

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad
Antiproliferativa de *Ibervillea sonorae*

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

Heriberto Torres Moreno

Hermosillo, Sonora

Agosto, 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



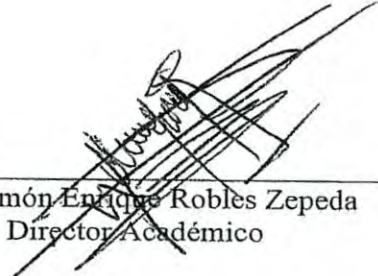
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



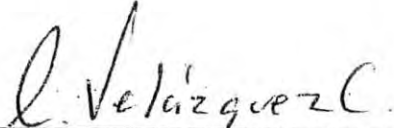
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

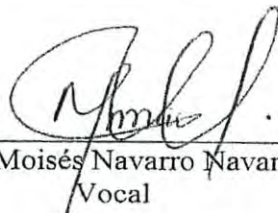
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Heriberto Torres Moreno**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.




Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Director Académico



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario



M.C. Moisés Navarro Navarro
Vocal



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Vocal

AGRADECIMIENTO A CONACYT

Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena de plantas de la etnofaracopea sonrense” (Clave Conacyt 83462).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a dios por permitirme escalar un peldaño más en esta ardua y constante batalla.

A mi director de Tesis, Dr. Ramón E. Robles Zepeda por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, así como la realización de una estancia de Investigación en la Universidad de Perugia en Italia que nos trajo un mar de aprendizaje. Porque todo se inició con una pequeña charla en los pasillos de la Universidad y hoy se refleja en la finalización y el cumplimiento de un gran sueño, le agradezco de corazón.

A la Dra. Maria Carla Marcotullio (Departamento de Química y Tecnología del Fármaco, Universidad de Perugia, Italia) por su valiosa colaboración en la parte de caracterización química y su gran enseñanza. La ringrazio molto!!!

A la Dra. Federica Messina (Departamento de Química y Tecnología del Fármaco, Universidad de Perugia, Italia). Me quedo con muy gratos recuerdos de esta gran experiencia y una gran amistad.

Al Dr. Massimo Curini por abrirnos las puertas de su laboratorio y por su gran calidez.

Al Dr. Ornelio Rosati por sus contribuciones y por hacer amena mi estancia en el laboratorio y al Dr. Andrea Temperini por colaborar en lo que fue mi primer aislamiento de una molécula.

Al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por su gran apoyo, disponibilidad y eficacia, y por sus apreciables aportaciones en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Carlos A. Velázquez Contreras y M.C. Moisés Navarro Navarro por sus valiosas contribuciones y aportaciones en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y profesores del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB) que se han convertido en mi nueva familia.

A mi alma máter Universidad de Sonora y al Posgrado en Ciencias de la Salud por permitirme forjarme en sus aulas y laboratorios.

DEDICATORIAS

*A mi familia,
especialmente a mis padres con todo mi amor,
porque a ellos les debo lo que soy
y en lo que me he convertido.*

*A mis angelitos Valeria y Ángel,
que desde que llegaron a esta tierra
trajeron consigo inmensa felicidad.*

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xi
General.....	xi
Específicos.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Las Neoplasias Malignas y Generación de Tumores.....	3
El Cáncer un Problema de Clase Mundial.....	3
Las Plantas Medicinales y su Potencial Biológico.....	5
Las Plantas Medicinales un Potencial Recurso para el Desarrollo de Nuevas Terapias.....	5
<i>Ibervillea sonorae</i> Características y Propiedades Medicinales.....	6
Características Generales.....	6
Actividad Biológica.....	6
Fitoquímica.....	6
Cucurbitacinas y Cucurbitanos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material Vegetal.....	10
Partición del Extracto Metanólico.....	10
Cultivos y Líneas Celulares.....	11
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa por el Método del MTT.....	11
Separación por Cromatografía en Columna de la Fracción de Acetato de Etilo....	13
Aislamiento y Caracterización Química de Moléculas Bioactivas Presentes en la Fracción A y el Extracto de Acetato de Etilo Disminuido en Clorofilas.....	13
Cromatografía en Columna.....	15
Cromatografía en Columna Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	16

Cromatografía en Columna de la Fracción 22.....	16
Cromatografía en Columna de las Fracciones 21-23.....	
Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).....	17
Resonancia Magnética Nuclear.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Obtención de los Extractos Orgánicos y Validación de la Actividad Antiproliferativa.....	18
Validación de la Actividad Antiproliferativa de los Extractos Orgánicos.....	19
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Cromatográficas de la Fracción de Acetato de Etilo.....	19
Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A de la Fracción Cromatográfica A.....	22
Cromatografía en Columna.....	22
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	22
Resonancia Magnética Nuclear de la Fracción 22-3.....	22
Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A, Diglucósido de Kinoína A y Diglucósido de Kinoína B de la Fracción de Acetato de Etilo.....	26
Cromatografía en Columna.....	29
Análisis de las Fracciones 5 y 6.....	29
Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A.....	31
Identificación del Diglucósido de Kinoína A.....	31
Aislamiento y Caracterización Química del Diglucósido de Kinoína B.....	34
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de los Componentes Triterpenos Aislado e Identificados de <i>Ibervillea sonorae</i>	35
Cambios Morfológicos Inducidos por Kinoína A.....	39
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44

REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS.....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Validación de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones obtenidos de <i>Ibervillea sonora</i> sobre la línea celular RAW 264.7.....	20
II	Evaluación de la actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas del extracto de acetato de etilo.....	21
III	Fracciones generadas a partir del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la Fracción A-22 y sus tiempos de retención.....	24
IV	Análisis comparativo entre los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN registrados por la fracción cromatográfica A-22-3 y la kinoína A.....	27
V	Ácidos grasos presentes en las fracciones 5 y 6 del extracto de acetato de etilo disminuido en clorofilas.....	30
VI	Evaluación de la actividad antiproliferativa de los triterpenos aislados de <i>Ibervillea sonora</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Ibervillea sonora</i>	6
2	Centro tetracíclico esteroidal característico de cucurbitanos y cucurbitacinas (9 β -methyl-19-norlanosta-5-ene).....	9
3	Proceso de aislamiento y caracterización química de los principios bioactivos de <i>Ibervillea sonora</i>	14
4	Aislamiento de kinoína A de la fracción cromatográfica A.....Es	23
5	pectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la Fracción A-22-3.....	25
6	Aislamiento y caracterización química de kinoína A, glucósido de kinoína A y diglucósido de kinoína B de la fracción de acetato de etilo.....	28
7	Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de acetato de etilo que dieron origen las fracciones 21, 22, y 23.	32
8	Representación molecular de la kinoína A y su glucósido (compuestos 1 y 2).....	33
9	Representación molecular del diglucósido de kinoína B (Compuesto 3).....	35
10	Efecto morfológico inducido por kinoína A en A549.....	
	Diferencias estructurales de kinoína A con las cucurbitacina B	40
11	y C.....	41

OBJETIVOS

General

Aislar y caracterizar químicamente los compuestos de *Ibervillea sonora* con actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerosas RAW 264.7, HeLa, M12A^K.C3F6 y A549.

Particulares

- a) Aislar los compuestos de *Ibervillea sonora* responsables de la actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerosas RAW 264.7, HeLa, M12A^K.C3F6 y A549.
- b) Determinar la estructura química de los principios activos mediante técnicas espectrométricas (NMR ¹H y ¹³C, JMOD) y GC-MS.

RESUMEN

La alta incidencia y mortalidad por cáncer sumado a la problemática que existe en su tratamiento, constituyen las razones principales que hacen necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. Las plantas representan un recurso para la obtención de nuevos principios farmacológicos. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar los compuestos con actividad antiproliferativa de la planta *Ibervillea sonora*. Mediante MTT, se evaluó la actividad antiproliferativa de las fracciones de hexano, acetato de etilo, etanol y residual obtenidas del extracto metanólico crudo sobre la línea celular RAW 264.7. La mayor actividad antiproliferativa se observó en la fracción de acetato de etilo (disminuido en clorofilas) con una IC_{50} de 22.8 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente la fracción de acetato de etilo fue separada por cromatografía en columna de sílica gel, siendo las subfracciones cromatográficas agrupadas en siete subfracciones (A-G). Las fracciones menos polares (A y B) mostraron la mayor actividad antiproliferativa en la línea celular A549 con una de IC_{50} 4.1 y 4.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el proceso de aislamiento y caracterización química se exploraron la subfracción cromatográfica A y el extracto de acetato de etilo, para lo cual se utilizaron las técnicas de cromatografía en columna, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectros de acoplamiento en J (Jmod), así mismo se implementó la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (GC-HRMS) y Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas para la identificación de biomoléculas (GC-MS). De la fracción cromatográfica A, se logró aislar y caracterizar el triterpeno kinoína A. Mientras que en el extracto de acetato de etilo se aisló y caracterizó kinoína A al igual que su glucósido, así como el diglucósido de kinoína B. La evaluación de la actividad biológica de estos triterpenos mostró que solo kinoína A posee actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares A549, M12AK.C3F6, HeLa y RAW 264.7, calculándose una IC_{50} de 40.2, 31.46, 19 y 61.5 μM , respectivamente. Se concluyó que Kinoína A es una molécula presente en *Ibervillea*

sonorae que posee efecto antiproliferativo y se describió por primera ocasión la actividad antiproliferativa de este compuesto.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neoplásicas son causales de un gran número de muertes a nivel mundial. El proceso de carcinogénesis se inicia como una lesión precancerosa en una célula, la genética predeterminante y la exposición a factores inductores externos promueven alteraciones en la regulación del ciclo celular, induciendo un estado de mitosis activa que conlleva a que las células se dividan constantemente (OMS, 2013).

Los tratamientos convencionales contra el cáncer, ostentan la aparición de efectos colaterales, el origen de esta problemática tiene su trasfondo en la baja selectividad que los fármacos exhiben frente a las células cancerosas. La repercusión en los pacientes que están bajo tratamiento se resume en la reducción de su calidad de vida (Mans y col., 2000).

Asimismo, las células cancerosas han desarrollado mecanismos que le permiten contrarrestar el efecto inhibitorio que producen algunos fármacos utilizados en estas terapias (Paredes y col, 2006).

Las plantas representan un recurso sustancial para la generación de fármacos. En la búsqueda de nuevos principios activos que posean mayor especificidad sobre las células cancerosas y produzcan en menor grado la aparición de efectos secundarios, los grupos de investigación se han visto en la necesidad de recurrir al conocimiento que poseen los pueblos indígenas sobre la medicina tradicional, con el fin de evaluar a nivel fitoquímico, farmacológico y toxicológico aquellas plantas que se establece poseen efectos curativos (Figueroa-Hernández y col., 2005).

Ibervillea sonorae es una cucurbitácea nativa del estado de sonora con amplio uso en la medicina tradicional, donde destaca su uso como hipoglucemiante, además es utilizado como anti-inflamatorio, para combatir artritis y reumatismo, como antibiótico tópico, catártico etc. (Alarcón, 2005). Un estudio anterior demostró que el extracto metanólico y sus fracciones de hexano y acetato de etilo, presentan fuerte actividad antiproliferativa frente a distintas líneas celulares cancerosas (Torres, 2011). En *I. sonorae*, se han aislado y caracterizado diversos compuestos, principalmente del tipo triterpenos (Achenbach y

col., 1993). Las cucurbitacinas son esteroides del tipo triterpénicos que poseen un centro esteroideal característico (9 β -methyl-19-norlanosta-5-ene) con una variedad de oxígenos sustituyentes en diferentes posiciones (Chen y col., 2005); un hallazgo importante referente a metabolitos de esta naturaleza es que se ha demostrado que poseen actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares (Witkowski *et al.*, 1984; Musza *et al.*, 1994, Konoshima *et al.*, 1995; Duncan y Duncan, 1997; Smit *et al.*, 2000). Achenbach y colaboradores (1993) aislaron y caracterizaron la kinoína A, B y C y sus glucósidos del túberculo de *I. sonorae*, estas moléculas poseen el mismo centro esteroideal característico de las cucurbitacinas. Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar químicamente los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *I. sonorae*.

ANTECEDENTES

Las Neoplasias Malignas y Generación de Tumores

La proliferación celular incontrolada es una de las principales características del cáncer y es debida a la afectación en las células tumorales de genes que están directamente involucrados en la regulación del ciclo celular (Sandal, 2002).

El proceso de carcinogénesis se inicia como una lesión precancerosa en una célula, por alteraciones en su código genético (Aguas y Lanfranchitizeira, 2004). Las fases posteriores de progresión y transformación, culminan con la generación de una célula transformada que se divide a mayor velocidad que el resto de las células del tejido al que pertenece, y posteriormente en ocasiones se propaga (Bello y Cerain, 2001).

La difusión de las células malignas a otras regiones anatómicas se da mediante el proceso de metástasis, que es el causante de un mayor número de muertes por esta patología (Hurst y Welch, 2011).

La genética predisponente (ACS, 2012) y la exposición a factores inductores externos son parte esencial en el desarrollo de una célula maligna. Otro elemento trascendental en la génesis del cáncer es la edad. El número de exposiciones a factores de riesgo es mucho mayor en una persona de edad avanzada que la de un individuo en edad temprana, y de igual manera los mecanismos de reparación celular pierden su eficacia a través del tiempo (NCI, 2006).

El Cáncer un Problema de Clase Mundial

En el panorama mundial el cáncer figura como una de las enfermedades más mortales según las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el año 2008 el cáncer ocasionó un total de 7.6 millones de muertes en el mundo (OMS, 2013), mientras que en México el Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI), estima que durante el 2011 del total de personas fallecidas en el país, el 12.9% fue debido a cáncer (INEGI, 2013).

La tasa de incidencia de cáncer continúa en aumento a causa del crecimiento y envejecimiento de la población mundial, así como la adopción de comportamientos que son de riesgo para contraer cáncer (ACS., 2012).

A pesar de los grandes avances que se han generado en torno al tratamiento de las enfermedades neoplásicas, la cirugía, radioterapia y quimioterapia, siguen siendo universalmente las terapias más eficaces contra el cáncer (Jiang y col., 2012). Sin embargo, éstas están siendo gradualmente desplazadas por nuevas drogas anti-tumor específicas.

No obstante, el fenómeno de multirresistencia a los fármacos y la adaptabilidad inerte de las células malignas, que se traduce a enfermedades recurrentes y metástasis, siguen siendo causa importante de morbilidad y mortalidad por cáncer (Milane y col.; Pannuti y col., 2010).

Aunado a esta problemática, se ha formulado la hipótesis que los tumores contienen una subpoblación de células llamadas células madre cancerosas (CSCs), (por sus siglas en inglés), las cuales poseen la propiedad de auto-renovarse y regenerar tumores. Por lo anterior se infiere que la resistencia intrínseca a la terapia endocrina y quimioterapia (Dave y col., 2012), puede corresponder a la existencia enaltecida de esta subpoblación celular en los tumores residuales después de la quimioterapia (Li y col., 2008).

Asimismo, la quimioterapia y radioterapia causan la aparición de un gran número de efectos secundarios, debido a la afectación que ejercen en el desarrollo de las células normales (ACS, 2010). Esto resalta la necesidad crítica por el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos a fin de reducir la incidencia y mortalidad por cáncer (Curtin y col., 2008).

