

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Terra ubérrima, mens aperta

Bou Lo-tama, chí jí jú

Campus Tuxtepec

Estudio químico de la especie *Tradescantia pallida*, y la
evaluación de su actividad antiproliferativa en la línea
celular de cáncer de mama MCF-7

TESIS

Para obtener el título de

Licenciada en Ciencias Químicas

Presenta:

Cecilia Isabel Mayo Montor

Dr. Lemuel Pérez Picaso
Director

Dr. Alejandro Cabrera Wrooman
Co-director

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2019.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca a 1 de marzo de 2019
ASUNTO: Designación de sinodales

CECILIA ISABEL MAYO MONTOR
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTE

Por este medio le informo la propuesta de la jefatura de carrera de los Profesores-Investigadores que fungirán como revisores en su examen para obtener el Título de Licenciado en Ciencias Químicas.

Dr. Omar Viñas Bravos	UNPA	Presidente
Dr. Miguel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	Vocal
Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín	UNPA	1 ^{er} Suplente
Dra. Roxana Martínez Pascual	UNPA	2 ^o Suplente

Sin más por el momento, le envío cordiales saludos.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
B'ou Lo-tama, chí jí jú



R.M.P.
Dra. Roxana Martínez Pascual
Jefa de Carrera
Licenciatura en Ciencias Químicas

H. López
M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Lemuel Pérez Picaso –Director de Tesis
C.c.p. Yesenia Barrientos Arenal –Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo de la jefatura



www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Calle Circuito Central, No.200, col. Parque Industrial
C.P. 68301 Tuxtepec, Oax. Tel: 01 (981) 87 5 97 40

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril s/n, Cd. Universitaria
C.P. 68400 Loma Bonita, Oax. Tel: 01 (981) 87 2 22 39



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. a 1 de marzo de 2019

Asunto: Autorización de impresión de tesis

M. E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
P R E S E N T E

Sirva la presente para informarle que los abajo firmantes, miembros de la comisión revisora de la tesis presentada por la Srta. Cecilia Isabel Mayo Montor (Matrícula 13060227) pasante de la Licenciatura en Ciencias Químicas, manifestamos que después de examinar su trabajo de tesis autorizamos la impresión del manuscrito que lleva por título "Estudio químico de la especie *Tradescantia pallida*, y la evaluación de su actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de mama MCF-7" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante. El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso y la Co-dirección del Dr. Alejandro Cabrera Wrooman.

Sin otro asunto en particular le agradecemos la atención a la presente.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta

Be Lo-tama, chi ji ju




Dr. Omar Viñas Bravo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan



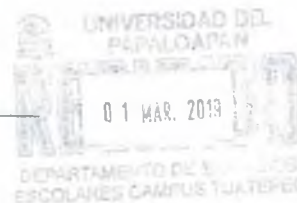
Dr. Miguel Angel Peña Rico
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan



Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquín
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan



Dr. Lemuel Pérez Picaso
Profesor Investigador
Director de Tesis



C.c.p. M. en C. Héctor López Arjona, Vice-Rector Académico de la UNPA, para su conocimiento.
C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual, Jefa de Carreras de la Licenciatura en Ciencias Químicas.

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec:
Calle Circuito Central, No.200, col. Parque Industrial
C.P. 68101 Tuxtepec, Oax. Tel. 01 (987) 87 5 02 10

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril s/n, Cd. Universitaria
C.P. 68100 Loma Bonita, Oax. Tel. 01 (981) 97 2 22 20

Las actividades de este proyecto se desarrollaron en el Laboratorio de Química Orgánica, Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología y Taller de Alimentos, en las instalaciones de la Universidad del Papaloapan (Campus Tuxtepec), bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso (Universidad del Papaloapan) y la co-dirección del Dr. Alejandro Cabrera Wrooman (Instituto Nacional de Rehabilitación).

Se agradece:

Al Dr. Miguel Ángel Peña Rico por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas de viabilidad celular, llevadas a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad del Papaloapan.

Al Dr. Emanuel Hernández Núñez y a la Dra. Gloria I. Hernández Bolio por su apoyo en la obtención de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, llevados a cabo en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del CINVESTAV-Unidad Mérida.

Al Dr. Adolfo López Torres por su apoyo en la obtención de los espectros de Espectrometría de Masas, realizados en el laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad del Papaloapan.

Al LINAN-UNPA (INFRA-2015-01-252013) por los servicios prestados, y al CONACYT por la beca otorgada **(27543)** a través del proyecto CB-2015/258587.

Se agradece a los miembros del comité revisor:

Dr. Omar Viñas Bravo

Dr. Miguel Ángel Peña Rico

Dr. Lemuel Pérez Picaso

Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Dra. Roxana Martínez Pascual

Por los consejos brindados durante la realización de este proyecto de investigación, y su valiosa contribución en pos de enriquecer la redacción de este documento.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma máter, la Universidad del Papaloapan, por todo lo que esta institución representa en mi crecimiento académico y también personal.

Al Dr. Lemuel Pérez Picaso, por haberme aceptado en su grupo de trabajo desde mis primeros semestres, por sus consejos siempre acertados, su compromiso con mi aprendizaje y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. Miguel Ángel Peña Rico, por su siempre buena disposición para enseñarme a realizar los ensayos biológicos del proyecto, y darme ánimos cuando los resultados no eran los esperados.

Al Dr. Alejandro Cabrera Wrooman, por sus valiosas aportaciones y el tiempo invertido en la revisión de este documento.

