de tráquea aislada de cobayo (Sánchez, 2007).

Se han evaluado en diversos estudios los efectos de la berberina varias líneas celulares cancerosas humanas, tales como tumores cerebrales malignos, cáncer esofágico, nasofaríngeo y colorrectal, sin embargo no se ha esclarecido de manera contundente un mecanismo acerca de cómo ejerce su actividad (Vennerstrom y col., 1988, 1990; Zhang, 1990; Okunade y col., 1994; Kuo y col., 1995; Fukuda y col., 1999; Anonymous, 2000; Hu y col., 2000; Iizuka y col.,

2000). También se investigó que las berberinas, 13-alkil-sustituidas demostraron tener una mejor actividad que la berberina en contra de ciertas especies de bacterias y líneas celulares humanas de cáncer. El estudio demostró que los alcaloides de berberina 13-metil y 13-etil sustituidos inhiben el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y Cox-II y que pueden ser útiles como compuestos inmunoterapéuticos para la inducción de la interleucina-12, que es potencialmente aplicable a los tumores, las enfermedades infecciosas y la inflamación de aire manera (Lee, 2003).

## CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* y sus fracciones poseen actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares cancerosas.
- La fracción etanólica posee la más alta actividad antiproliferativa, obteniendo valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $24.2\pm 1.1$ , Raw 264.7 de  $27.4\pm 8.3$ , HeLa de  $99.0\pm 0.2$ , para A-549 un valor  $>100$ , LS-180 de  $63.6\pm 8.3$  y para la línea celular normal L929 de  $169.6\pm 4.3$ .
- Se observó que el extracto metanólico y sus fracciones poseen baja actividad antiproliferativa frente a la línea celular control normal L929, obteniendo valores de  $IC_{50}$  entre  $132.5\pm 14.3$  y  $346.2\pm 17.6$   $\mu\text{g/mL}$ .
- Se observó una alta actividad antiproliferativa en 2 de las 41 subfracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción etanólica (JF33 y JF34).
- Se determinó que la fracción cromatográfica JF34 fue la más activa, resultando en valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para las líneas celulares cancerosas M12.A<sup>k</sup>.C3F6 de  $2.4\pm 0.4$ , Raw 264.7 de  $2.7\pm 0.1$ , HeLa de  $79.5\pm 11.5$ , A-549 un valor  $>100$ , LS-180 de  $44.5\pm 0.1$  y para la línea celular normal L929 un valor  $>100$ .
- Los resultados de IR y RMN indican que el compuesto mayoritario en la fracción cromatográfica JF34 que es responsable de la actividad antiproliferativa, es el alcaloide de isoquinolina llamado berberina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hayan, A.M. 2006. Study of alkaloids of *Argemone ochroleuca* growing in Saudi Arabia. Tesis de Maestría. Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia. Universidad Rey Saud.
- Alonso Osorio, M. J. 2002. Mesa redonda: El Medicamento en la Oficina de la Farmacia, Plantas Medicinales. XIII Congreso Nacional Farmaceutico. Granada, España. Anonymous. Berberine. *Alt Med Rev* 5. 175-177, 2000.
- Argueta, A., Cano, L. 1994 Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I. Instituto Nacional Indigenista. pp. 399-404.
- Arroyo, J., Prashad, M., Vásquez, Y., Li, E., Tomás, G. 2005. Actividad Citotóxica *in vitro* de las Fracciones de la Mezcla de *Annona muricata* más *Krameria lappacea* sobre Células Cancerosas de Glándula Mamaria, Pulmón y del Sistema Nervioso Central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Vol. 22, No. 4. pp. 247 - 253.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009
- Avelino Flores, M. C. 2005. "Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de Extractos de Cinco Plantas Medicinales de la Región de Cuetzalan, Puebla, Sobre una Línea Celular de Cáncer Cervicouterino". Tesis. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Baker, J.T., Borris, R.P., Carte, B., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Cragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M., Madulid, D.R., Tyler, V.E. 1995. Natural product drug discovery and development: New perspective on international collaboration. *J. Nat. Prod.* 58: 1325-1357.
- Bhardwaj, D.K., Bisht, M.S., Jain, R.K., Munjal, A. 1982. Phenolics from the seeds of *Argemone mexicana*. *Phytochemistry*. 21: 2154-2156. Birdsall, T. C. and Kelly, G. S. Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alt. Med. Rev.*, 1997, 2, 94-103