Las Plantas Medicinales y su Potencial Biológico

Las hierbas y especias en una historia de uso tradicional, con papeles fuertes en el patrimonio cultural (Tapsell y col., 2006). La medicina tradicional ha desarrollado

tratamientos eficaces (especialmente a base de plantas) los cuales que reúnen conocimientos acumulados (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Hoy día la medicina moderna ha avanzado considerablemente, sin embargo el uso de las plantas medicinales sigue estando presente en muchas regiones del mundo (Panickar, 2013). Es por ello que se ha incrementado el interés científico por estudiar los efectos biológicos de la plantas, desde conocer su perfil farmacológico y toxicológico hasta la composición exacta de sus moléculas bioactivas, calidad, la potencia de su actividad y la seguridad en su uso (Valerio y González, 2005; Heinrich y col., 1998; McClatcheya y col., 2009; Choudharyb y col, 2008).

En las últimas décadas el desarrollo de ciencias como la etnobotánica, así como la evaluación sistemática de la farmacopea indígena ha contribuido al desarrollo de nuevas drogas (Heinrich, 1998).

Las plantas medicinales, constituyen un reservorio natural extenso de compuestos químicos que exhiben actividad biológica y es una alternativa común para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades alrededor del mundo (Cragg y Newman, 2005). Aproximadamente el 25% de las medicinas modernas son derivados de compuestos provenientes de plantas que han sido usadas en la medicina tradicional. De igual modo se estima que el 60% de las drogas que se manejan para el tratamiento del cáncer provienen de los productos naturales. Se conocen alrededor de 5 mil especies con aplicaciones curativas en el mundo y sólo el 10% de ellas ha sido evaluado a nivel farmacológico, microbiológico, toxicológico, fitoquímico, etc. (Frei, 1998; Osuna, 2005).

***Ibervillea sonorae* Características y Propiedades Medicinales**

Características Generales

Ibervillea sonorae o wareke (Figura 1) como se le nombra comúnmente, es una planta perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas. Es nativa del estado de Sonora, pero también está reportada para las regiones semiáridas de Sinaloa y Baja California.

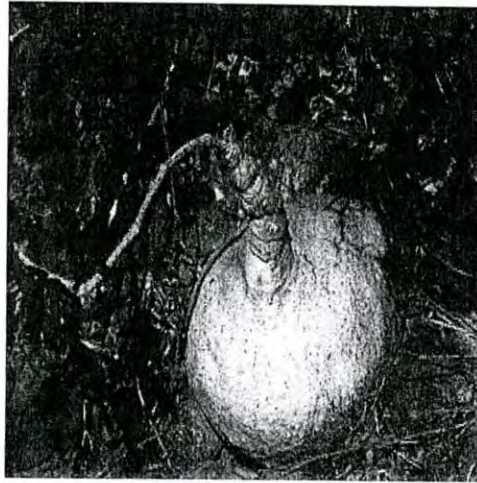


Figura1. *Ibervillea sonorae*.

Fuente: <http://cohonasa.com/blog/2012/03/el-antidiabetico-wereque/>

<http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=3295219>

En la medicina tradicional mexicana, la raíz se usa como antibiótico tópico, catártico, antirreumático, hipoglucemiante, además se dice que posee un potente efecto antineoplásico (Alarcón, 2005; López-Hinojosa 1988).

Actividad Biológica

Varios estudios ratifican el potencial como hipoglucemiante de *I. sonorae*, Alarcón y colaboradores en el 2002, reportaron que la administración intraperitoneal de la raíz liofilizada previamente cocida, disminuye los niveles de glucosa en sangre de ratones sanos y diabéticos. Resultados similares obtuvieron Andrade-Cetto y colaboradores en el 2005, quienes reportaron que el extracto crudo, la decocción acuosa y el extracto diclorometánico de la raíz provocan disminución en la glicemia también en ratones con esta patología.

Torres en el 2011 reportó que el extracto metanólico y sus fracciones exhiben actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares cancerosas. Otro dato relevante para este estudio fue que el extracto metanólico mostró baja toxicidad frente a la línea celular normal L-929.

Fitoquímica

Existen pocos estudios sobre la fitoquímica de *I. sonorae*. Hernández E. y colaboradores en el 2007 aislaron once monoacilglicéridos y cinco ácidos grasos de la raíz del wareke. Observaron que tanto en ratones diabéticos como en los sanos, esta serie de moléculas en conjunto reducen los niveles de glucosa en sangre.

Por su parte Achenbach y colaboradores en 1993 aislaron y caracterizaron del extracto del tubérculo de *I. sonorae* las kinoínas A, B y C así como sus respectivos glucósidos.

Cucurbitacinas y Cucurbitanos

Las cucurbitacinas poseen en su estructura un centro tetracíclico esteroïdal tetracíclico esteroïdal cucurbitano (9 β -methyl-19-norlanosta-5-ene) (Figura 2) que puede presentar una variedad de sustituyentes hidrogenados en diferentes posiciones. De acuerdo a las características estructurales estos compuestos pueden dividirse en varios grupos (Chen y col., 2005). Un hallazgo importante referente a las cucurbitacinas es que se ha demostrado que poseen actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares (Jayaprakasam et al., 2003; Rodriguez et al., 2003; Tannin-Spitz et al., 2007; Duangmano et al., 2012).

De igual modo las kinoínas poseen el centro esteroïdal característico de las cucurbitacinas, por lo que se plantea que debido a estas semejanzas estructurales estos metabolitos son los responsables de la actividad antiproliferativa del wareke.

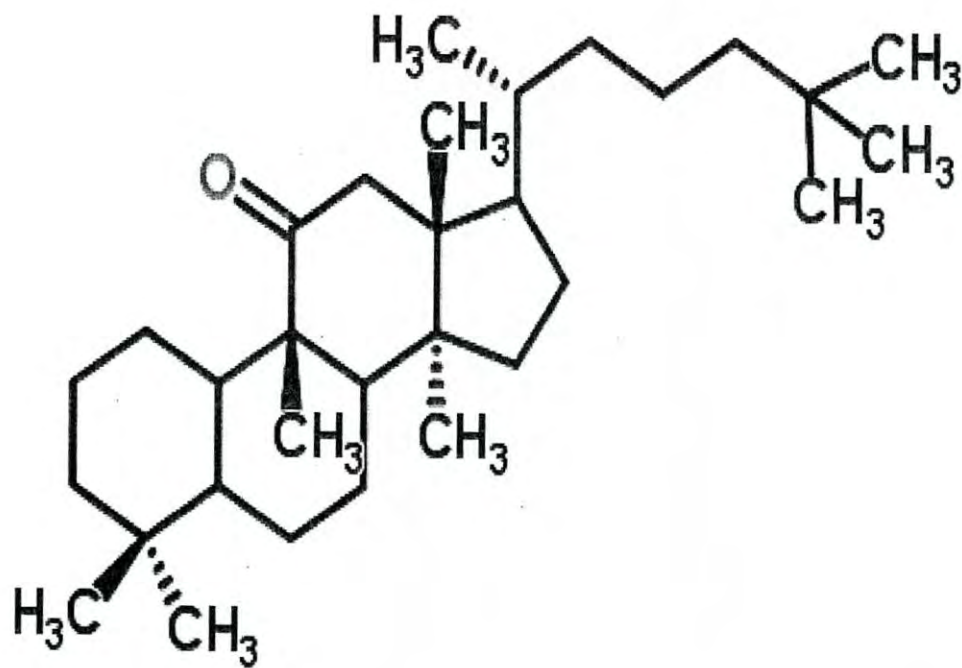


Figura 2.- Centro tetracíclico esteroide característico de cucurbitanos y cucurbitacinas (9 β -methyl-19-norlanosta-5-ene).

Fuente: Chen y col., 2005

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Ibervillea sonorae se recolectó en las regiones aledañas a Ciudad Obregón, Sonora, en el mes de Septiembre del año 2011.

El extracto metanólico total (E-MetOH) se generó a partir de 1.5 kg del tubérculo de la planta. Posteriormente este se molió y se mantuvo inmerso en metanol (MetOH) en una proporción 1:10 (peso/volumen) durante 10 días, agitándose la mezcla periódicamente.

Posteriormente se retiró el sobrenadante y se concentró en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 40°C bajo presión reducida. El concentrado se resguardó hasta su uso a una temperatura de 4°C.

Partición del Extracto Metanólico

La partición del E-MetOH se efectuó mediante la administración continua de solventes orgánicos en orden de polaridad creciente.

La fracción hexánica (F-Hex) se generó a partir de la extracción de 120 g de E-MetOH con 400 mL de hexano (Hex). La mezcla se colocó en un vaso de precipitado de 1,000 mL y se mantuvo en agitación por 24 horas. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se filtró con papel Whatman no. 1, y se concentró en un evaporador rotatorio bajo las condiciones descritas. El cambio de solvente se efectuó de manera periódica cada 24 horas hasta que la parte soluble tomó un aspecto claro o incoloro.

De manera sucesiva la porción insoluble en Hexano se puso en contacto con 400 mL de acetato de etilo (EtOAc), repitiendo el proceso de filtrado, concentrado y cambio de solvente para generar la fracción de acetato de etilo (F-AE).

Asimismo la parte insoluble en EtOAc se mezcló con etanol (EtOH) siguiendo la misma metodología para obtener la fracción etanólica (F-EtOH). La porción insoluble en EtOH se denominó fracción residual (F-Res).

A 12 g de F-AE se le disminuyó el contenido de clorofilas, agregándose 3 gramos de carbón activado a la fracción previamente disuelta, la mezcla se agitó y subsiguientemente se filtró con papel Whatman no. 1 (Torres, 2011).

Por último el filtrado disminuido en clorofilas se concentró bajo las condiciones de temperatura y presión ya mencionadas para generar la fracción de acetato de etilo disminuido en clorofilas (Castilho y col., 2008; Scheepers y col., 2011).

Cultivos y Líneas Celulares

Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) adicionado con 5% de suero fetal bovino (D5F) y 100 U/mL de penicilina, en cajas de cultivo de 25 cm².

Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones estándar de una atmósfera de presión, 5% de CO₂, 37°C y 38% de humedad (Torres, 2011). Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

- RAW 264.7: Macrófagos murinos provenientes de un tumor inducido por el virus de la leucemia de Abelson.
- HeLa: Células epiteliales humanas de cáncer cervical.
- M12.A^KC3F6: Linfoma murino de células B.
- A549: Adenocarcinoma alveolar de humano.
- L-929: Fibroblastos murinos de tejido conectivo subcutáneo no canceroso.

Las líneas celulares A549, HeLa y L-929 fueron adquiridas comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las RAW 264.7 y M12.A^KC3F6 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Emil R. Unanue (Department of Pathologand Immunology, Washington University in St. Louis, MO) (Jiménez y col., 2013).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa por el Método del MTT

La células viables, al mantener activo su metabolismo oxidativo, reducen a través de las deshidrogenasas mitocondriales la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide) a formazán. Esta reacción colorimétrica donde el MTT torna de amarillo a púrpura una vez que se reduce, permite estimar el porcentaje de células viables después de someterse a un agente citotóxico.

Partiendo de un cultivo celular en fase de crecimiento exponencial con una viabilidad del 95%, se preparó una suspensión celular con una concentración de 200,000 cel/mL. El conteo se hizo en una cámara de Neubauer con la ayuda del colorante azul de tripano.

A continuación se agregaron a una placa de ELISA de 96 pozos, 50 μ L de la suspensión celular y se incubó por 24 h bajo las condiciones estándar de temperatura, porcentaje de humedad y de CO₂. En forma continua se agregaron a cada pozo 50 μ L de una concentración conocida del extracto o compuesto a evaluar. Cada concentración se determinó por triplicado.

En la línea celular M12A^K.C3F6 adicionalmente se tuvieron controles de los extractos, donde de forma similar se agregaron 50 μ L del componente a evaluar por triplicado a las 24 h. Solo que en esta instancia anteriormente al tiempo 0 se colocaron 50 μ L de D5F a cada pozo.

Enseguida la placa se incubó por 48 horas. Se hicieron observaciones de la morfología celular a las 24 y 48 horas. Posteriormente se retiró el sobrenadante de la placa y se hizo un lavado con PBS 1X, consecutivamente se agregaron 100 μ L de D5F y 10 μ L de MTT. La placa se incubó nuevamente por 4 horas.

Esta parte del proceso se efectuó de manera homogénea en las células adherentes (RAW 264.7, HeLa, A549 y L-929). En las células M12A^K.C3F6 solo se agregaron 10 μ L de MTT.

Por último se adicionaron 100 μ L de isopropanol ácido y se re-suspendieron los cristales de formazán producto de la reducción del MTT por parte de las células vivas. Se incubó la placa por 10 min y se leyeron absorbancias a 570 y 630 nm (Mosmann, 1983).

Separación por Cromatografía en Columna de la Fracción de Acetato de Etilo

La separación cromatográfica de F-AE se desarrolló en una columna de vidrio de 63 cm de largo x 3 cm de diámetro. Cuatro g de F-AE se mezclaron con 4 g de sílica gel (SiO₂) (Sigma Aldrich 60 A°, 200-400 mesh) proporción (1:1), y se aplicaron a una columna previamente empacada con 20 g de SiO₂ y Hex.

Como fase móvil se utilizaron mezclas de solventes (Hex/EtOAc/MetOH) en distintas proporciones. Las distintas fases móviles y volúmenes eluidos de cada una de ellas se registran en el anexo 1. El volumen de recolección para cada fracción fue de 30 mL.

El monitoreo de la separación cromatográfica se realizó mediante cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios de sílica gel de 8 cm de altura por 5 cm de diámetro. Para eluir los cromatofolios se emplearon fases móviles de polaridad mayor en relación al eluyente manejado para extraer dichas fracciones de la columna.

Posterior a la cromatografía en capa fina, se hicieron observaciones de los cromatofolios en una lámpara de UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm. Posteriormente se revelaron con sulfato cérico con la ayuda de un aspersor de aire, consecutivamente éstos fueron colocados sobre una placa de calentamiento hasta observar la aparición de bandas color café (Coronado, 2012). Inicialmente se obtuvo un total de 285 fracciones que se agruparon en 7 subfracciones (A-G) de acuerdo al patrón de bandas observado en la cromatografía en capa fina. Subsiguientemente se examinó la actividad biológica de las fracciones resultantes, mediante el método del MTT descrito anteriormente.

Aislamiento y Caracterización Química de Moléculas Bioactivas Presentes en la Fracción A y el Extracto de Acetato de Etilo

En la figura 3, se muestra un diagrama general que ilustra el proceso metodológico que se siguió en la búsqueda de los principios bioactivos, el cual a su vez se describe detalladamente a continuación. El desarrollo experimental que se siguió en el estudio de F-AE-5 y 6 se ilustra en el anexo 2.