De forma especial, a mis profesores: Dr. Omar Viñas Bravo, Dra. Leticia G. Navarro Moreno, Dr. Erick A. Juárez Arellano, Dr. Guillermo Ramírez Galicia, Dr. Adolfo López Torres, Dr. Oscar A. Ramírez Marroquín, Dr. Jorge C. Conde Acevedo. Gracias por cultivar en nosotros día con día la curiosidad por la ciencia, no concibo la LCQ sin ustedes y todos los catedráticos que permiten que nuestra carrera crezca diariamente, mi más sincero respeto y admiración.

A mis cariñosas tías: Estela y Caty, a mis tíos favoritos: Paco, Marco Antonio, Miguel Ángel, y a mis padrinos, Verónica y Omar... aunque no es posible verlos seguido, siempre los llevo en mi pensamiento, gracias por sus palabras de aliento y su cariño incondicional.

A mis hermanos, Mocos #1 y Mocos #2 (Adri y Enrique), simplemente no sé cómo hubiese podido superar el estrés de la universidad sin ustedes y las carcajadas en la sobremesa de los sábados. Siempre serán mi complemento, y yo el suyo, los amo mucho.

A Sari, mi hermanita de otra mamá, te agradezco infinitamente por brindarme tu cariño y tu amistad a lo largo de los últimos 11 años, por compartir conmigo esta gama de matices que implica el crecer, en las buenas, las malas y las peores.

A Bran, por regalarme siempre una sonrisa y hacer mis lunes menos lunes, aunque eso significara madrugar. Citándote: gracias por atravesar conmigo esta odisea estudiantil.

No hay que llegar primero, pero hay que saber llegar; a mis amigos, los que han estado desde el inicio: Joaquín y Haggeo. Los que se nos unieron en el camino: Shardy, Erick, Zury, Lipe. Gracias por todos los buenos momentos, #kwzkis!. Tienen un lugar muy especial en mi corazón. ♥

A mis compañeros de laboratorio, Yure, Bren, Abi, Sam, y especialmente Yuno, que compartió conmigo las mieles y también los tropiezos propios del área de Productos Naturales, gracias por brindarme tus consejos de hermana académica mayor y no enojarte cuando tu material aparecía en mi mesa :p (I hope).

Por último, pero no menos importante, a mis profesores y compañeros de las estancias profesionales:

A la Dra. A. Berenice Aguilar Guadarrama del CIQ-UAEM por aceptarme en su equipo de trabajo. A Itiel, Mónica, Diana y Bere, por compartir sus conocimientos conmigo; al Dr. Emanuel Hernández Núñez y a la Dra. Gloria I. Hernández Bolio del CINVESTAV-Mérida, por sus enseñanzas sobre RMN. Y también, gracias a Marco, por ser paciente y ayudarme cuando Libni hacía de las suyas.

¡Gracias a todos!

Me faltan personas, pero tendría que escribir otra tesis.

Continuará...

DEDICATORIA

Abuelita (a mi versión de 15 años): ¿Será que Dios me dé la vida y la salud para verte graduada?

Yo (de 23 años): Chila, ¡lo hicimos!

Dedico con todo mi corazón este logro a mis pilares indoblegables, mi mamá Isa y mi abuelita Ceci; gracias por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo, la vida, y el amor, que Dios me las continúe prestando muchísimos años más.

Las amo.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ESQUEMAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Medicina tradicional y química de productos naturales	1
1.2 Epidemiología del cáncer	1
1.3 Tratamientos contra el cáncer	2
1.4 Péptidos aislados a partir de <i>B. thuringiensis</i> con actividad antiproliferativa.....	3
2 ANTECEDENTES	5
2.1 Familia Commelinaceae.....	5
2.2 Género <i>Tradescantia</i>	5
2.2.1 Actividades biológicas del extracto etanólico de <i>Tradescantia spathacea</i>	5
2.2.2 Fitoquímicos de <i>Tradescantia albiflora</i> con actividad hipouricémica.....	6
2.2.3 Fitoquímicos de <i>Tradescantia spathacea</i> con actividad antiviral <i>in vitro</i>	8
2.2.4 Fitoquímicos de <i>Tradescantia spathacea</i> con actividad inhibitoria de la enzima tirosina fosfatasa (PTP1B)	10
2.2.5 Fitoquímicos de <i>Tradescantia zebrina</i> con actividad antineoplásica.....	12
2.3 Especie <i>Tradescantia pallida</i>	13
2.4 Parasporinas: proteínas con actividad antiproliferativa	14
3 MARCO TEÓRICO.....	15
3.1 Química de productos naturales	15
3.2 Técnicas de extracción	15
3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	15
3.3 Técnicas de separación.....	16
3.3.1 Cromatografía en columna (CC)	16
3.3.2 Cromatografía en capa fina (TLC)	16
3.4 Caracterización estructural	17
3.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	17
3.4.2 Espectrometría de masas (MS).....	21
3.5 Evaluación de la actividad antiproliferativa	23
3.5.1 Ensayo de MTT.....	23
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5 JUSTIFICACIÓN	24
6 HIPÓTESIS	25
7 OBJETIVOS	25
7.1 Objetivo general.....	25