- Bourdy, G., Oporto, P., Gimenez, A., Deharo, E. 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J. Ethnopharmacol.* 93:269-277.
- Buitimea, G. 2010. Estudio de la Composición Química de un Extracto con Actividad Antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico). Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- C.-H. and Chang, K. C. 2003. Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF- $\alpha$ , INOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Sciences.* 73, 1401-1412.
- Calderon, R. G. 1991. Familia Papaveraceae. Instituto de Ecología, A.C. y Centro Regional del Bajío Patzcuaro, Michoacán, México. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 1.
- Calixto, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*, v.33, p.179-189.
- Chang, Y.-C., Hsieh, P.-W., Chang, F.-R., Wu, R.-R., Liaw, C.-C., Lee, K.-H., Wu, Y.-C. 2003. Two new protopines Argemexicaines A and B and the anti-HIV alkaloid 6-acetonyldihydrochelerythrine from Formosan *Argemone mexicana*. *Planta Med.* 69:148-152.
- Chelombit'ko, V.A., Nazarova, L.E. 1988. Alkaloids from several *Argemone* species (*A. ochroleuca*, *A. albiflora*, *A. platyceras*). *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 22: 580-585.
- Chwen, C., Rong, C., Khalila, A., Hsieha P., Chang W. 2003. Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen.
- Cifuentes E, Ortega MA. 1990. Herbolaria y tradiciones etnomédicas en un pueblo nahua. *Universidad Nacional Autónoma de México:* 7 – 15.

- Cordell, G.A. 1995. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40: 1585-1612.
- Cortella, A.R., Pocheltino, M.L. 1999. Plants employed for infusions in urban areas of Argentina. *Pharm. Biol.* 37: 97-104.
- Cragg, G. M., Newmann, D. J., Snader, K. M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60, 52–60.
- Devi, K.S., Sastry, G.S.R. 2002. HPLC method for the determination of sanguinarine in Argemone and in Argemone-adulterated edible oils. *Journal of Planar Chromatography and Modern TLC*, 15:223-225.
- DiSaia, PJ, Creasman, WT. 1999. Capítulo 19. Inmunología tumoral, mecanismos de defensa del huésped y tratamiento biológico. En: *Oncología ginecológica clínica*. Harcourt Brace, 5ª ed., España: 541-579.
- Domínguez, X. 1979. *Métodos de Investigación de Fitoquímica*. 1ra edición. México. Limusa, S.A. pp 81-90, 211-216.
- Farnsworth, N.R., Loub, W.D. 1983. Information gathering and data bases that are pertinent to the development of plant-derived drugs. En: *Plants: The Potentials for extracting protein, medicines and other useful chemicals*. Workshop proceedings, OTA: 178-195.
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M.R., Jankowski, C., Campos, M.G. 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 522: 108-115.
- Fletcher, M.T., Takken, G., Blaney, B.J., Alberts V. 1993. Isoquinoline alkaloids and keto-fatty acids of *Argemone ochroleuca* and *A. Mexicana* (Mexican Poppy) Seed. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 265-275.
- Fukuda, K, Hibiya, Y, Mutoh, M, Koshiji, M, Akao, S, Fujiwara, H. 1999. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 66: 227-233.

- Haisova, K., Slavik, J. 1973. Alkaloids of the Papaveraceae. II. Alkaloids from *Argemone ochroleuca*. Collect. Czech. Chem. Commun. 38: 2307-2312.
- Hemminki, K., Mutanen, P. 2001. Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis. Mutation Research, v.473, p.11-21, 2001.
- Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velazquez, E.F., Astiazaran, H., Lugo, E., Velázquez, C. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. Planta Med. 73:1469-74.
- Herrera, A.G., García, M.G. 2006. Manual de oncología: procedimientos medicoquirúrgicos. Tercera edición. Instituto Nacional de Cancerología (México), McGraw-Hill.
- Howley, PM, Ganem, D, Kieff, E. 2000. Capítulo 8, sección 2. Virus de DNA. En: Cáncer, principios y práctica de oncología, volumen 1. Editorial Médica Panamericana y Arán ediciones, España: 168 - 175.
- Hu, J, Takakhashi, N, Yamada, T. 2000. Coptidis Rhizoma inhibits growth and proteases of oral bacteria. Oral Disease 6: 297-302.
- Iizuka, N, Miyamoto, K, Okita, K, Tangoku, A, Hayashi, H, Yosino, S, Abe, T, Morioka, T, Hazama, S, Oka, M. 2000. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. Cancer Lett 148: 19-25.
- Israilov, I., Chelombit'ko, V., Nazarova, L.E. 1986. Argemone alkaloids. Him. Prir. Soedin. 6: 798-799.
- Johnson, G. D., Moreno, S. S., López E. R. 1996. Compendio Fitoquímico de la Medicina Tradicional Herbolaria de Sonora. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Kohn, L.K., Pizão, P.E., Foglio, M.A., Antônio, M.A., Amaral, M.C.E., Bittric V., Carvalho, J.E. 2006. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.esp., p.110-115.