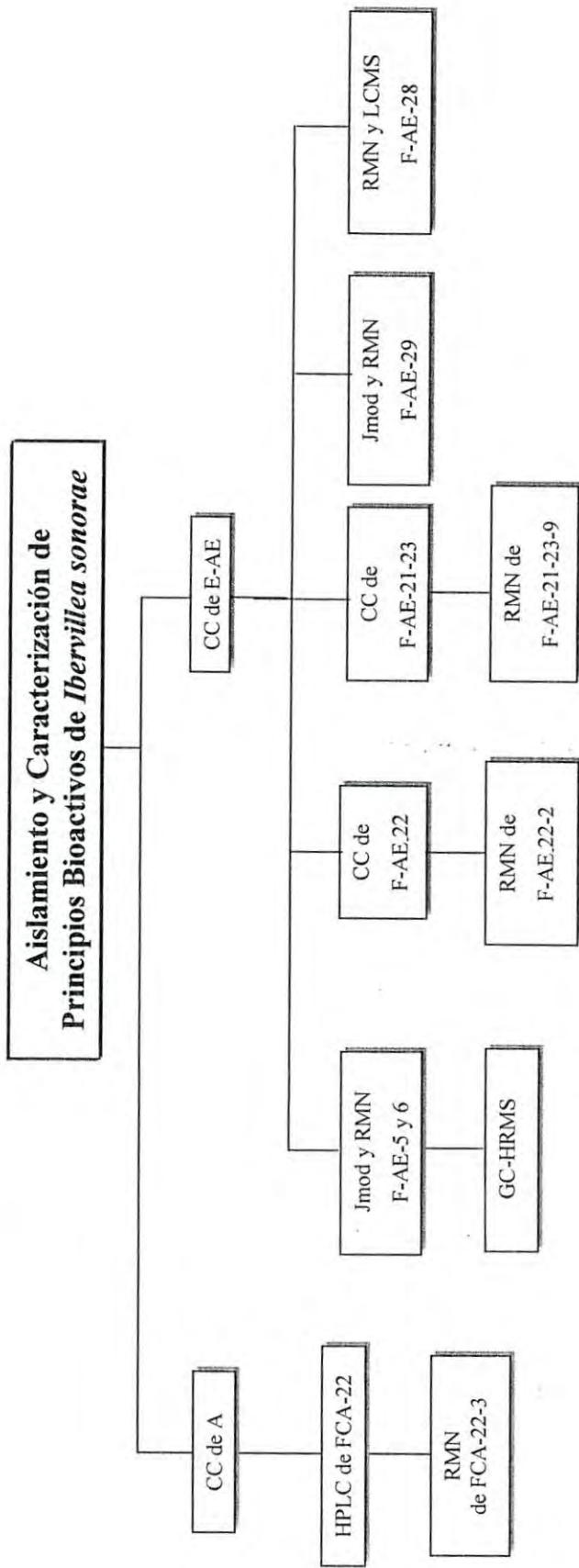


Figura 3.- Proceso de aislamiento y caracterización química de los principios bioactivos de *Ibervillea sonorae*. Cromatografía en Columna (CC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectro de Modulación en J (Jmod), Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (GC-HRMS), Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).

El aislamiento, purificación y caracterización de moléculas se llevó a cabo mediante el uso de varias técnicas, como lo son: cromatografía en columna, Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (GC-HRMS) y Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS), Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono (^1H y ^{13}C RMN) de 200 y 400 MHz y espectros de modulación en J (Jmod).

Cromatografía en Columna

La separación de la fracción A se realizó mediante cromatografía en columna. El procedimiento se desarrolló en una columna de vidrio empacada con SiO_2 (Davisil 60 A°, 60-200 μm) y DCM (diclorometano). Las dimensiones de la columna fueron de 30 cm de alto por 1 cm de diámetro. Cien mg de la muestra se adhirieron en la columna y se eluyeron con mezclas de DCM/MetOH en distintas proporciones.

Los volúmenes de recolección fueron de 10 mL, el monitoreo de la separación se realizó por cromatografía en capa fina, las fracciones se agruparon de acuerdo a su patrón de separación y bandeó. Las fases móviles que se utilizaron para eluir los cromatofolios fueron más polares en relación al eluente usado para extraer dichas fracciones de la columna. Los cromatofolios se sumergieron en una solución de (anisaldehído/ H_2SO_4 / EtOH) (98:1:1) y posteriormente se revelaron con la ayuda de una pistola de calor hasta observar la aparición de bandas coloridas.

Las fracciones se agruparon de acuerdo a su patrón de bandas y separación en el cromatofolio. Se obtuvo un total de 30 fracciones finales que se nombraron como (FCA-1 a FCA-30).

Asimismo se efectuó el fraccionamiento cromatográfico de F-AE. Las dimensiones de la columna fueron de 50 cm de alto por 2.5 cm de diámetro y se empacó con SiO_2 (Davisil 60 A°, 60-200 μm) y DCM. Se colocaron 1.655 g de la muestra en la columna y se eluyeron con mezclas de (DCM/ EtOAc/MetOH).

Los volúmenes de recolección fueron de 10 mL, el monitoreo de la separación se realizó por cromatografía en capa fina. Las fases móviles empleadas para el corrimiento

de los cromatofolios fueron combinaciones de (DCM/EtOAc/MetOH) en diversas proporciones. La técnica de revelado fue la misma que la utilizada para la fracción de acetato de etilo. Se generaron 30 fracciones finales que se nombraron como (F-AE-1 a F-AE-30) (Marcotullio y col., 2011).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La purificación de FCA-22 se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en un sistema Agilent 1100 equipado con un detector UV/Vis. Se utilizó como fase estacionaria una columna Lux Cellulose 2 (Phenomex) con una longitud de 250 mm por 46 mm de diámetro. La separación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C. El eluyente consistió en una fase isocrática de (Hex/iPrOH/EtOH) en proporciones (84:10:6).

Cromatografía en Columna de la Fracción 22

F-AE-22 se separó en una columna de vidrio con una longitud de 50 cm de alto por 2.5 cm de diámetro, la cual fue empacada con SiO₂ (Davisil 60 Å 60-200 µm) y DCM. Se adhirió a la columna 22 mg de la muestra y se eluyeron con mezclas de (EtOAc/Me₂CO) en proporciones 97:3 y 96:4.

Las fracciones se recolectaron en volúmenes de 10 mL y la separación se monitoreó por cromatografía en capa fina. Las fases móviles que se utilizaron para eluir los cromatofolios fueron mezclas de (DCM/EtOAc) (9:1) y (DCM/Me₂CO) (96:4). Los cromatofolios se revelaron con (anisaldehído/H₂SO₄/EtOH) (98:1:1). Las fracciones se agruparon de acuerdo a su patrón de bandas observado en la cromatografía en capa fina.

Cromatografía en Columna de las Fracciones 21-23

Cuarenta y cuatro mg de F-AE-21-23 se fraccionaron en una columna de vidrio de 50 cm de alto por 1.5 cm de diámetro la cual se empacó con SiO₂ (Davisil 60 Å 60-200 µm) y DCM. La muestra se incrustó en la columna y se eluyó con mezclas de (EtOAc/Me₂CO)

en proporciones 99:1 y 98:2. Se usó como agente revelador (anisaldehído/H₂SO₄/EtOH) (98:1:1). El agrupamiento de fracciones se hizo en base al patrón de desplazamiento observado en la cromatografía en capa fina (Marcotullio y col., 2011).

Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS)

Se analizó la fracción F-AE-28 por LC-MS en un equipo LCMS versión Q-TOF B.05.00 acoplado a un detector de espectrometría de masas, con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y con extracción de ión selectiva (EIC). Se analizaron los RT (tiempos de retención) de los iones generados y su relación masa/carga (m/z).

Resonancia Magnética Nuclear

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de protón y de carbono (¹H y ¹³C-RMN) se registraron a frecuencias de 400 y 200 MHz. Por su parte los análisis de acoplamiento en J (Jmod) fueron a registrados a frecuencias de 263 y 200 MHz. Se utilizaron como disolventes cloroformo y metanol deuterado (CDCl₃, CD₃OD). Los desplazamientos químicos fueron presentados en unidades de partes por millón (ppm) y MHz (Mega Hertz).

Los archivos *.fid de los espectros generados por RMN se analizaron y procesaron en el software MestReNova versión 6.0.2-5475 de ©2009 Mestrelab Research S.L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de productos naturales derivados de plantas, animales o microorganismos con fines medicinales tiene mucha historia (Jiménez-Estrada y col., 2013). Las plantas medicinales, constituyen un reservorio natural extenso de compuestos químicos que exhiben actividad biológica, y es una alternativa común para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades alrededor del mundo (Cragg y Newman, 2005). Aproximadamente el 25% de las medicinas modernas son derivados de compuestos provenientes de plantas que han sido usadas en la medicina tradicional. De igual modo se estima que el 60% de las drogas que se manejan para el tratamiento del cáncer provienen de los productos naturales. Se conocen alrededor de 5 mil especies con aplicaciones curativas en el mundo y sólo el 10% de ellas ha sido evaluado a nivel farmacológico, microbiológico, toxicológico, fitoquímico, etc. (Frei, 1998; Osuna, 2005).

Los estudios biodirigidos en *I. sonorae* se han enfocado principalmente a elucidar los componentes bioactivos que ejercen efectos hipoglucemiantes y antiobesidad (Alarcón y col., 2005; Andrade y Heinrich, 2005). Un estudio preliminar reveló que el extracto metanólico y sus fracciones menos polares (hexano y acetato de etilo) de *I. sonorae*, presentan actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares RAW 264.7, M12A^K.C3F6 y HeLa (Torres, 2011).

Obtención de los Extractos Orgánicos y Validación de la Actividad Antiproliferativa

A partir de 1.5 kg de la raíz de *I. sonorae* se generó el E-MetOH con un rendimiento del 8%. Posteriormente, el fraccionamiento por partición del E-MetOH dio origen a las F-Hex, F-AE, F-EtOH y F-Res. Estas fracciones se obtuvieron con un rendimiento de 2.5%, 10%, 18.5% y 15%, respectivamente, con relación al E-MetOH. Por su parte la F-AE disminuida en clorofilas se obtuvo con un rendimiento del 48% con respecto a F-AE.

Actividad Antiproliferativa de los Extractos Orgánicos

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos orgánicos se realizó en la línea celular RAW 264.7, los resultados se muestran en la tabla I.

Para el E-MetOH se calculó una IC_{50} de 138.3 $\mu\text{g/mL}$, así mismo F-Hex y F-AE mostraron una IC_{50} de 64.2 y 41.2 $\mu\text{g/mL}$. La fracción de acetato de etilo disminuida en clorofilas mostró una IC_{50} de 22.8 $\mu\text{g/mL}$. La disminución de la cantidad de clorofilas se dio gracias a la capacidad que posee el carbón activado de interaccionar con compuestos de coordinación como las clorofilas (Castillo y col., 2008), la obtención de un extracto con mayor pureza se reflejó en el aumento de la actividad después del tratamiento con carbón activado.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Cromatográficas de la Fracción de Acetato de Etilo

Los resultados obtenidos en la evaluación biológica de las fracciones cromatográficas de F-AE se muestra en la tabla II.

Las subfracciones cromatográficas A y B (generadas a partir de F-AE) fueron las fracciones más activas en las todas líneas celulares cancerosas probadas. El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos considera que aquellos extractos o fracciones que posean una IC_{50} menor a 30 $\mu\text{g/mL}$ pueden considerarse como citotóxicos (Zapata y col., 2009). La subfracción A y B pueden posicionarse dentro de esta clasificación, debido a que presentaron valores de IC_{50} en A549 de 4.1 $\mu\text{g/mL}$ y 4.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, y en RAW 264.7 la IC_{50} fue de 17 $\mu\text{g/mL}$ para A y 18 $\mu\text{g/mL}$ para B.

Otro dato interesante es que las fracciones A y B mostraron actividad antiproliferativa del tipo selectiva causando menor efecto en la línea celular normal L-929, donde los valores de IC_{50} calculados fueron $>50 \mu\text{g/mL}$.

Tabla I. Validación de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones obtenidos de *Ibervillea sonora* sobre la línea celular RAW 264.7.

Extracto y/o fracciones	IC ₅₀ en $\mu\text{g/mL}$
Metanol	138.3
Hexano	64.2
Acetato de Etilo	41.2
Disminuido en Clorofilas	22.8
Etanólico	> 100
Residual	> 100

IC₅₀: Concentración media máxima para la cual existe un 50% de inhibición celular.

Tabla II. Evaluación de la actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas del extracto de acetato de etilo.

Fracciones cromatográficas	IC ₅₀ (µg/mL)				
	A549	HeLa	M12A ^K .C3F6	RAW 264.7	L-929
A	4.1	37.3	46.4	17	>50
B	4.5	37.5	45	18	>50
C	50	43.9	>50	>50	>50
D	5.3	50	>50	>50	>50
E	6.8	45.8	>50	>50	>50
F	50	50	>50	>50	>50
G	50	50	>50	>50	>50

IC₅₀: Concentración media máxima para la cual existe un 50% de inhibición celular.

Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A de la Fracción Cromatográfica A

Cromatografía en Columna

En la figura 4 se muestra un esquema detallado que ilustra el proceso de exploración de la fracción A que resultó en el aislamiento e identificación del compuesto kinoína A ($C_{30}H_{49}O_6$).

La separación por cromatografía en columna de la fracción A dio como resultado la obtención de 30 fracciones (FCA-1 a FCA-30), de acuerdo al patrón de separación que presentaban en la cromatografía en capa fina. La fase móvil y cantidad de volumen con las que fueron eluidas las fracciones se ilustra en el anexo 3.

La fracción A-22 eluida con la fase móvil (DCM/MetOH) (98:2) se obtuvo con un rendimiento del 80% (80 mg) en relación a la fracción A y se caracterizó por poseer un alto patrón de bandeado, por lo que posteriormente se fraccionó de nueva cuenta por HPLC.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Tras el análisis de FCA-22 por HPLC se originaron 8 fracciones subsiguientes (FCA-22-1 a FCA-22-8) de acuerdo a los tiempos de retención registrados (tabla III). La fracción FCA-22-3 fue la más abundante y se obtuvo con un rendimiento del 14% en relación a FCA-22, y posteriormente se analizó por 1H -RMN.

Resonancia Magnética Nuclear de la Fracción Cromatográfica 22-3

El análisis por 1H -RMN de FCA-22-3 reveló que dicha fracción presentaba una serie de señales características de la molécula (22s)-3 α ,16 α ,20,22,25-Pentahidroxi-(10 α)-cucurbita5,23t-dien-11-one (kinoína A). El espectro de 1H -RMN de FCA-22-3 (Figura 5) registró señales características de los metilos (19, 21, 26, 28, 29 y 30) y de los hidrógenos (3, 6, 7 α , 7 β , 10, 12 α , 12 β , 16, 17, 19, 22, 23 y 24).