7.2	Objetivos específicos	25
8	METODOLOGÍA	26
8.1	Recolección y secado del material vegetal	26
8.2	Obtención de los extractos	26
8.3	Perfil fitoquímico preliminar de los extractos	26
8.4	Análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC	26
8.5	Evaluación preliminar de la actividad citotóxica de los extractos	27
8.6	Separación cromatográfica del extracto MeOH 2 (C1)	28
8.7	Evaluación de la actividad citotóxica de las sub-fracciones del extracto MeOH 2.....	28
8.7.1	Ensayo preliminar	28
8.7.2	Ensayo por duplicado.....	29
8.8	Separaciones cromatográficas de la sub-fracción EM2-4 (C2 y C3).....	29
8.9	Separación mediante cromatografía en placa preparativa (CP)	30
8.10	Caracterización estructural.....	30
8.10.1	Análisis mediante resonancia magnética nuclear	30
8.10.2	Análisis mediante espectrometría de masas	30
8.11	Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas.....	31
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
9.1	Recolección y secado del material vegetal	32
9.2	Obtención de los extractos	32
9.3	Perfil fitoquímico preliminar.....	33
9.4	Análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC	35
9.5	Evaluación preliminar de la actividad citotóxica.....	39
9.6	Separación cromatográfica del extracto MeOH 2 (C1)	41
9.7	Evaluación de la actividad citotóxica de las sub-fracciones del MeOH 2	43
9.8	Separación cromatográfica de la sub-fracción EM2-4.....	45
9.9	Separación mediante cromatografía en placa preparativa (CP)	47
9.10	Caracterización estructural.....	48
9.10.1	Resonancia magnética nuclear	48
9.10.2	Espectrometría de masas	59
9.11	Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas.....	61
10	CONCLUSIONES	63
11	Bibliografía.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos provenientes de productos naturales utilizados en el tratamiento contra el cáncer.	2
Figura 2. Metabolitos secundarios utilizados en la terapia contra el cáncer.....	3
Figura 3. <i>Tradescantia spathacea</i>	5
Figura 4. Metabolitos secundarios aislados a partir del extracto de acetato de etilo de <i>T. albiflora</i>	8
Figura 5. Flavonoides identificados a partir del extracto metanólico de las hojas de <i>T. spathacea</i>	10
Figura 6. Metabolitos secundarios aislados a partir del extracto de AcOEt/ <i>n</i> -BuOH de <i>T. spathacea</i>	12
Figura 7. <i>Tradescantia zebrina</i>	12
Figura 8. Fitoquímicos aislados a partir de <i>T. spathacea</i> con actividad antineoplásica.	13
Figura 9. <i>Tradescantia pallida</i>	13
Figura 10. Evaluación citotóxica preliminar de las parasporinas A34-2 y AX-2.....	14
Figura 11. Representación de una separación a través de CC.....	16
Figura 12. Representación de una separación por TLC	17
Figura 13. Desdoblamiento de los estados energéticos de espín nuclear de un átomo por efecto de un campo magnético externo.	18
Figura 14. Decaimiento de las señales en un espectro de difusión ordenada.	20
Figura 15. Análisis mediante MA-DOSY de los flavonoides 29, 44 y 45. a) espectro obtenido antes de la adición de SDS. b) espectro obtenido después de la adición de SDS (80 mM)	21
Figura 16. Configuración general de un espectrómetro de masas de tipo ESI-Q-TOF.	22
Figura 17. Reducción metabólica del MTT a formazan.....	23
Figura 18. a) Secado del material vegetal. b) EAU.	32
Figura 19. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos.	34
Figura 20. Metabolitos secundarios identificados por TLC.....	36
Figura 21. Evaluación citotóxica preliminar de los extractos.	40
Figura 22. Reacción entre el revelador ninhidrina y un aminoácido genérico.	42
Figura 23. Resultados de la evaluación citotóxica de las sub-fracciones de MeOH 2.	44
Figura 24. Análisis de varianza de EM2-3.	44
Figura 25. a) CP revelada bajo radiación UV-365 nm. b) CP revelada con ninhidrina, Δ	48
Figura 26. RMN de ^1H (Presat) de la fracción C3-7.....	49
Figura 27. RMN de ^{13}C de la fracción C3-7.	49
Figura 28. Espectro de RMN de gCOSY de la fracción C3-7.	50
Figura 29. Espectro de RMN de gHSQC de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).	51
Figura 30. Espectro de RMN de gHSQC de la fracción C3-7 (zona aromática).	52
Figura 31. Espectro de gHMBC de la fracción C3-7.....	53
Figura 32. Espectro de RMN de DOSY-Oneshot de la muestra C3-7 (zona base de oxígeno).....	55
Figura 33. Espectro de ^1H de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).	56
Figura 34. Espectro de gHSQC de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).....	57

Figura 35. Espectro de ESI(-)-MS de la fracción C3-6 (ventana espectral: 100-200 Da).....	60
Figura 36. Espectro de ESI(-)-MS de la fracción C3-7 (ventana espectral: 100-200 Da).....	61
Figura 37. Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Usos de algunas especies del género <i>Tradescantia</i> en la medicina tradicional.	5
Tabla 2. Actividad antibacteriana de <i>T. pallida</i>	14
Tabla 3. Densidad celular utilizada en la evaluación preliminar de la actividad citotóxica.	27
Tabla 4. Resumen del procedimiento de EAU.	33
Tabla 5. Resumen de las pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos.	33
Tabla 6. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (1).	36
Tabla 7. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (2).	38
Tabla 8. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (3).	39
Tabla 9. Perfil cromatográfico mediante TLC de las fracciones de C1.	42
Tabla 10. Reunión de las fracciones de C1 en función de la similitud cromatográfica (Ninhidrina, Δ).	43
Tabla 11. Perfil cromatográfico mediante TLC de las fracciones obtenidas de C3.	46
Tabla 12. Resumen de la separación cromatográfica C3.	47
Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN para la molécula de L-fenilalanina.	54
Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN para la molécula de L-arabinitol.	58
Tabla 15. Iones observados mediante ESI-(+) en las muestras representativas (> 20% abundancia relativa). .	59
Tabla 16. Iones observados mediante ESI-(-) en las muestras representativas (> 20% abundancia relativa). .	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimiento de aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de AcOEt de las hojas de <i>T. albiflora</i>	7
Esquema 2. Procedimiento de separación e identificación estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de <i>T. spathacea</i>	9
Esquema 3. Procedimiento de aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de AcOEt/ <i>n</i> -BuOH de <i>T. spathacea</i>	11
Esquema 4. Evaluación preliminar de la actividad citotóxica.....	39
Esquema 5. Procedimiento de la separación cromatográfica C1.....	41
Esquema 6. Procedimiento de las separaciones cromatográficas C2 y C3.....	45
Esquema 7. Procedimiento de la separación mediante CP.....	47