- Kumar, S., Kumar S., Mathur, A., Singh, S. 2010. In vitro cytotoxicity of *Argemone mexicana* Against Different Human Cancer Cell Lines. International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research. Vol. 1, No.1, 37-39.
- Kuo, CL, Chou, CC, Yung, BYM. 1995. Berberine complexes with DNA in the berberineinduced apoptosis in human leukemic HL-60. Cancer Lett 93: 193-200.
- Lamprontim, I., Saab, M.A., Gambari, R.. 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. International Journal of Oncology 29: 989-995.
- Lee, D-U., Kang, YJ., Park, MK., Lee, YS., Seo, HG., Kim, TS., Kim, Lodish, H, Baltimore, D, Berk, A, Zipursky, SL, Matsudaira, P, Darnell J. 1999. Capítulo 26. Cáncer. En: Molecular cell biology. Scientific American books, 3ª ed. U.S.A: 1247-1253.
- López-Estudillo, R., Hinojosa-García, A. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 130 p.
- Lozoya, X., Abigail, A., Camacho, R. 1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. Rev. méd. IMSS. 25: 283-291.
- Maldonado JG, Jaramillo HN. (1996) Factores de Crecimiento II. IATREIA 9(2):83-87.
- McKee, T., McKee, J. 2003. Bioquímica: La Base Molecular de la Vida. Avaranca, Madrid. McGraw-Hill.
- Moo-Puc, R., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y. 2009. *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. Ciencias Marinas, Vol. 35, No. 4.
- Moss, RW. 1998. Herbs against Cancer, history and controversy. Equinox Press, Inc. U.S.A: 7-15.

- Navarro, V., Villareal, MA., Rojas, G., Lozoya, X. 1996. Antimicrobial Evaluation of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 53:43-147.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 66: 1022-1037.
- Nonin-Lecomte, S, Felden, B, Dardel, F. 2006. NMR structure of the Aquifex aeolicus tmRNA pseudoknot PK1: new insights into the recoding event of the ribosomal trans-translation. *Nucleic Acids Res.* 34: 1847-53.
- Okunade, AL, Hufford, CD, Richardson, MD, Peterson, JR, Clark, AM. 1994. Antimicrobial properties of alkaloids from *Xanthorhiza simplicissima*. *J Pharmacol Sci* 83: 404-406.
- Ortiz Sandoval, CG. 2010. Evaluación de la actividad antiproliferativa de las plantas *Struthanthus palmeri*, *Krameria erecta* y *Stegnosperma halimifolium* originarias de sonora sobre las líneas celulares C3F6, L929, HeLa y Raw. Tesis profesional. Universidad de Sonora.
- Pacheco, LD. 2001. Bioquímica, estructural y aplicada a la medicina. Instituto Politécnico Nacional, México: 546 – 550.
- Phillipson, JD. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v.56, p. 237-243.
- Piacente, S., Capasso, A., De Tommasi, N., Jativa, C., Pizza, C., Sorrentino, L. 1997. Different effects of some isoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* on electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum. *Phytotherapy Res.* 11: 155-157.
- Rates, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p.603-613.
- Roja, G., Rao, P.S. 2000. Anticancer compounds from tissue cultures of medicinal plant. *J Herbs, Spices. Med. Plants* 7: 71-102.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharmacol.* 74: 97-101.