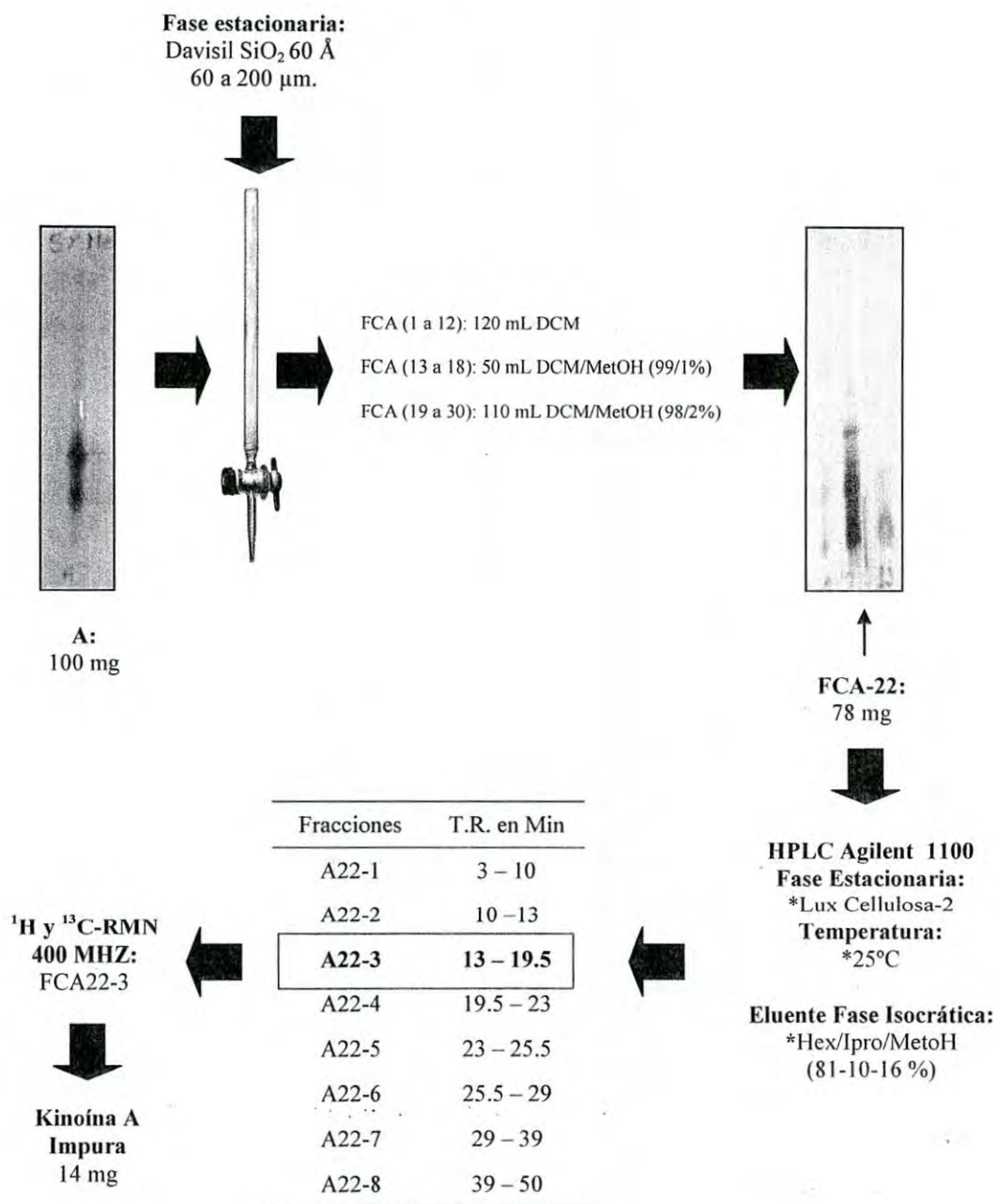


Figura 4. Aislamiento de kinoína A de la fracción cromatográfica A.

Tabla III. Fracciones generadas a partir del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la Fracción A-22 y sus tiempos de retención.

Fracciones	R.T. en min
A22-1	3 – 10
A22-2	10 – 13
A22-3	13 – 19.5
A22-4	19.5 – 23
A22-5	23 – 25.5
A22-6	25.5 – 29
A22-7	29 – 39
A22-8	39 – 50

R.T. en min: Tiempo de retención en minutos

lery/46
rotocarla 46 1 CDCl3 1.2.13 A-3 giallo

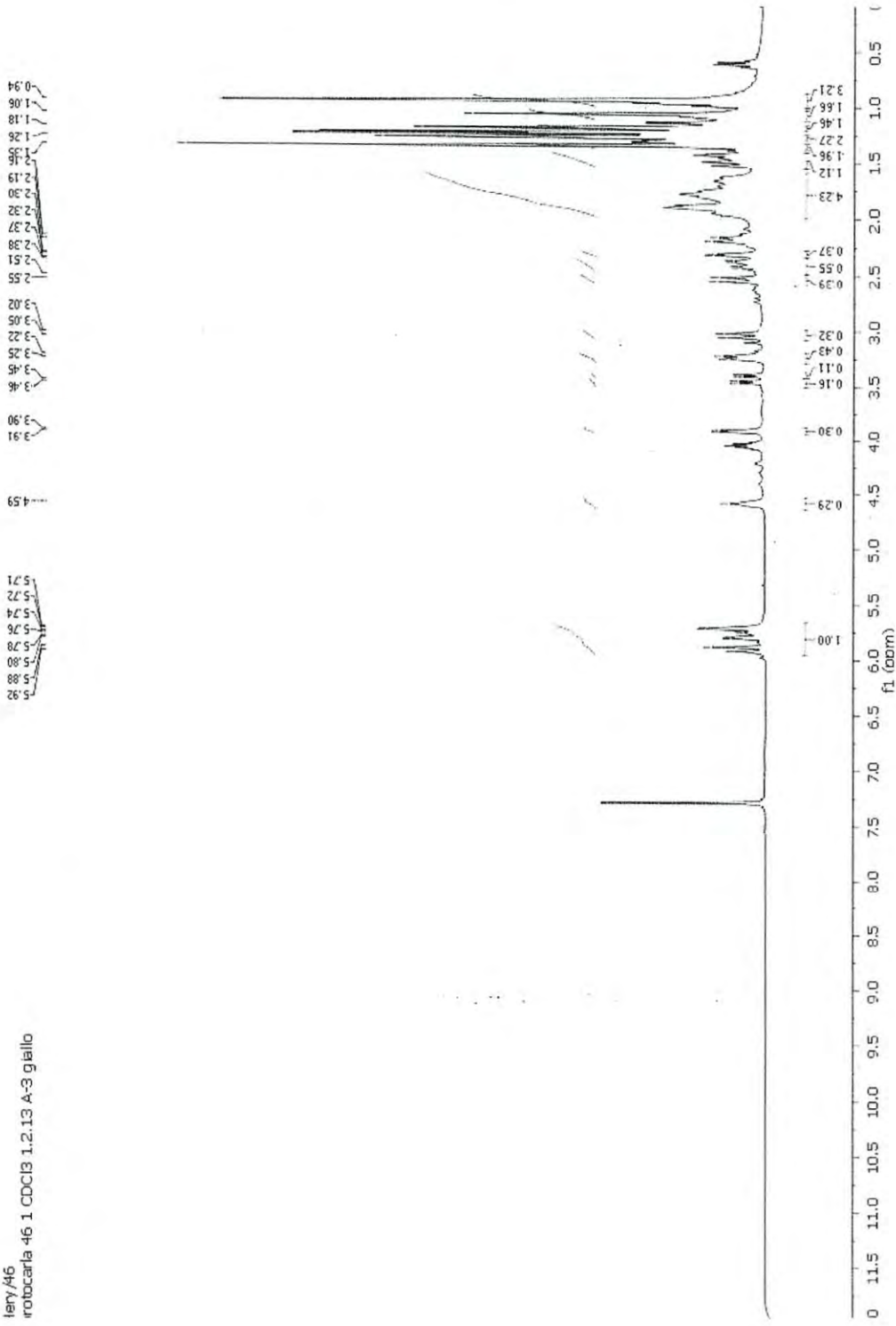


Figura 5. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) de la Fracción A-22-3. Los desplazamientos se presentan en unidades δ (ppm).

En la tabla IV, se muestra un análisis comparativo de las señales en unidades δ (partes por millón) del espectro de ^1H y ^{13}C -RMN a 400 MHz de kinoína A en estado impuro, y lo reportado por Achenbach y colaboradores (1993).

Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A, Diglucósido de Kinoína A y Diglucósido de Kinoína B de la Fracción de Acetato de Etilo

En la figura 6 se muestra un esquema que ilustra el proceso de exploración de la F-EA que llevó a la purificación y caracterización de kinoína A, así como el aislamiento de los diglucósido de kinoína A y B.

Una vez que se hizo el rastreo de la fracción A en busca de los componentes bioactivos, se procedió a analizar la F-AE. El proceso de aislamiento se realizó mediante cromatografía en columna; para la caracterización química se utilizaron las técnicas RMN de ^1H y ^{13}C , LC-MS, GC-HRMS y Jmod.

Cromatografía en Columna

Se hizo una columna cromatográfica de la F-AE con el objetivo de rastrear en forma inicial la zona perteneciente a la fracción A, y lograr el aislamiento y purificación de la molécula kinoína A que anteriormente se había obtenido en estado impuro a partir de la fracción A, así como también tratar de detectar la presencia de otros triterpenos en esta zona o regiones más polares en la F-AE.

Como resultado de la cromatografía se obtuvieron 30 fracciones (F-AE-1 a F-AE-30), las mezclas de solventes utilizados como fase móvil y sus respectivos volúmenes eluidos se muestran en el anexo 3.

Tabla IV. Análisis comparativo entre los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN registrados por la fracción cromatográfica A-22-3 y la kinoína A.

Desplazamiento en δ				
Kinoína A			FCA-22-3	
Posición	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1 β	1.06 m	24.9	---	24.9
1 α	1.63 dddd 13,4 Hz		---	
2 α	1.43 m	30.5	---	30.5
2 β	1.78 dddd 12,4 Hz			
3	3.22 dd 11.5, 4.5 Hz	76.6	3.23 dd 3.3, 10.6	76.6
4		42.2	---	42.2
5		141.8		141.8
6	5.70 br d	118.4	5.71 d 3.1	118.4
7 α	1.85-1.98 m	23.9	---	23.9
7 β	2.39 dddd 19.5, 8.2		2.39 dd 19.3, 7.1	
8	1.85-1.98 m	42.6	---	42.6
9		48.6	---	48.6
10	2.17 br d	35.3	2.17 d	35.3
11		213.7	---	213.7
12 β	2.52 d 14.5	48.8	2.53 d 14	48.8
12 α	3.02 d 14.5		3.03 d 14	
13		47.8	---	47.8
14		51.4	---	51.4
15 α	1.49 d 13 Hz	45.1	---	45.1
15 β	1.85-1.98 m			
16	4.56 br d	71.8	4.59 t 6.2	71.8
17	2.32 d 7HZ	55.2	2.31 d 6.2	55.2
18		19.7	---	19.7
19	1.05 s Me-19	20.2	1.06 s	20.2
20		75.9	---	75.9
21	1.26 s Me-25	24.4	1.27 s	24.4
22	3.90 d 6 Hz	82.0	3.91 d 5.7	82.0
23	5.77 dd 15.5 6	124.2	5.77 dd 15.7, 5.4	124.2
24	5.89 dd 15.5, 1Hz	141.9	5.90 d 15.7	141.9
25		70.7	---	70.7
26	1.34 s Me-26	29.8	1.35 s	29.8
27		29.9	---	29.9
28	0.93 s Me-28	20.3	0.94 s	20.3
29	1.17 s Me-29	24.5	1.18 s	24.5
30	1.25 s Me-30	18.9	1.26 s	18.9

^1H : Señales Registradas en el Espectro Resonancia Magnética Nuclear de Protón

^{13}C : Señales Registradas en el Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

Desplazamiento Químico en δ : Desplazamiento químico en partes por millón

s: singulete; Me: Metilo; br d: doblete expandido; dd: doble de dobles;

dddd: doble de doble de dobles; m: mutiplete.

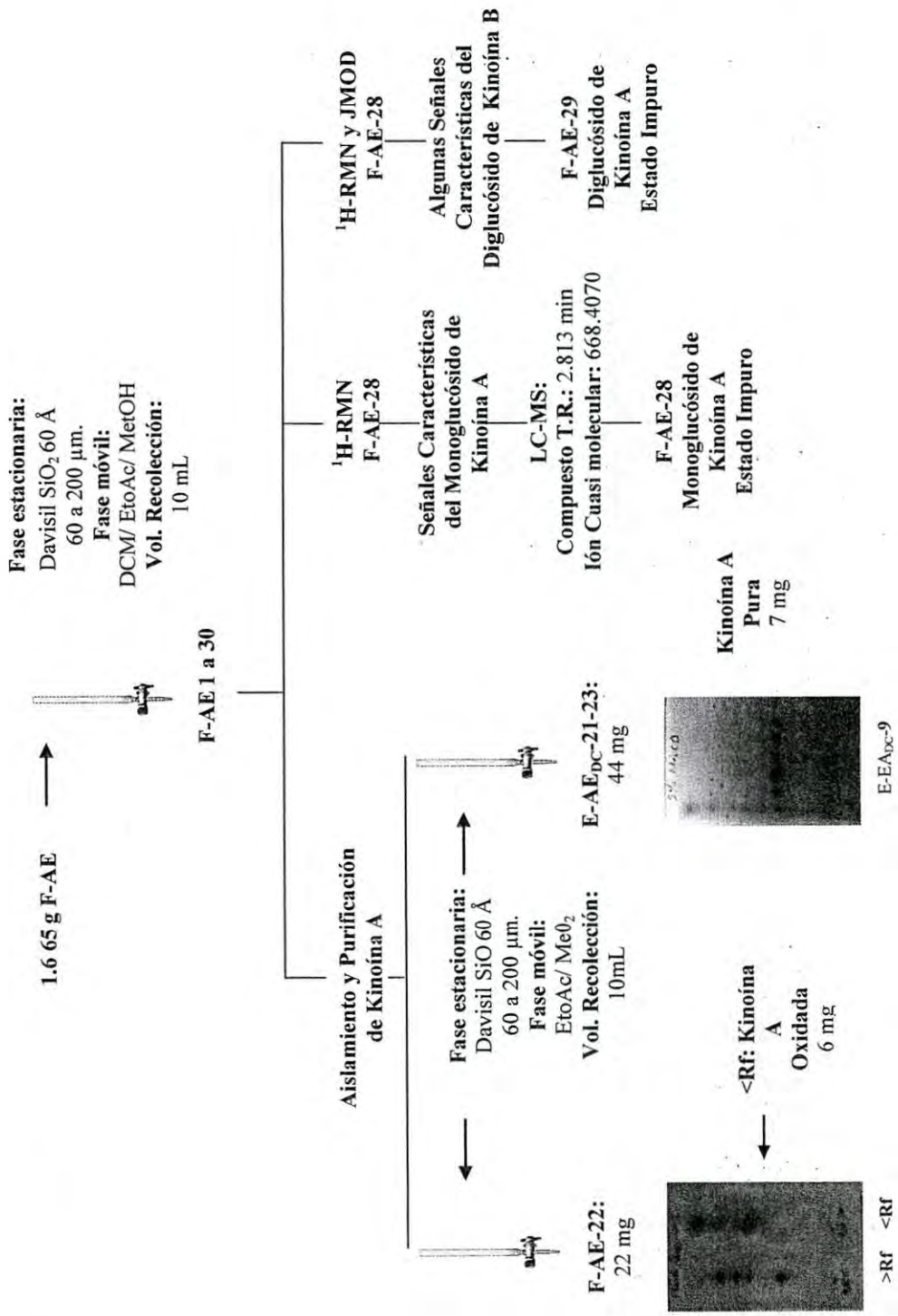


Figura 6. Aislamiento y caracterización química de kinoína A, glucósido de kinoína A y diglucósido de kinoína B de la fracción de acetato de etilo. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹H-RMN), Análisis Espectroscópico de Acoplamiento en J (Jmod), F-AE (Fracción de Acetato de Etilo).