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en columna flash
CD₃OD	Metanol deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CP	Cromatografía en placa preparativa
D	Coeficiente de difusión traslacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSY	Espectroscopía de difusión ordenada (por sus siglas en inglés)
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (por sus siglas en inglés)
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electronebulización (por sus siglas en inglés)
gCOSY	Espectroscopía de correlación por gradiente (por sus siglas en inglés)
gHMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares por gradiente (por sus siglas en inglés)
gHSQC	Coherencia heteronuclear cuántica única por gradiente (por sus siglas en inglés)
Hep-G2	Carcinoma hepatocelular
HPLC-ESI-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con ionización por electronebulización (por sus siglas en inglés)
m/z	Relación masa-carga
MCF-7	Fundación del cáncer de Michigan-7 (por sus siglas en inglés)
MOLT-4	Leucemia linfoblástica T aguda humana
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (por sus siglas en inglés)
ppm	Partes por millón
Q	Cuadrupolo sencillo (por su sigla en inglés)
R_f	Factor de retención (por sus siglas en inglés)
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
TLC	Cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés)
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
UV-Vis	Ultravioleta-visible

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades multicausales cuya prevalencia ha aumentado de forma considerable en los últimos años, posicionándolo como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Actualmente, en diferentes regiones de nuestro país se emplean tratamientos contra el cáncer basados en la medicina tradicional; el estudio científico de este conocimiento empírico cobra relevancia debido a que algunos de los fármacos anticancerígenos utilizados de forma comercial hoy en día han sido inspirados en moléculas bioactivas obtenidas de fuentes naturales. Es por ello que en este trabajo se llevó a cabo la evaluación de la actividad citotóxica de la especie *T. pallida* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, a través de un estudio biodirigido en el que se utilizó el ensayo de citotoxicidad MTT como criterio de selección. Mediante una prueba preliminar se determinó que una fracción del extracto metanólico presentó inhibición del crecimiento de la línea tumoral de hasta el 37.94% (1 mg/mL), después de realizar diferentes procesos de separación se logró asociar esta actividad a dos sub-fracciones de menor complejidad que el extracto original, cuya evaluación de la actividad citotóxica demostró que ambas sub-fracciones presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento celular entre 23.4 y 26.6% (1 mg/mL), este porcentaje se incrementó a ≈55% al duplicar la concentración (2 mg/mL). Como resultado de la caracterización estructural mediante RMN y MS (fracciones representativas de las separaciones cromatográficas de la sub-fracción MeOH 2), se lograron identificar a los metabolitos L-fenilalanina y L-arabinitol. Además, se evaluó la actividad sinérgica entre una de las sub-fracciones activas en combinación con dos parasporinas de *Bacillus thuringiensis* (proteínas con actividad anticancerígena), sin embargo, el efecto citotóxico observado no fue significativo.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Medicina tradicional y química de productos naturales

La biodiversidad de México es reconocida a nivel mundial, ya que se encuentra situada entre los primeros cinco países llamados megadiversos. Las diferencias geográficas y climáticas del país, han favorecido el desarrollo de una gran cantidad de especies, tanto animales como vegetales, que en conjunto representan aproximadamente el 12% de la diversidad biológica global.¹ A su vez, las diversas culturas indígenas de México han aprendido a emplear la biodiversidad que les rodea en su beneficio, así es como estas comunidades han adquirido conocimiento de forma empírica para prevenir, tratar y curar enfermedades utilizando los recursos naturales que poseían de primera mano.² Este conocimiento ha sido transmitido de generación en generación, dando paso a lo que hoy se conoce como medicina tradicional, cuyo uso sigue vigente especialmente en las zonas donde el acceso al servicio de salud es limitado.³ Entre los padecimientos que son atendidos mediante la medicina tradicional en el estado de Oaxaca se encuentran: enfermedades dermatológicas (dermatitis, psoriasis, acné), enfermedades gastrointestinales (diarrea, disentería, cólicos, gastritis, náuseas y vómito), enfermedades del sistema esqueleto-muscular (reumatismo, artritis, fracturas), además de la diabetes y el cáncer;⁴ la preservación de este conocimiento empírico cobra relevancia debido a que la herbolaria representa un importante punto de partida para áreas de investigación como la química de productos naturales, ya que el estudio químico y farmacológico de las especies que son utilizadas con fines terapéuticos en la medicina tradicional, permite identificar los principios activos que les confieren su actividad biológica.⁵