- Saldierna, JF., Suárez, GS., García, OP., Rodríguez, SJ. 2001. Recetario de hierbas y plantas medicinales. Ediciones EuroMéxico, Colombia: 8-10.
- Saleh, N., Maksoud, S., El-Hadidi, M., Amer, W. 1987. A comparative study of flavonoids in some members of the Papaveraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 673-675.
- Sánchez Mendoza, ME. 2007. Mecanismo de acción relajante de berberina aislada de *Argemone ochroleuca Sweet* en anillos de tráquea aislada de cobayo. Tesis. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Sarker, S., Latif, Z., Gray, A. 2006. Natural Products Isolation. Second Edition. Humana Press Inc.
- SAS Institute. 2005. PROC user's manual, version 8th. SAS Institute, Cary, NC.
- Sepulveda, G., Porta, H., Rocha, M. 2003. La aparición de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 21:365-366.
- Shamma, M. 1972. The Isoquinoline Alkaloids, Chemistry and Pharmacology. Academic Press New York and London, Vol. 25.
- Shan, Y, Xu, L, Lu, Y, Wang, X, Zheng, Q, Kong, L, Niwa, M. 2008. Diterpenes from *Coleus forskohlii* (WILLD.) BRIQ. (Labiatae). *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 56:52-56.
- Shigeta, K., Ootaki, K., Tatemoto, H., Nakanishi, T., Inada, A., Muto, N. 2002. Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by a *Coptidis rhizome* extract and protoberberine alkaloids. *Biocsci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2491-2494.
- Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D. 2007. Spectronic Identification of Organic Compounds. 7ma edición. Nueva York, E.U. Editorial John Wiley & Sons.
- Stermitz, FR., Nicodem, DE., Wei, CC., McMurtrey, KD. 1969. Alkaloids of *Argemone polyanthemos*, *A. corymbosa*, *A. chisosensis*, *A. sanguinea*, *A. aurantiaca* and general *Argemone* systematics. *Phytochemistry.* 8: 615-627.

- Stuffness, M., Douros, J. 1982. Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* 45: 1-14.
- Sukumar, D., Arivudai, NR., Sulochana, N. 1984. Studies on the leaves of *Argemone mexicana*. *Fitoterapia*. LV: 352-353. Szeto, S., Yow, C. M. N. and Fung, K. W. Characterization of berberine on human cancer cells in culture. *Turk. J. Med. Sci.*, 2002, 32, 363-368.
- Takken, G., Fletcher, M., Blaney, B. 1993. Isoquinoline alkaloids and keto-fatty acids of *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Mexican poppy) II. Concentrations tolerated by pigs. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 277-285.
- Uddin, S., Grice, D., Tiralongo, E. 2009. Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *eCAM Advance Access*.
- Ulrichová, J., Dvorak, Z., Vicar, J., Lata, J., Smrzová, J., Sedo, A., Simánek, V. 2001. *Toxicology Letters* 125 (2001) 125–132
- Valdéz, AR. 1998. La Herbolaria en el Noroeste de México (paisaje, herencia e historia). En: México Desconocido; Herbolaria Mexicana, guías prácticas, México: 14-53.
- Valenzuela, M. D. 2000. Reservorio de Plantas Medicinales en el Sur de Sonora. Ed. Universidad de Sonora. 1a edición. Navojoa, Sonora.
- Velásquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F.M., Velazquez, E.F., Astiazaran, H., Hernandez, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl Microbiol.* 103:1747-56.
- Vennerstrom, JK, Klayman, DL. 1988. Protoberberine alkaloids as antimalarials. *J Med Chem* 31: 1084-1087.
- Vennerstrom, JL, Lovelace, JK, Waits, VB, Hanson, WL, Klayman, DL. 1990. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob agents Chemother* 34: 918-921. Verdecchia, A. (2001). Incidence and prevalence of all cancerous disease in Italy: trends and implication. *European Journal of Cancer*, v.37.

- Verweij, J., Jonge, M.J.A. 2001. Achievements and future of Chemoterapy. *European Journal of Cancer*, v.36, p.1479-1487.
- Villaseñor Ríos, JL., Espinosa García, FJ. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Yamada, P, Isoda, H, Han, JK, Talorete, TP, Yamaguchi, T, Abe, Y. 2007. Inhibitory effect of fulvic acid extracted from Canadian sphagnum peat on chemical mediator release by RBL-2H3 and KU812 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71: 1294-305.
- Yong-Hong, Z., Anirban, B., Kah, F.W., Mei, C.L., Shing-Leng, C., Victor, Y., Yu-Keung, M. 2006. Chelerythrine and Sanguinarine Dock at Distinct Sites on BclXL that are Not the Classic BH3 Binding Cleft. *J. Mol. Biol.*, 364:536–549.
- Zavala, M., Pérez, S., Pérez, R. 1997. Antimicrobial screening of some medicinal plants. *Phytotherapy Res.* 11: 368-371.
- Zhang, RX. 1990. Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors. *Chin Med J* 103: 658-665.