Análisis de las Fracciones 5 y 6

Las fracciones de las F-AE 5 y 6 mostraron desplazamiento característicos de ácidos grasos en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ a una radiofrecuencia de 400 MHz y en el Jmod a 263 MHz.

Las señales registradas para el $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (CH_3 terminal), 1.21 (n CH_2), 2.34 ($\text{CH}_2\text{-CO}$).

Para el análisis Jmod (263 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.1$ (CH_3 terminal), 29.7 (n CH_2), 32.32 (CH_2CO_2), 179.95 (CH_2CO).

Ambas fracciones registraron las mismas señales en los dos análisis, en el anexo 4 se presenta el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de F-AE-5 y en el anexo 5 el espectro registrado por la misma fracción en Jmod. El rendimiento exhibido por la fracción de F-AE-5 fue de 1.8% mientras que la fracción F-AE-6 ostentó un rendimiento de 1 0.97% con respecto a la F-AE.

Posteriormente se analizaron ambas fracciones por GC-HRMS y se determinó que ambas estaban constituidas por los mismos tipos de ácidos grasos pero en diferente proporción, los resultados se muestran en la tabla V. La utilización de estándares internos en el análisis permitió calcular que F-AE-5 estaba constituida en 1.8% por ésteres metílicos, mientras que F-AE-6 presentó un 6.3% de abundancia de este tipo de compuestos.

Aislamiento y Caracterización Química de Kinoína A

Las fracciones F-AE-21, F-AE-22, mostraron señales características de la molécula de kinoína A al analizarse por medio de $^1\text{H-RMN}$, como se describe a continuación.

F-AE.21 $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz/ CD_3OD): $\delta = 0.97$ (s, Me-18 y Me-28), 1.09 (m, H-1 β), 1.16 (s, Me-29), 1.23, (s, Me-21), 1.39 (s, Me-26 y Me-27), 1.46 (m, H-2 α), 2.38 (d, $J=7.75$, H-7 β), 3.05 (s, $J=17-47$, H-12 α), 3.89 (d, $J=4.32$), 4.55 (brd, H-16), 5.67 (brd, H-6), 5.76 (dd, $J_1=17.25$, $J_2=6.39$). El espectro de $^1\text{H-RMN}$ se muestra en el anexo 6.

F-AE.22 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz/ CD_3Cl_3): $\delta = 0.98$ (Me-18 y Me-18), 1.05 (s, Me-19), 1.17 (s, Me-29), 1.24 (s, Me-30), 1.50 (d, $J=16$, H-1 α), 1.60 (d, $J=16$, H-1 α), 1.75

Tabla V. Ácidos grasos presentes en las fracciones 5 y 6 del extracto de acetato de etilo disminuido en clorofilas.

	F-AE-5	% en peso	F-EA-6	% en peso	
	Media	Ds	media	Ds	
C 14:0	3.5	0.3	0.6	0.0	Mirístico
C 14:1	1.6	0.1	0.8	0.0	Miristoleico
C 16:0	42.8	4.2	39.9	0.5	Palmítico
C 16:1	3.3	0.5	0.9	0.1	Palmitoleico
C 18:0	20.6	2.0	29.1	1.0	Estéarico
C 18:1	4.6	0.4	4.2	0.1	Oléico
C 18:2	5.5	0.4	6.7	0.1	Linoléico
C18:3	3.2	0.2	2.0	0.1	α-Linolenico
C 20:0	2.0	0.6	4.0	0.0	Araquidónico
C 22:0	2.0	0.6	3.4	0.4	Behénico

F-AE₅: Fracción 5 del extracto de acetato de etilo disminuido en clorofilas

E-AE₆: Fracción 6 extracto de acetato de etilo disminuido en clorofilas

ds:Desviación estándar

(d, $J=16$, H-2 β), 1.85-1.95 (m, H-7 α , H-8, H-15 β), 2.30 (d, H-17), 2.51 (d, $J_1=12$, $J_2=4$, H-3), 3.9 (d, $J=8$, H-22), 4.64 (t, H-16). El espectro de $^1\text{H-RMN}$ se muestra en el anexo 7.

F-AE-23 presentó una banda azul-violeta con un R_f de 3.5, distintiva de la kinoína A en la cromatografía en capa fina, banda previamente identificada en las fracciones F-AE-21 y F-AE-22 al ser eluida con una fase móvil de DCM/MetOH (9:1), como se observa en la figura 7. La purificación de la molécula de kinoína A $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_6$ (compuesto 1, figura 8) se logró al realizar una cromatografía en columna de la mezcla de las fracciones F-AE-21 y F-AE-23, donde F-AE-21-23-9 fue el compuesto puro.

F-AE-21-23-9 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=$ 1.65 (d, $J=13.1$ Hz, H-1 α), 0.86-1.03 (m, H-1 β), 1.43 (m, H-2 α), 1.77 (d, $J=12.6$ Hz, H-2 β), 3.22 (dd, $J_1=10.6$ Hz, $J_2=3.3$ Hz, H-3), 5.71 (d, H-3.1, H-6), 1.84-1.99 (m, H-7 α , H-8, H-15 β), 2.16 (d, $J=13.7$ Hz, H-10), 2.53 (d, $J=14.4$ Hz, H-12 β), 3.03 (d, $J=14.4$ Hz, H-12 α), 1.51 (d, $J=13.3$ Hz, H-15 α), 4.59 (t, $J=7.2$ Hz, H-16), 2.31 (d, $J=6.2$ Hz, H-17), 0.94 (s, Me-18), 1.06 (s, Me-19), 1.27 (s, Me-21), 3.91 (d, $J=5.7$ Hz, H-22), 5.77 (dd, $J_1=15.7$ Hz, $J_2=5.4$ Hz, H-23), 5.90 (d, $J=15.7$ Hz, H-24), 1.35 (s, Me-26, Me-27), 0.94 (s, Me-28).

F-AE-21-23-9 $^{13}\text{C-RMN}$ (400 MHz/ CD_3OD): $\delta=$ 24.9 (C-1 β), 30.5 (C-2 β), 76.6 (C-3), 42.2 (C-4), 141.8 (C-5), 118.4 (C-6), 23.9 (C-7 α), 42.6 (C-8), 48.6 (C-9), 35.3 (C-10), 213.7 (C-11), 48.8 (C-12 β), 47.8 (C-13), 51.4 (C-14), 45.1 (C-15 α), 71.8 (C-16), 55.2 (C-17), 19.7 (C-18), 20.2 (C-19), 75.9 (C-20), 24.4 (C-21), 82.0 (C-22), 124.2 (C-23), 141.9 (C-24), 70.7 (C-25), 29.8 (C-26), 29.9 (C-27), 20.3 (C-28), 24.5 (C-29), 18.9 (C-30).

Identificación del Diglucósido de Kinoína A

El compuesto (22s)-3 $^{\alpha}$ -(2-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-Glucopiranosiloxi)-16 $^{\alpha}$,20,22,25-Pentahidroxy-(10 α)-cucurbita5,23t-dien-11-on (diglucósido de kinoína A, figura 8) fue identificado en la fracción E-EA_{DC}-28 según el análisis de $^1\text{H-RMN}$ donde dicha fracción mostró desplazamientos químicos propios de la molécula.

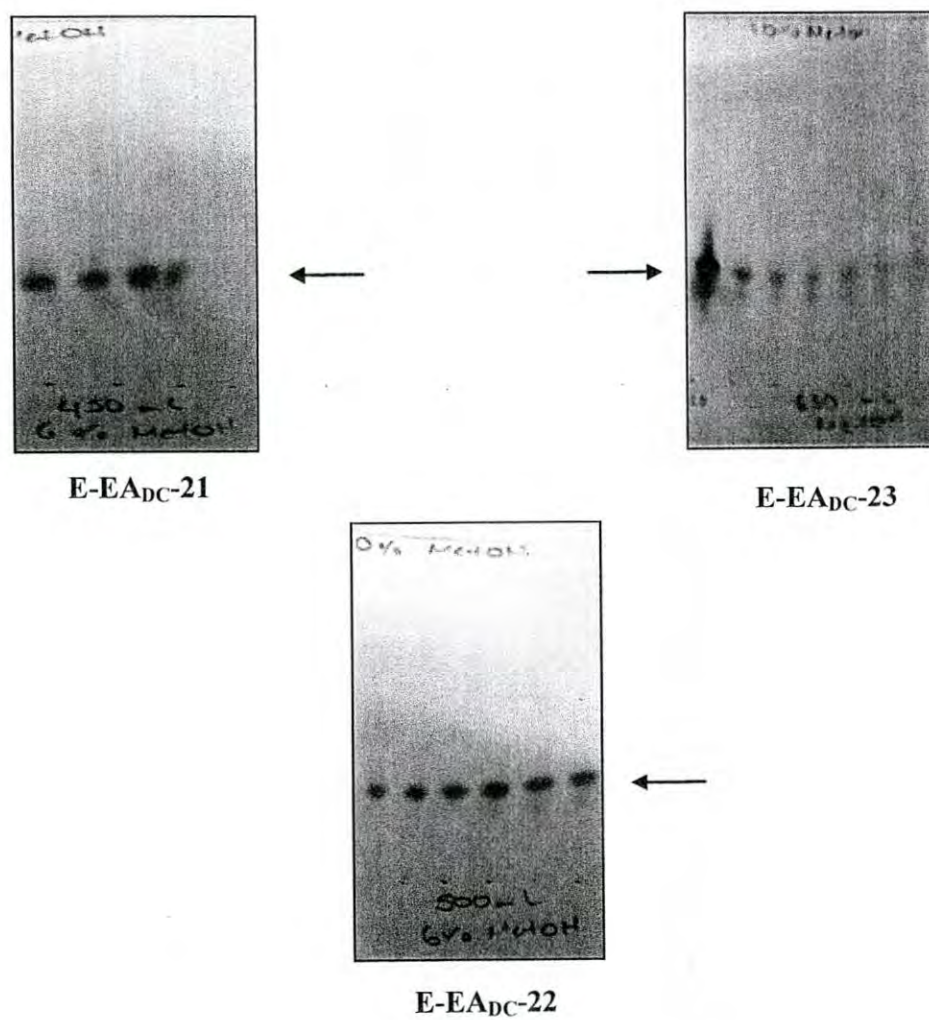
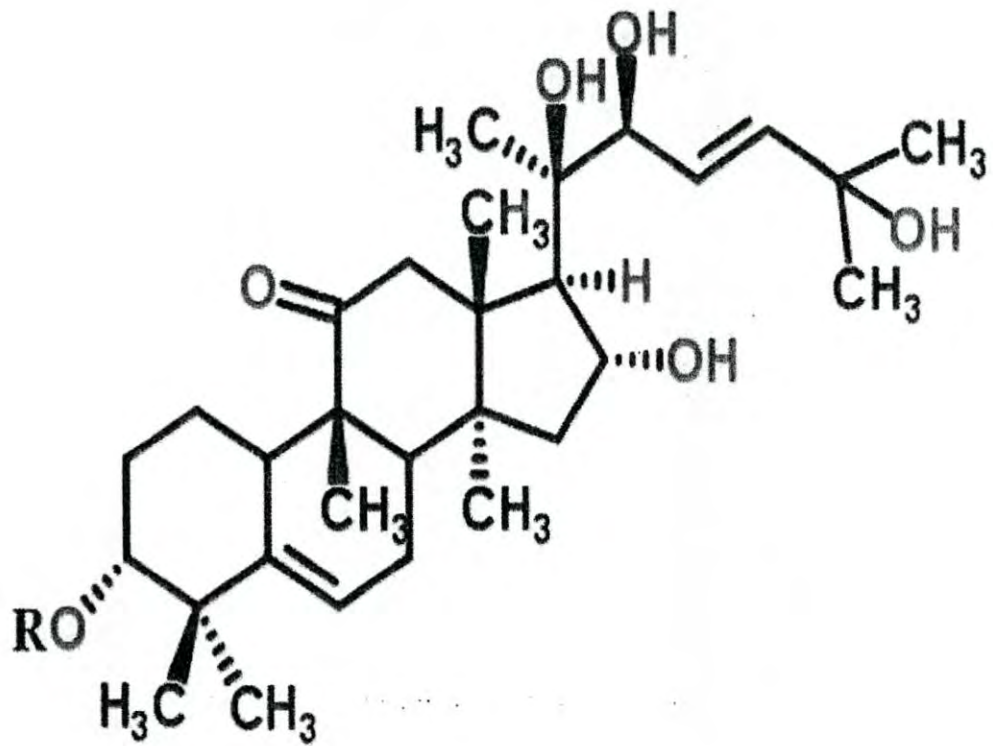


Figura 7. Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de acetato de etilo que dieron origen las fracciones 21, 22, y 23. En todas ellas se observa la presencia de una banda color azul-violeta con un $R_f = 3.6$ característica de la molécula kinoína A.



R

1 H

2 2-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosil

Figura 8. Representación molecular de la kinoína A (1) y su glucósido (2).
Fuente: Achenbach y col, 1993.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ : 1.54-1.66 (m, H-1 α , H-2 α), 1.79-2.06 (m, 7 β , H-2 β , H-8, H-15 β), 3.23-3.30 (m, H-3 y H-4'), 5.76 (m, H-6), 1.95 (m, H-7 α), 2.30-2.43 (m, 7 β , H-10, H-17), 2.46 (d, $J=13.9$, 12 β), 3.11-3.23 (m, H-12 α , H-5'), 1.49 (d, $J=13.8$, H-15 α), 4.64 (t, $J=7.9$, H-16), 0.93 (s, Me-18), 1.03 (s, Me-19), 1.22 (s, Me-21), 3.95 (d, $J=5.3$, H-22), 5.80 (dd, 15.1, 5.2, H-23), 5.87 (d, 15.1, H-24), 1.28 (s, Me-26), 1.29 (s, Me-27), 1.01, s (Me-28), 1.22, (s, Me-29), 1.30, s (Me-30), 4.30 (d, $J=7.6$, H-1'), 3.30-3.53, (m, H-2', H-3', H-4''), 3.60-3.69 (m, H-6'-a), 3.84 (d, $J=11.8$, H-6'-b), 5.38 (br s, H-1''), 3.87 (m, 2''), 4.08 (m, H-5''), 1.19 (d, $J=6$, H-6'').