1.2 Epidemiología del cáncer

Cáncer es el nombre que recibe un conjunto de enfermedades de origen multifactorial, cuya característica en común es la proliferación descontrolada de células anormales, que tienen la capacidad de invadir órganos sanos (metástasis).⁶ Esta patología es actualmente la segunda causa de muerte a nivel mundial, y la tercera a nivel nacional y estatal.^{7,8} En la población femenina en México, el tipo de neoplasia de mayor recurrencia es el cáncer de mama, con un 14.4% del total de tumores malignos diagnosticados para el género (6 304 casos en 2015),⁹ cuyos factores de riesgo comprenden la edad, mal uso de anticonceptivos orales, menopausia tardía, terapias hormonales, entre otros. Los principales tratamientos empleados contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia

y la quimioterapia; sin embargo su baja selectividad hacia las células cancerosas provoca que se presenten efectos secundarios, que conllevan a una disminución de la calidad de vida de los pacientes.^{10,11}

1.3 Tratamientos contra el cáncer

Dentro de las plantas pertenecientes al género *Tradescantia* utilizadas en el tratamiento del cáncer de forma tradicional, se encuentran las especies *T. spathacea* y *T. zebrina*,¹² el estudio de las especies de este género adquiere importancia debido a que muchos de los principios activos utilizados como tratamiento contra el cáncer han tenido su origen en algún tipo de producto natural (Figura 1), como es el caso del paclitaxel (**1**, *Taxus brevifolia* Nutt), la camptotecina (**2**, *Camptotheca acuminata*), y la vincristina (**3**, *Catharanthus roseus* G.).¹³

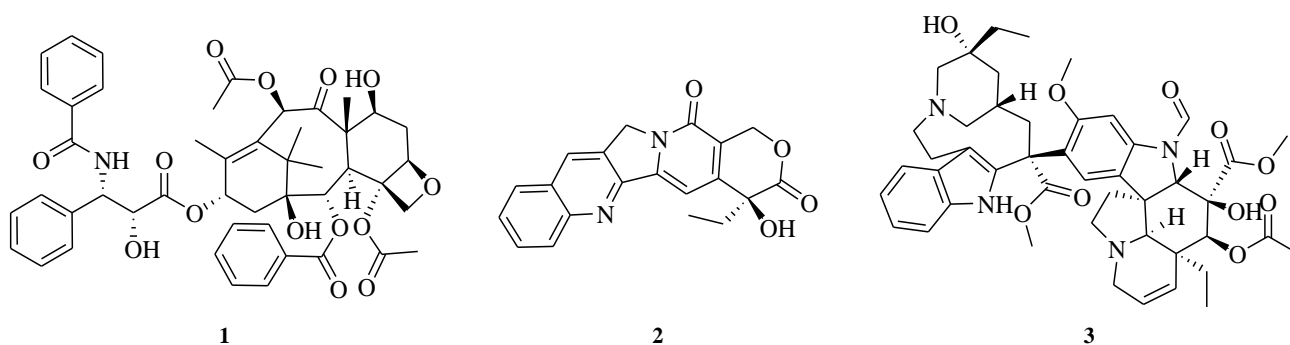


Figura 1. Fármacos provenientes de productos naturales utilizados en el tratamiento contra el cáncer.

Por su parte, la quimioterapia consiste en la administración de uno o varios principios activos que poseen la capacidad de inhibir la proliferación celular, las rutas de señalización, la angiogénesis, e incluso inducir la apoptosis.¹⁴ Los cambios genotípicos de las células cancerosas generalmente conducen a que adquieran resistencia a los fármacos comerciales, por lo que se ha optado por establecer terapias combinadas, aprovechando la actividad biológica que presentan moléculas provenientes de fuentes naturales, como su capacidad de actuar como quimiopreventivos y quimiosensibilizadores. Algunos ejemplos son: derivados fenólicos y flavonoides como la epigallocatequina-3-galato (**4**), el resveratrol (**5**), y la curcumina (**6**); alcaloides como la noscapina (**7**) y la oximatrina (**8**); esteroides y terpenoides como el lupeol (**9**) y el Δ^9 -tetrahydrocannabinol (**10**); quinonas como la timoquinona (**11**); y carotenoides como el α - y β -caroteno (**12**, **13**), entre otros (Figura 2).^{15,16}