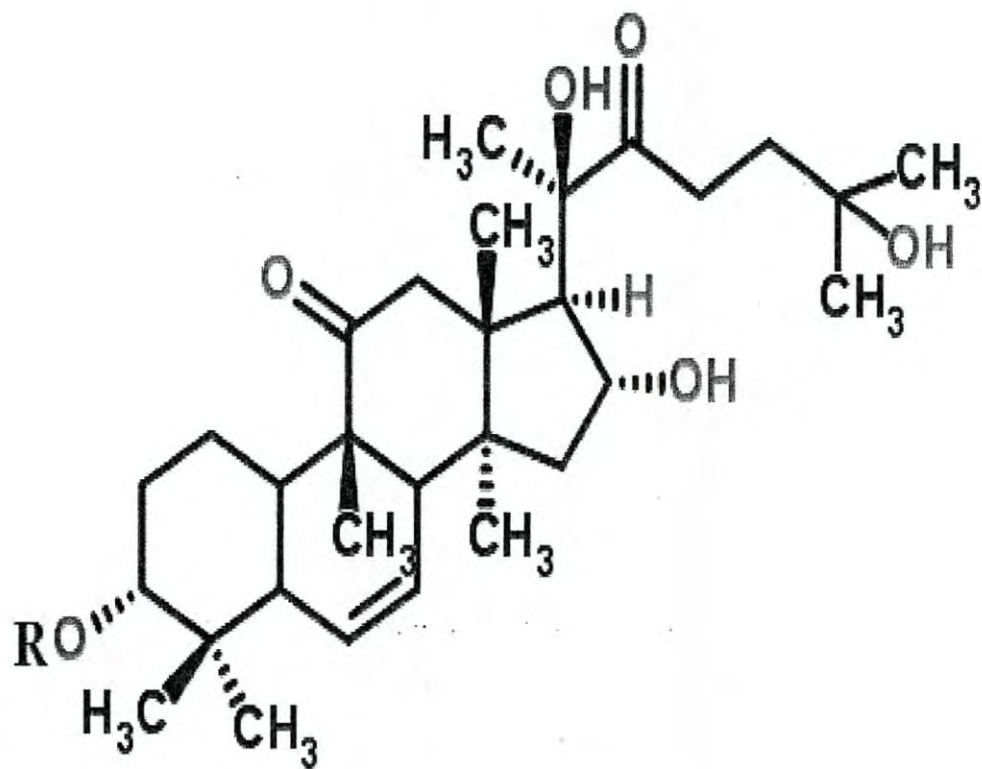
Aislamiento y Caracterización Química del Diglucósido de Kinoína B

La fracción F-AE-29 se analizó por $^1\text{H-RMN}$ y J_{mod} proyectando los siguientes patrones de desplazamientos químicos.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.76 (d, $J=4.6$, H-6), 3.68 (m, H-10), 3.85 (m, H-12 β), 2.54 (d, $J=7.8$, H-14, H-12 α), 4.42 (t, $J=7.8$, H-16), 2.60 (d, $J=7.3$, H-17), 0.91 (s, Me-18), 1.05 (s, Me-19), 1.24 (s, Me-21), 2.74, ddd, ($J_1=17.7$, $J_2=10.2$, $J_3=5.8$, H-23a), 2.86 (ddd, $J_1=17.7$, $J_2=10.2$, $J_3=5.8$, H-23b), 1.07-1.08 (m, H-24), 1.34 (s, Me-26), 1.39 (s, Me-27), 1.02 (s, Me-28), 1.29 (s, Me-29), 4.35 (d, $J=7.4$, H-1'), 4.15-4.05 (m, H-5'), 5.38 (br s, 1''), 4.07 (m, 5''), 1.21 (br d, 6'').

J_{mod} (200 MHz, CD_3OD): δ : 25.3 (C-1), 27.4 (C-2), 84.2 (C-3), 51.7 (C-4), 143.6 (C-5), 119.3 (C-6), 25.3 (C-7), 44.2 (C-8), 54.8 (C-9), 36.5 (C-10), 216.5 (C-11), 48.6 (C-12), 50.3 (C-13), 47.7 (C-14), 42.5 (C-15), 71.4 (C-16), 59.0 (C-17), 20.4 (C-18), 22.8 (C-19), 79.9 (C-20), 24.8 (C-21), 217.1 (C-22), 32.9 (C-23), 37.9 (C-24), 70.8 (C-25), 29.8 (C-26), 29.1 (C-27), 28.9 (C-28), 19.8 (C-30), 100.7 (C-1'), 80.7 (C-2'), 76.9 (C-2''), 72.1 (C-4'), 77.4 (C-5'), 62.8 (C-6'), 101.1 (C-1''), 72.4 (C-2''), 72.6 (C-3''), 73.9 (C-4''), 69.3 (C-5''), 18.3 (C-6'').

La comparación de los patrones de señalización con la literatura nos permitió establecer que esta fracción se encontraba constituida por el diglucósido de kinoína B ($\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$) en estado ($\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$) 16 α ,20,25-Trihidroxi-3 α (2-O-rhamnopiranosil- β -D-glucopiranosiloxi) (10 α)-cucurbit5ene11,22-diona (figura 9).



R
2-O- α -L-rhamnosil- β -D-glucosil

Figura 9. Representación molecular del diglucósido de quinina B.
Fuente: Achenbach y col, 1993.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de los Triterpenos Aislado e Identificados de *Ibervillea sonoreae*

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los triterpenos presentes en *I. sonoreae* se muestran en la tabla VI. La evaluación de la actividad antiproliferativa, mostró que el mayor efecto se ejerció en la línea celular HeLa donde el valor de IC₅₀ fue de 19 µM. Para las líneas celulares A549, M12A^K.C3F6 y RAW 264.6 se calcularon valores de IC₅₀ de 40.2, 31.4 y 61.5 µM, respectivamente. Kinoína A mostró actividad del tipo selectiva debido a la baja afectación en las células normales L-929 para las que el IC₅₀ estimado fue mayor a 100 µM. Los compuestos glucosilados no mostraron efecto antiproliferativo frente a las líneas celulares evaluadas.

El diglucósido de kinoína A se genera a partir de la esterificación de la molécula de ramnosa en el (OH-) del carbono 3 mediante un enlace β la cual a su vez se encuentra enlazada a la molécula de glucosa también mediante un enlace β, la adopción de una nueva estructura influye fuertemente en relación a la actividad mostrada por ambas moléculas debido a las diferencias estereoquímicas (Galbis, 2000); la solubilidad y penetración de la molécula son aspectos que también pueden verse afectados por esta diferencia estructural. El diglucósido de kinoína B también se forma por la esterificación en el carbono 3.

Se han descrito moléculas del tipo cucurbitacinas glucosiladas con efecto antiproliferativo como (16α,23αepoxy-2β,3β,7β,20β,26-pentahydroxy-10α,23α-cucurbit-5,24-(E)-dien-11-one 2-O-_-D-glucopiranosido) y cucurbitacin A 2-O-_-D-glucopiranosido (Chen y col., 2009).

En el caso del primer compuesto el enlace glucosídico se forma en el carbono 2, mientras que en el segundo la esterificación se da en el OH unido al carbono 25. Estas diferencias estructurales pueden poner de manifiesto que posiblemente el carbono 3 intervenga como parte esencial del mecanismo efector.

La actividad expresada por las subfracciones A y B sobre la línea celular A549 y RAW 264.7 no pudo igualarse por la kinoína A. Los IC₅₀ calculados en µg/mL para la kinoína A fueron de 20.3 µg/mL en A549 y 31.1 µg/mL en RAW 264.7.

Tabla VI. Evaluación de la actividad antiproliferativa de los triterpenos aislados de *Ibervillea sonora*

Compuestos	IC ₅₀ (μM)				
	A549	HeLa	M12A ^K .C3F6	RAW 264.7	L-929
Kinoína A	40.2	19	31.4	61.5	>100
Monoglucósido de Kinoína A	NA	NA	NA	NA	NA
Diglucósido de Kinoína B	NA	NA	NA	NA	NA

IC₅₀: Concentración media máxima para la cual existe un 50% de inhibición celular.
 NA: No activo

Las fracciones A y B mostraron IC_{50} de 4.1 y 4.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente en A549, y en RAW 264.7 la IC_{50} para A fue de 17 $\mu\text{g/mL}$ y en B de 18 $\mu\text{g/mL}$. Este fenómeno pudo haberse generado por un conjunto de moléculas presentes en A y B que ejercen una acción aditiva contra las células. Un comportamiento similar fue reportado por Navindra y colaboradores (2004), observaron que la actividad antiproliferativa fue mayor en el extracto total que en los compuestos químicos aislados (azúcares, polifenoles totales y antocianinas) atribuyendo lo anterior al efecto sinérgico o aditivo.

Las cucurbitacinas son un grupo de metabolitos que generalmente se han aislado de plantas de la familia Cucurbitaceae, se caracterizan por poseer en su estructura un centro tetracíclico esteroideal cucurbitano (9beta-methyl-19-norlanosta-5-ene) (Figura 1) que puede presentar una variedad de sustituyentes hidrogenados en diferentes posiciones. De acuerdo a las características estructurales estos compuestos pueden dividirse en varios grupos: cucurbitacina A, B, C, D, E, etc. (Chen y col., 2005). Un hallazgo importante referente a metabolitos de esta naturaleza es que se ha demostrado que poseen actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares (Jayaprakasam et al., 2003; Rodriguez et al., 2003; Tannin-Spitz et al., 2007; Duangmano et al., 2012). La kinoína A posee una relación estructural con esta clase de compuestos debido a que posee un centro cucurbitano.

De los compuestos del tipo Cucurbitacinas, la cucurbitacina A y cucurbitacina B son las dos moléculas con mayor similitud estructural con kinoína A. Chen y colaboradores reportaron (2009) que cucurbitacina A y cucurbitacina B mostraron fuerte actividad citotóxica contra la proliferación de células A549 y BEL7402. Cucurbitacina A inhibe la proliferación celular de A549 con una IC_{50} de 0.4 μM y en BEL7402 exhibe una IC_{50} de 0.3 μM , mientras que cucurbitacina B presenta valores de IC_{50} 0.01 y 0.008 μM en A549 y BEL7402 respectivamente. El valor de IC_{50} calculado para kinoína A en A549 de 39.6 μM , es mayor al mostrado por estas dos moléculas, de igual forma la IC_{50} de kinoína A en las células HeLa que fue donde mostró mayor efecto se encuentra más elevado.

A pesar de la analogía estructural entre kinoína A, y la cucurbitacina A y cucurbitacina B, las variaciones en los sustituyentes unidos al centro cucurbitano (figura 10) (hidroxilo en el carbono 2 y 10, carbonilo en la posición 22, grupo acetilo unido al oxígeno del carbono 25, hidrógeno trans en el carbono 10 en cucurbitacina A) (hidroxilo en el carbono 2, carbonilo en la posición 22, grupo acetilo unido al oxígeno del carbono 25, metilo en el carbono 9) confieren una estereoquímica diferente que podría influir en la unión de las moléculas a su sitio blanco, por lo que el menor efecto citotóxico inducido por la kinoína A puede deberse a tal motivo (Korolkovas, 1983).

Existen registros de otras cucurbitacinas que también poseen efecto antiproliferativo, como la 2-deoxycucurbitacin D que inhibe la proliferación en las líneas celulares MCF-7, H-460 y SF-268 con IC_{50} de 0.04, 0.03, 0.2 $\mu\text{g/mL}$, cucurbitacina D que ostenta IC_{50} en estas líneas celulares con valores de 0.02, 0.01, 0.02 $\mu\text{g/mL}$ y 25-acetilcucurbitacina F para la que se han calculado IC_{50} iguales a 0.1, 0.06, 0.08 $\mu\text{g/mL}$ (Rodríguez y col., 2003). Estos valores de IC_{50} calculados para estos metabolitos en estas líneas celulares también son menores a los mostrados por kinoína A en nuestro estudio.

Cambios Morfológicos Inducidos por Kinoína A

Las observaciones microscópicas a diferentes períodos de tiempo de incubación con kinoína A en las distintas líneas celulares sugieren la presencia de muerte celular por apoptosis, que se presentan de manera similar en todas las líneas celulares.

En la figura 11a, se presenta una microfotografía captada a las 24 horas de la línea celular A549 tratada con una concentración de 49.5 μM de kinoína A. Puede distinguirse un patrón de deformación causado por la formación de vesículas “blebs” de membrana que posteriormente se liberan al medio extracelular en forma de cuerpos apoptóticos. De igual forma se distingue condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, así como contracción y redondeo celular (figura 11b).

Distintas publicaciones coinciden en que uno de los mecanismos de acción por el cual ejercen su efecto las cucurbitacinas es a través de la interrupción de la vía de señalización de las Jaks-Stat (transductor de señal quinasa-janus y activador de la

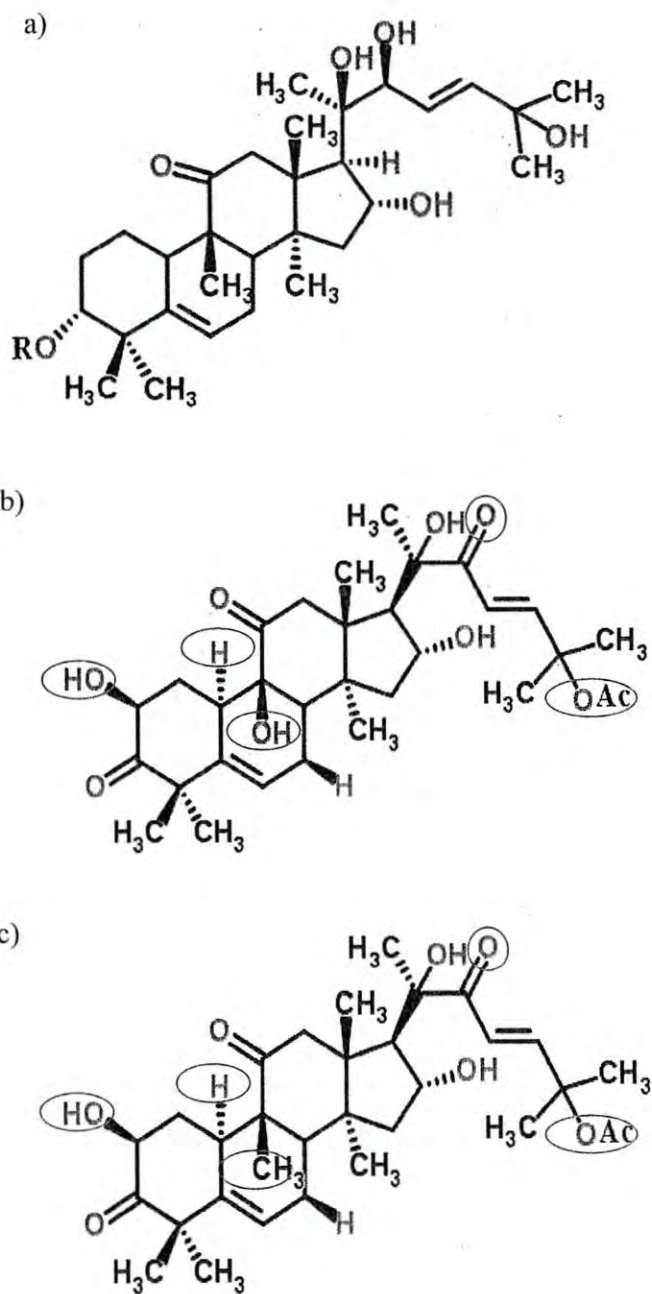
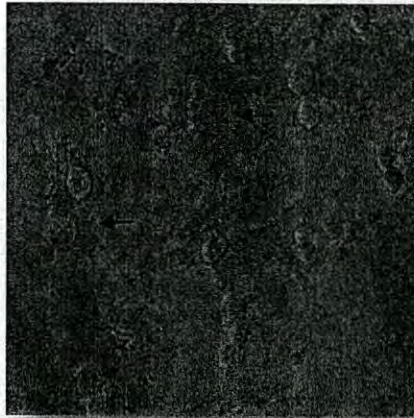


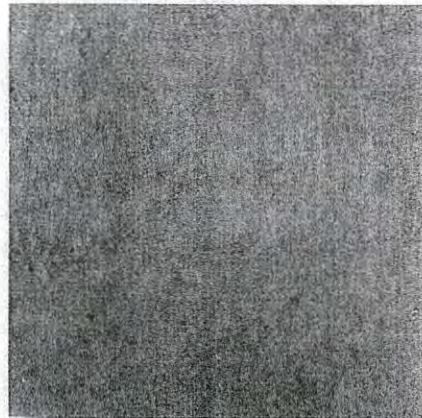
Figura 10. Diferencias estructurales de kinoína A con las cucurbitacina B y C. a) Kinoína A, b) Cucurbitacina B, c) Cucurbitacina C. Con un ovalo rojo se distinguen las variaciones estructurales en las moléculas.