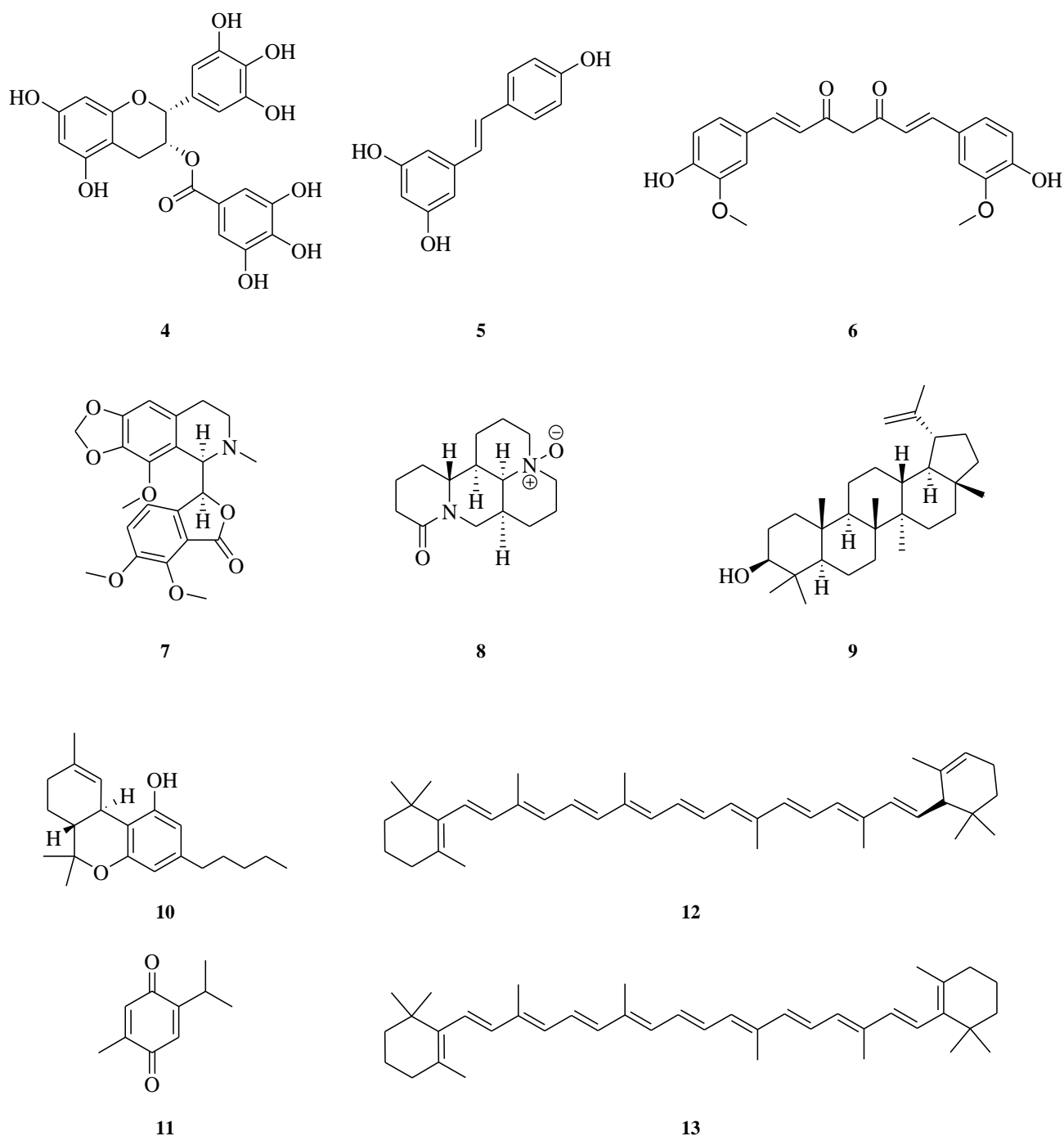


Figura 2. Metabolitos secundarios utilizados en la terapia contra el cáncer.

1.4 Péptidos aislados a partir de *B. thuringiensis* con actividad antiproliferativa

La cepa *Bacillus thuringiensis* es una especie bacteriana Gram positiva que tiene la capacidad de sintetizar inclusiones proteicas de naturaleza cristalina durante la etapa de esporulación, conocidas como proteínas Cry.¹⁷ Los fragmentos peptídicos obtenidos tras el tratamiento alcalino de los cristales son reconocidos por su importante actividad insecticida,¹⁸ y se emplean en la fabricación de bioinsecticidas para el control de plagas

como insectos y nematodos.¹⁹ Dentro de las proteínas Cry existe una subclasificación conocida como parasporinas, las cuales presentan actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares, como células de cáncer hepático (Hep-G2) y células leucémicas (MOLT-4), entre otras.¹⁷

Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos de acción de la actividad citotóxica de las parasporinas, sin embargo, se tienen indicios de que polipéptidos como la parasporina-2 tienen la capacidad de unirse de forma específica a la membrana plasmática de las células cancerígenas (Hep-G2) y así modificar la morfología del citoesqueleto y los organelos, induciendo la formación de poros en la membrana que conducen a un daño intracelular irreversible, y por consecuencia, a la muerte celular.²⁰

La importancia de estos nuevos agentes anticancerígenos reside en la especificidad de su efecto biológico, ya que se ha demostrado que tienen la capacidad de disminuir la proliferación de las células cancerígenas de forma selectiva, presentando un efecto menor sobre las células de tejido sano.²¹ Esta característica en particular amplía su rango de aplicación, ya que una de las desventajas de la terapia contra el cáncer son los efectos secundarios que se presentan debido a su baja selectividad.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento científico del género *Tradescantia* y de las especies vegetales que son utilizadas en la medicina tradicional de la región del Papaloapan, en este estudio se evaluó la actividad citotóxica de los extractos de la especie *T. pallida*, y también de las sub-fracciones del extracto activo. Además, se analizó la posible actividad sinérgica entre una de las sub-fracciones activas y dos proteínas producidas por la cepa bacteriana *B. thuringiensis* (parasporinas), las cuales son conocidas por su actividad anticancerígena contra diferentes líneas celulares de cáncer.

2 ANTECEDENTES

2.1 Familia Commelinaceae

Está formada por alrededor de 41 géneros y cerca de 650 especies, muchas de las cuales tienen aplicaciones etnobotánicas especialmente en Sudamérica.²² Algunas de las características que poseen las plantas de esta familia son: una vaina de hoja cerrada, una hoja suculenta y tres flores con pétalos y sépalos distintos.²³ Debido a la estética que exhiben estos ejemplares se utilizan con fines ornamentales, por otra parte, en el contexto farmacológico se ha demostrado que presentan propiedades antimicrobianas, antimicóticas y antioxidantes,²⁴ además de ser utilizadas de forma tradicional en el tratamiento de una amplia gama de padecimientos (Tabla 1).

Tabla 1. Usos de algunas especies del género *Tradescantia* en la medicina tradicional.

Especie	Aplicación
<i>T. zebrina</i>	Tratamiento de enfermedades gastrointestinales, auxiliar en el tratamiento de hiperglucemia. ^{25,26}
<i>T. spathacea</i>	Tratamiento de trastornos nerviosos, micosis, antimicrobiano, enfermedades venéreas y cáncer. ²⁷⁻²⁹
<i>T. pallida</i>	Curación de heridas y como agente antimicrobiano. ^{28,30}

2.2 Género *Tradescantia*

El género *Tradescantia* está compuesto por aproximadamente 70 especies, distribuidas principalmente entre los países del continente americano, del cual es originario.³¹ A continuación se describen trabajos que confirman las propiedades terapéuticas que presentan algunas especies de este género de forma tradicional, así como los estudios fitoquímicos y farmacológicos que se han realizado hasta el momento.

2.2.1 Actividades biológicas del extracto etanólico de *Tradescantia spathacea*



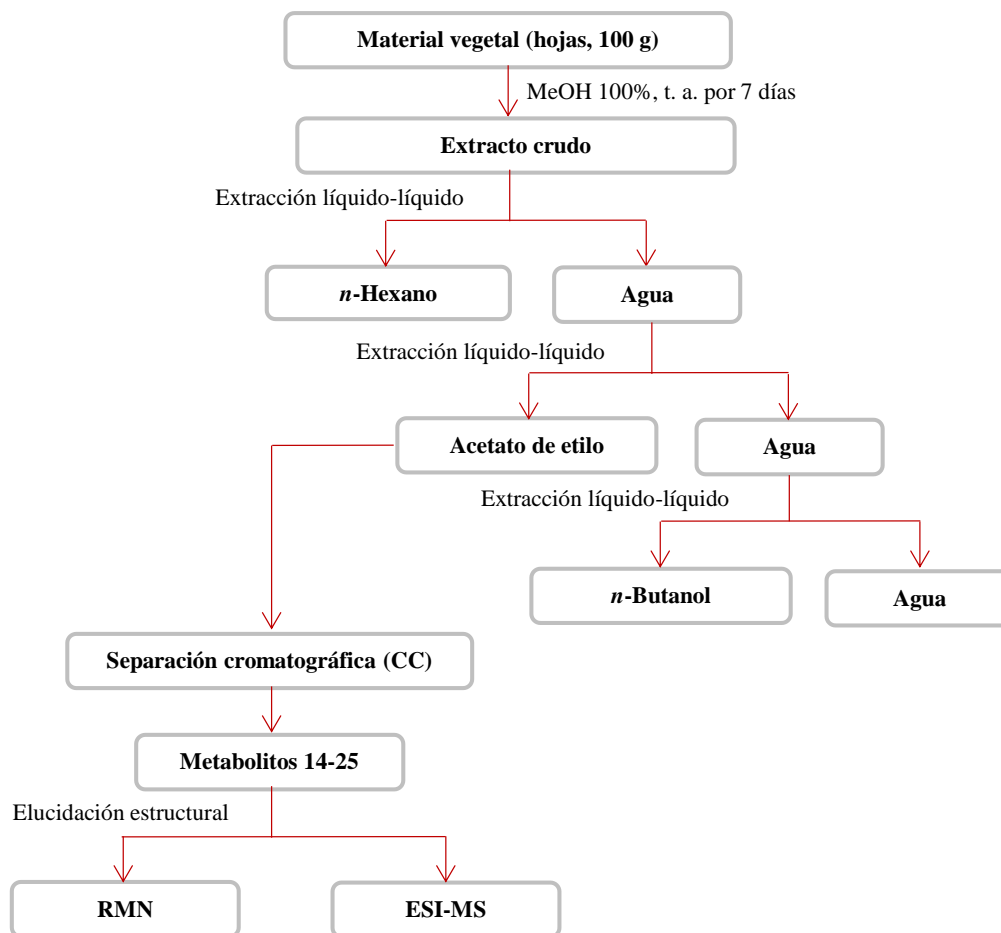
Figura 3. *Tradescantia spathacea*

La especie *T. spathacea* (Figura 3) también conocida como *Rhoeo discolor*, es una planta endémica de México; se utiliza en la medicina tradicional en forma de decocciones de sus hojas frescas para tratar infecciones venéreas, micosis y cáncer; dentro de las familias de metabolitos secundarios que han sido descritas para esta planta se encuentran: flavonoides, antocianinas, saponinas, carotenos, terpenos, esteroides y cumarinas.²⁷

Entre los trabajos enfocados en dilucidar las actividades biológicas de la especie *T. spathacea* destacan dos estudios realizados por González-Ávila y colaboradores. En el 2003 determinaron a través de pruebas *in vitro* la capacidad mutagénica (ensayo AMES), la actividad antioxidante (método del DPPH) y la actividad antigenotóxica (ensayo de síntesis no programada de ADN) del extracto etanólico de las hojas deshidratadas de *T. spathacea*.²⁷ Con ello se demostró que el extracto no fue mutagénico, por el contrario presentó actividad antimutagénica al evaluarlo mediante el mismo ensayo sobre células de *Salmonella typhimurium* (cepa TA102), las cuales fueron pretratadas con el agente mutagénico norfloxacino; dicho extracto tiene la capacidad de proteger células hepáticas contra las lesiones originadas por el agente genotóxico dietilnitrosamina, y además, presenta un efecto antioxidante similar al α -tocoferol y el ácido ascórbico, al ser evaluados a la misma concentración (100 $\mu\text{g/mL}$).²⁷ Por último, a través de un segundo estudio en 2011, se determinó que el extracto etanólico tiene la capacidad de reducir las mutaciones ocasionadas por agentes alquilantes como la *N*⁷-nitro-*N*-nitrosoguanidina y la etil-*N*⁷-nitro-*N*-nitrosoguanidina sobre diferentes cepas de *S. typhimurium* (ensayo Ames); sin embargo, no tuvo el mismo efecto al ser evaluado contra agentes intercalantes del ADN como los compuestos policíclicos aromáticos (aminoantraceno y aminofluoreno).³²