Fuente: Chen y col., 2009.

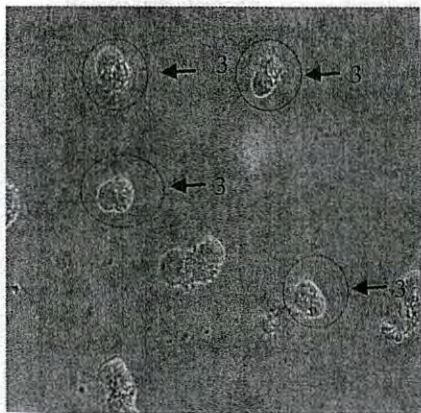
1a)



2 a)



1b)



2b)



Figura 11. Efecto morfológico inducido por kinofina A en A549. 1a) Efecto inducido a las 24 horas, 2a) control de crecimiento a las 24 horas. 1b) Efecto inducido a las 48 horas, 2b) control de crecimiento a las 48 horas. 1) Formación de “bullas” de membrana y cuerpos apoptóticos, 2) condensación de cromatina, 3) Contracción y redondeo celular. La amplificación de las microfotografías es a 400X.

transcripción), específicamente STAT-3 (Bromberg y col., 1999; Blaskovich y col., 2003; Sun y col., 2005).

Asimismo alteraciones en el citoesqueleto (específicamente los filamentos de actina) que promueven posteriormente la apoptosis se han asociado como parte del mecanismo efector de las cucurbitacinas (Maloney y col., 2008; Sørensen y col., 2012).

La cucurbitacina B ejerce su efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama humanas a través de la disrupción de los microtúbulos y la baja regulación de c-Myc, así como la perturbación de tráfico de nucleoplasmina/B23 al núcleo, lo que resulta en la detención del ciclo celular en la fase G2/M. Las visualizaciones microscópicas en las líneas celulares MCF-7 and MDA-MB-231 después de estar bajo la acción de la cucurbitacina B destacan cambios morfológicos como la contracción y redondeo celular.

Como se observa en la figura 11, kinoína A de igual forma induce estos cambios morfológicos, por lo que los mecanismos implicados en la muerte celular inducida por kinoína A podría ser semejante al inducido por cucurbitacina B. Adicionalmente es probable que la inhibición de la vía Jaks-Stat esté involucrada en el proceso efector de kinoína A.

Los metabolitos secundarios de plantas proveen un excelente reservorio de nuevos compuestos medicinales, muchos agentes anticancerígenos han sido aislados de plantas, así mismo todavía se está tratando de examinar la biodisponibilidad de compuestos con propiedades anticancerígenas en plantas no investigadas (Joyce y col., 2011).

La exploración de *I. sonorae* permitió el aislamiento y caracterización de kinoína A. Por primera ocasión se describió que este triterpeno posee actividad antiproliferativa del tipo selectiva, afectando mayoritariamente la proliferación de las líneas células tumorales A-549, M12A^K.C3F6, HeLa y RAW264.7 en comparación con la línea celular normal L-929, así mismo se observaron cambios morfológicos en las células afectadas característicos de apoptosis, lo que sugiere la inducción de este tipo de muerte celular por kinoína A.

CONCLUSIONES

- ❖ Se aislaron y caracterizaron tres triterpenos de *Ibervillea sonora*, kinoína A, monoglucósido de kinoína A y el diglucósido de kinoína B.
- ❖ Se describió por primera ocasión que el triterpeno kinoína A, es una molécula con actividad antiproliferativa.
- ❖ Kinoína A mostró actividad antiproliferativa del tipo selectiva frente a las líneas celulares cancerosas.

PERSPECTIVAS

- ❖ Esclarecer las vías implicadas en el proceso de muerte celular inducida por la kinoína A con el fin de elucidar el mecanismo de acción de esta molécula.
- ❖ Evaluar la actividad antiproliferativa de *Ibervillea sonora* en un panel de líneas celulares más amplio.
- ❖ Realizar otra exploración en *Ibervillea sonora* en busca de otras moléculas con poder antiproliferativo.
- ❖ Medir el efecto sinérgico de kinoína A con las posibles moléculas que pudiesen encontrarse en *Ibervillea sonora*.
- ❖ Formar dímeros entre moléculas de kinoína A mediante un agente ligante y evaluar su actividad antiproliferativa.
- ❖ Formar compuestos diméricos mediante un agente ligante entre kinoína A y moléculas que ya están reportadas por su actividad citotóxica y medir su actividad antiproliferativa.

BIBLIOGRAFÍA

- Achenbach, H., Horn, K., Domínguez, X.A., Rombold, C., Gómez E.G. 1993. Cucurbitanes and Cucurbitane-Type Glycosides from *Ibervillea sonora*, *Phytochemistry*, 10(2), 437-445.
- Aguas, S.C.; Lanfranchi H.E. (2004). Lesiones premalignas o cancerizables de la cavidad oral. 19(47), 21-30.
- Alarcón, F.; Calzada, F.; Hernández, E. 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. *J Ethnopharmacol*, 97(3), 447-45.
- Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 99(3), 325-348.
- ACS, 2010. American Cancer Society. La Herencia y el Cáncer. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/queesloquecausaelcancer/otrosagentescancerigenos/la-herencia-y-el-cancer>.
- ACS, 2012. American Cancer Society. Datos y Estadísticas Sobre el Cáncer Entre los Hispanos/Latinos. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036792.pdf>.
- Bello, J., Cerain A., (2001). Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. Pp. 156.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R.; Sefti, SM. 2003. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*, 63, 1270-1279.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., Darnell, J.E. jr. 1999. Stat3 as an oncogenes, *Cell*, 98: 295-303.
- Castilho, P.C., Gouveia, S.C., Rodrigues, A.I. 2008. Quantification of artemisinin in *Artemisia annua* extracts by 1H-NMR. *Phytochem Anal*, 19(4), 329-334.

- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., Qiu, S.X. 2005. Cucurbitacins and cucurbitano glycosides: structures and biological activities. *J Nat Prod*, 22(3), 386-399.
- Chen, C., Qiang, S., Lou, L., Zhao, W. 2009. Cucurbitane-Type Triterpenoids from the Stems of *Cucumis melo*. . *J Nat Prod*, (72), 824–829.
- Choudhary, K., Singh, M., Pillai, U. 2008. Ethnobotanical Survey of Rajasthan - An Update. *Am-Euras J Bot*, 1 (2), 38-45, 2008. 1 (2): 38-45.
- Coronado, A. (2012). Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad Contra *Mycobacterium tuberculosis* Cepa H37Rv del Extracto Diclorometánico de *Ambrosia confertiflora* y *Ambrosia ambrosioides*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, 100(2005), 72–79.
- Curtin, J.F., Candolfi, M., Xiong, W., Lowenstein, P.R., Castro, M.G. 2008. Turning the gene tap off; implications of regulating gene expression for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 7(3), 439–448.
- Dave, B., Mittal, V., Tan, N.M., Chang, J.C. 2012. Epithelial–mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res*, 14(1), 202.
- Duangmano, S., Sae-lim P., Suksamrarn A., Domann F.E., Patmasiriwat P. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation. *BMC Complement Altern Med*, 12, 185.
- Figuroa-Hernández, J.L., González, G., Ascencio, V.J., Figuroa-Espitia, J.L., Fernández, G. 2005. 77 Plant Products with Anti-cancer Properties Employed in the Treatment of Bowel Cancer: Literature Review 1985 and 2004. *Proc West Pharmacol Soc*, 48 77-83.
- Fonnegra, R., Jiménez S.L. 2007. Plantas Medicinales Aprobadas em Colombia. Editorial Universal de Antioquia. 2ª Edición. Medellín Colombia. P. xii

- Frei, B., Baltisberger, M., Sticher, O, Heinrich, M. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigeno ususes. *J Ethnopharmacol*, 62, 149–165.
- Galbis, A. 2000. Panorama actual de la química farmacéutica. Secretaria de publicaciones de la universidad de Sevilla. España. P. 356.
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weiman, C., Sticher, O. 1998. Medicinal plants in mexico: healers' consensus and cultural importance. *Soc Sci Med*, 47(11), 1859-1871.
- Hernández, E., Calzada, F., Roman, R., Alarcón F.J. 2007. Monoglycerides and Fatty acids from *Ibervillea sonora* Root: Isolation and Hypoglycemic Activity. *Planta Med*, 73 (3): 236-240.
- Hurst, D.R., Welch, D.R. 2011. Metastasis Suppressor Genes: At the Interface Between the Environment and Tumor Cell Growth. *Int Rev Cell Mol Biol*, 286, 107–180.
- INEGI. 2013. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../2013/cancer0.do.
- Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from Cucurbita andreana. *Cancer Lett*, 189, 11–16.
- Jiang, W., Peng, Zhang, J., William, C.S., Jin, K. 2012. The Implications of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 13: 16636-16657.
- Jiménez, M., Velázquez, C., Garibay, A., Sierras, D., Lapizco, R., Ortiz, C., Burgos, A., Robles, R.E. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complement Altern Med*, 13:(12), 1-12.
- Joyce, M., Samundeeswari, A., Deepa P. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review, *Research in Plant Biology*, 1(3), 01-14.
- Korolkavas A., Burckhalter J. (1983). Compendio Esencial de Química Farmacéutica. Editorial Reverté. España. P. 53.

- Li, X., Lewis, M., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C., Wu, M., Hilsbeck, S., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G., Wong, H, Rosen, J. Chang, J. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 100(9), 672-679.
- López E. R. e Hinojosa G.A. 1988. Catálogo de Plantas Medicinales Sonorenses. 1ª Edición. Editorial UniSon. México. Pp. 4.
- Maloney, K.N., Fujita, M., Eggert, U.S., Schroeder F.C., Field C.M., Mitchison T.J., Clardy J. Actin-Aggregating Cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*. *J Nat Prod*, 71: 1927-1929.
- Mans, D.R., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*, 5: 185–198.
- Marcotullio, M.C., Messina, F., Curini, M., Macchiarulo A., Cellanetti M., Ricci D., Giamperi L., Bucchini A., Minelli A., Mierla A.L., Bellezza I. 2011. Protective Effects of *Commiphora erythraea* Resin Constituents Against Cellular Oxidative Damage. *Molecules*, 16(12), 10357-10369.
- Martínez A.T., Ramírez M.G., Piña A.B. 2011. Wereke: Un tratamiento natural para la Diabetes. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. D.F., México.
- McClatcheya, W.C., Mahadyb, G.B., Bennette B.C., Shielsa L., Savod,V. 2009. Ethnobotany as a Pharmacological Research Tool and Recent Developments in CNS-active Natural Products from Ethnobotanical Sources. *Pharmacol Ther*, 123(2), 239–254.
- Milane, L., Genesh, S., Shah, S., Duan, Z.F., Amiji, M. 2011. Multi-Modal Strategies for Overcoming Tumor Drug Resistance: Hypoxia, Warburg's Effect, Stem Cells, and Multifunctional Nanotechnology. *J Control Release*, 155(2), 237–247.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63.

- Navindra P., Lynn S.A., Hardy M.L., Heber D. 2004. Total Cranberry Extract versus its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines. *J Agric Food Chem*, (52), 2512-2517.
- NCI. 2006. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. What You Need to Know About Cancer, Risk Factor. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/cancer/page3>.
- OMS. 2013. Organización Mundial de la Salud. Cáncer, Nota descriptiva N°297 (2013). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- Osuna, T., Tapia M.E., Aguilar A.. 2005. Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana Para Tratar Afecciones Gastrointestinales, Estudio Etnobotánico, Fitoquímico y Farmacológico. Editorial Universidad Barcelona. España. P. 17.
- Panickar, K.S. 2013. Beneficial effects of herbs, spices and medicinal plants on the metabolic syndrome, brain and cognitive function. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 13(1):13-29.
- Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne B., Miele L. 2010. Targeting Cancer Stem Cells through Notch Signaling. *Clin Cancer Resch*, 16(12): 3141–3152.
- Paredes, A., Blanco, J., Echenique-Elizondo, E. 2006. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. Facultad de Medicina. *Oncología (Barc.)*, 79(4), 202-14.
- Rodriguez, N., Vasquez, Y., Hussein, A.A. Coley, P.D., Solis P.N., Gupta M.P. (2003). Cytotoxic Cucurbitacin Constituents from *Sloanea zuliaensis*. *J Nat Prod*, 66:1515-1516.
- Sandal, T. 2002. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *Oncologist*, 7(1), 73-81.
- Scheepers, J.C., Malan, S.F., Du, Preez J.L., Van, Dyk S. 2011. The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of ultraviolet (UV) irradiated

- chlorophyll *a* and secondary plant compounds. *Afr J Biotechnol*, 10(74): 16976-16985.
- Sörensen, P.M, Iacob, R.E., Fritzsche, M, Engen, J.R., Briehar, W.M., Charras, G., Eggert, U.S. 2012. The Natural Product Cucurbitacin E Inhibits Depolymerization of Actin. *ACS Chem Biol*, 7(9), 1502-8
- Sun, J, Blaskovich, M.A., Jove, R., Livingston, S.K., Coppola, D., Sebti, S.M. 2005. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity, *Oncogene*, 24, 3236-3245.
- Tannin-Spitz, T., Grossman, S., Dovrat, S., Gottlieb, H.E., Bergman, M. 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 73, 56–67.
- Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C.S., Sullivan D.R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh J.B., Clifton P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., Inge, K.E. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med J Aus*, 185(4).
- Torres, M. 2011. Evaluación de la Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico y sus Fracciones (Hexano, Acetato de Etilo, Etanol y Residual) de *Ibervillea sonorae* en las líneas celulares RAW 264.7, HeLa y M12^{AK}.C3F6. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Valerio, L.G., Gonzales, G.F. 2005. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol Rev*, 24(1), 11-35.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, A., Robles, R., Robles-Zepeda, R.E., Lugo, E., Goycoolea, F.M., Velázquez, E. F., Astiazaran, H., Hernández, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Applied Microbiology*, 103, 1747-1756.
- Zapata, M.B., Durán C., Stashenko, E.E., Correa, J., Betancur, L. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Salud UIS*, 41(3), 215-222.

ANEXO 1

Tipos de fases móviles y volúmenes eluidos de cada fase en la cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo disminuido en clorofilas.

Mezcla de Solventes	Volumen Eluido en mL
Hex	300
Hex/EtOAc (8:2)	300
Hex/EtOAc (6:4)	300
Hex/EtOAc (4:6)	300
Hex/EtOAc (2:8)	300
EtOAc	300
EtOAc/MetOH (8:2)	600
EtOAc/MetOH (6:4)	750
EtOAc/MetOH (4:6)	450
EtOAc/MetOH (2:8)	450
MetOH	900

Hex: Hexano, **EtOAc:** Acetato de Etilo, **MetOH:** Metanol

ANEXO 2

Metodología Seguida en el Análisis de las Fracciones 4 y 6 del Extracto de Acetato de Etilo Disminuido en Clorofilas.

En forma inicial las fracciones E-EA₂ 5 y 6 se analizaron por medio de ¹H RMN 400 MHz y JMOD.

La identificación de la mezcla de ácidos grasos se realizó en un equipo HRGC-HRMS Dani 1000 equipado con un detector de flama (FDA) y con una columna capilar CP-Select CB de 50 m d largo por 0.25mm de diámetro interno con un espesor de 25 µm.

La temperatura del inyector y del detector se encontraba a 250°C. En el horno la temperatura inicial fue de 180°C y se mantuvo por 6 minutos. Posteriormente la temperatura se incrementó 3°C por minuto hasta alcanzar los 225°C. La temperatura final se mantuvo por 10 minutos.

Antes del análisis, las muestras se hicieron reaccionar con diazometano (CH₂N₂). Para ello primero se disolvieron 29 mg de E-EA₂5 y 16 mg de E-EA6 en éter dietílico (Et₂O), consecutivamente se mezclaron 10 mL de las fracciones ya solubilizadas con 2 mL de CH₂N₂ y se analizaron por HRGC-HRMS.

ANEXO 3

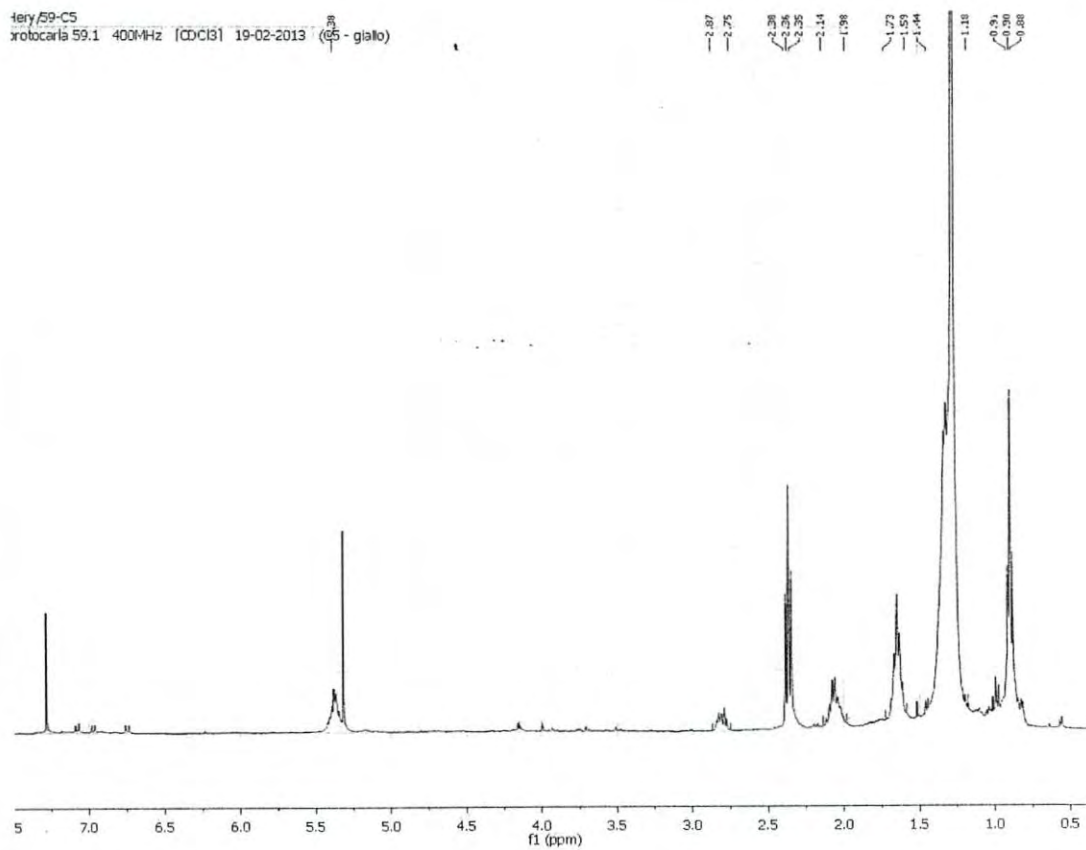
Tipos de fases móviles y volúmenes eluidos de cada fase en la cromatografía en columna del extracto de la Fracción A.

Mezcla de Solventes	Volumen Eluido en mL
Hex	100
DCM/MetOH (99:5)	50
DCM/MetOH (95:5)	50
DCM/MetOH (97:3)	50

DCM: Diclorometano, **MetOH:** Metanol

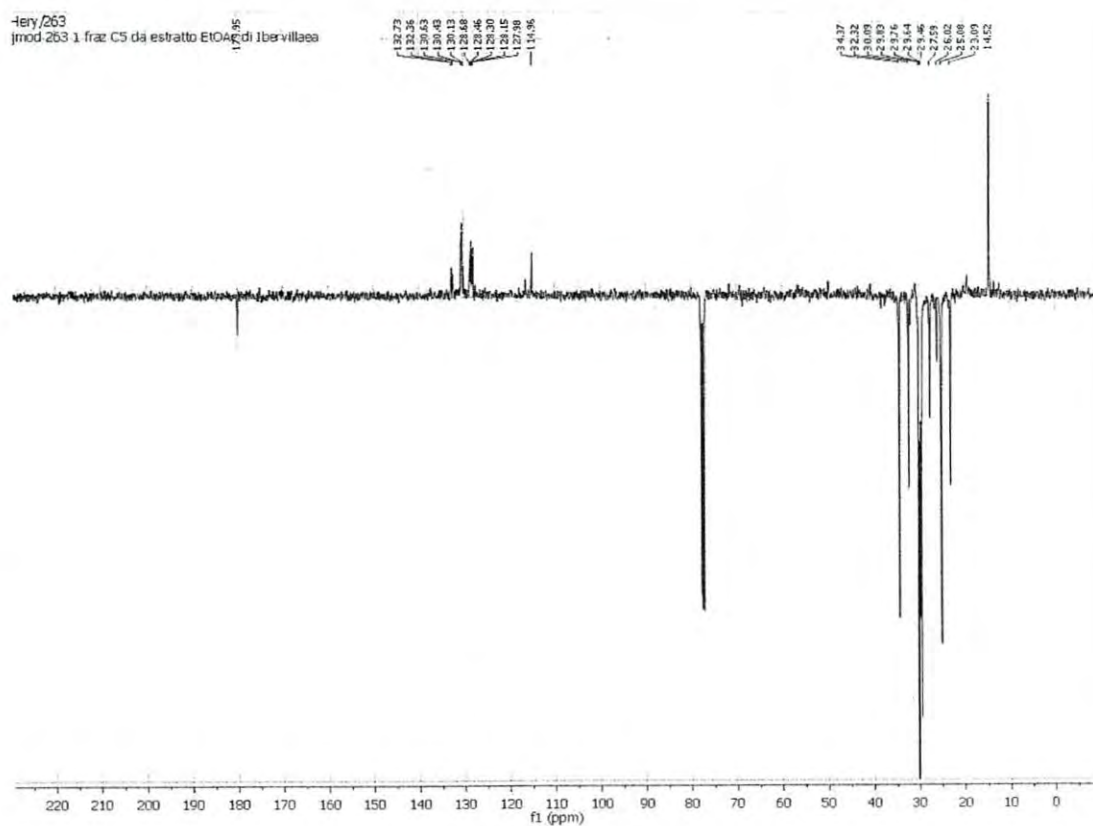
ANEXO 4

Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) de la Fracción 5 del Extracto Disminuido en Clorofilas.



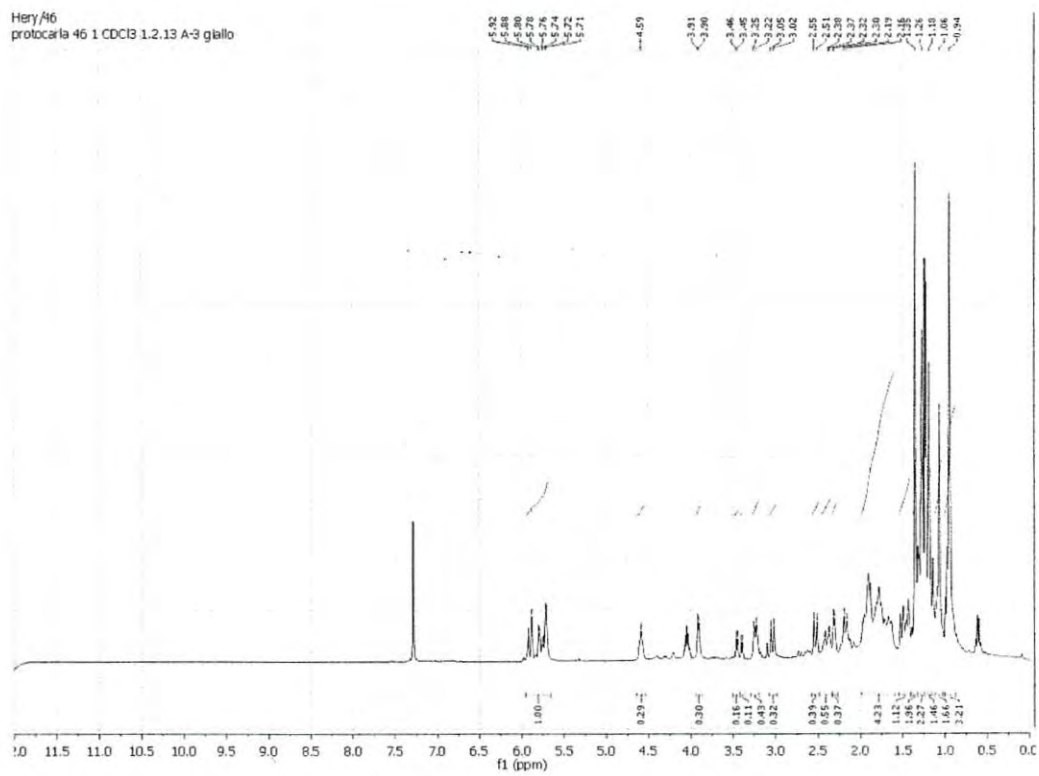
ANEXO 5

Espectro de Modulación en J (Jmod) (CDC₃, 263MHz) de la Fracción 5 del Extracto Disminuido en Clorofilas.



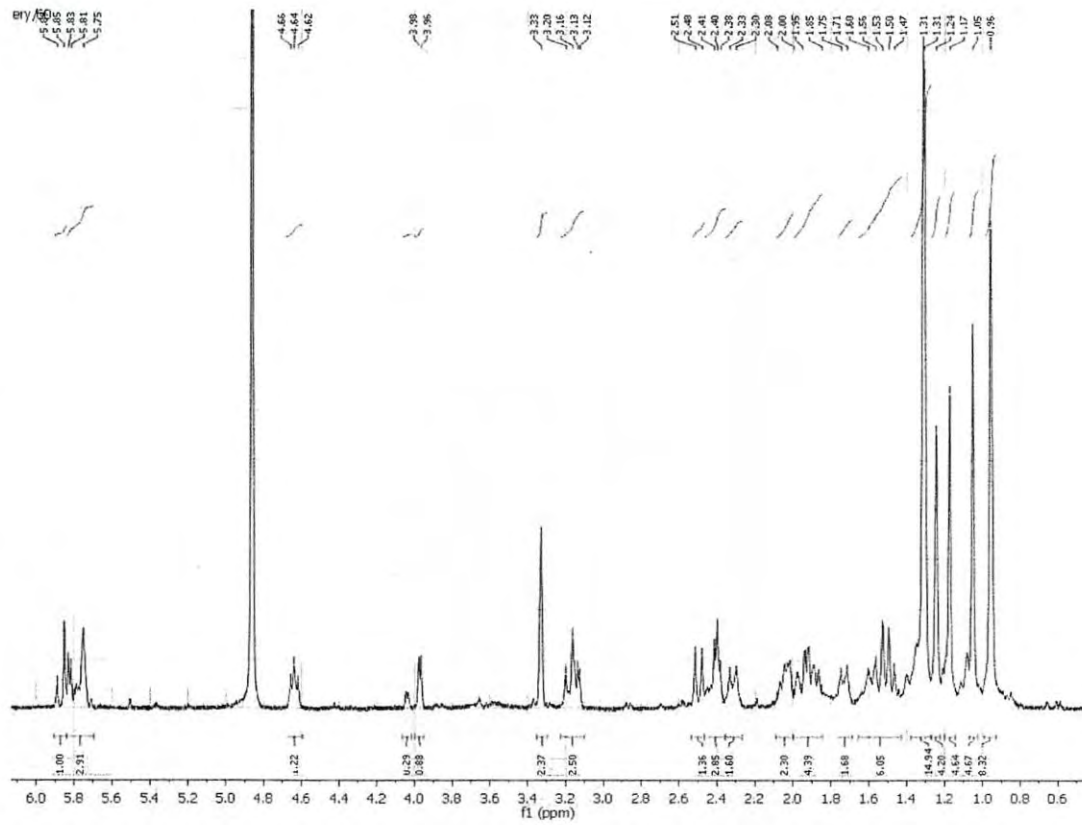
ANEXO 6

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-NMR}$) (CDCl_3 , 400 MHz) de la Fracción 21 del Extracto Disminuido en Clorofilas.



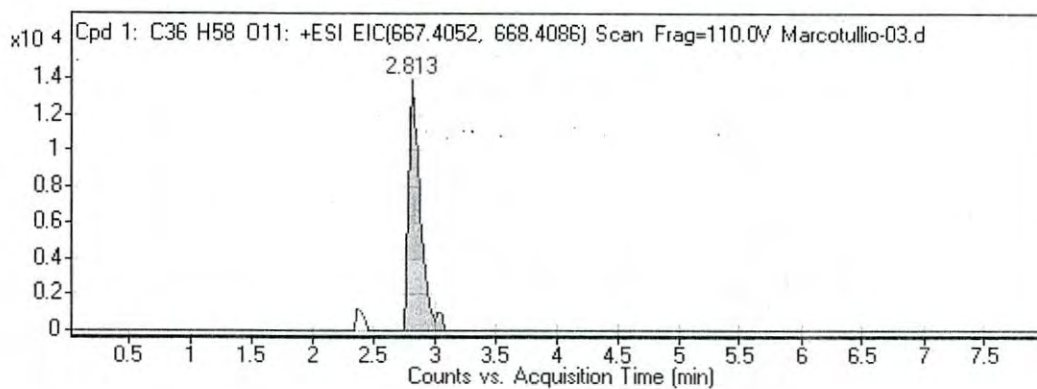
ANEXO 7

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-NMR}$) (CDCl_3 , 400 MHz) de la Fracción 22 del Extracto Disminuido en Clorofilas.



ANEXO 8

Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas de la Fracción EA- 28.



b)