2.2.2 Fitoquímicos de *Tradescantia albiflora* con actividad hipouricémica

En el 2016, Wen-Ling y colaboradores, evaluaron la capacidad de los extractos de *n*-hexano, acetato de etilo (AcOEt), *n*-butanol (*n*-BuOH) y agua de las hojas de *T. albiflora*, para disminuir la actividad del ácido úrico en sangre.³³ En este trabajo se realizó una evaluación biológica, en donde se utilizaron ratas de la cepa Wistar a las que se les indujo hiperuricemia mediante la administración de oxonato de potasio, el cual es un inhibidor de la enzima uricasa. Como resultado, se observó que el extracto de AcOEt mostró la mejor actividad hipouricémica. Posteriormente, los metabolitos presentes fueron separados mediante cromatografía en columna (Esquema 1).



Esquema 1. Procedimiento de aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de AcOEt de las hojas de *T. albiflora*.

A partir de la fracción del extracto soluble en AcOEt se aislaron 12 compuestos (Figura 4): 1*H*-indol-3-carbaldehído (**14**), 2-fenilacetamida (**15**), tirosol (**16**), *p*-hidroxibenzaldehído (**17**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**18**), ácido protocatéquico (**19**), hidroxitirosol (**20**), 3,4-dihidroxibenzoato de metilo (**21**), 1-(3',4'-dihidroxifenil)-2-hidroxietanona (**22**), 4-(3',4'-dihidroxifenil)furan-2(5*H*)-ona (**23**), bracteanólido A (**24**) y bracteanólido B (**25**). La elucidación estructural de los metabolitos obtenidos se efectuó mediante el uso de espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS, por sus siglas en inglés) y resonancia magnética nuclear (RMN).³³

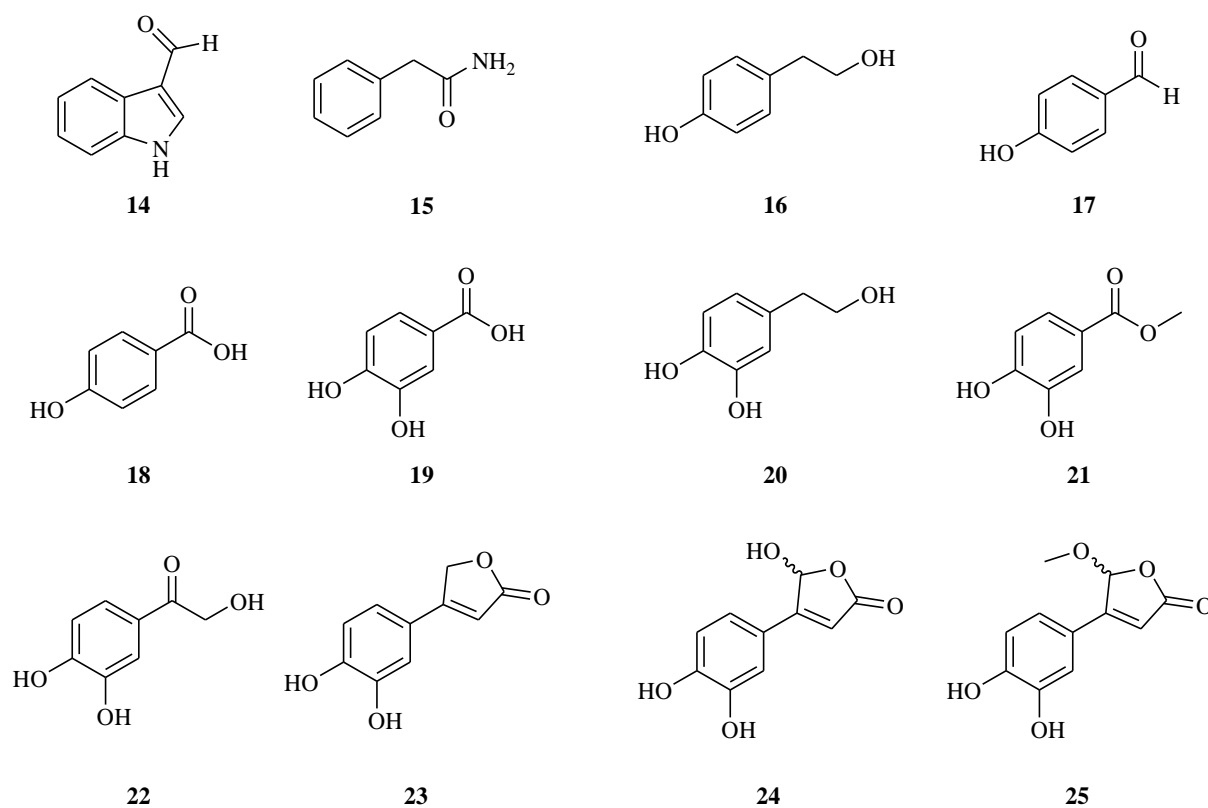
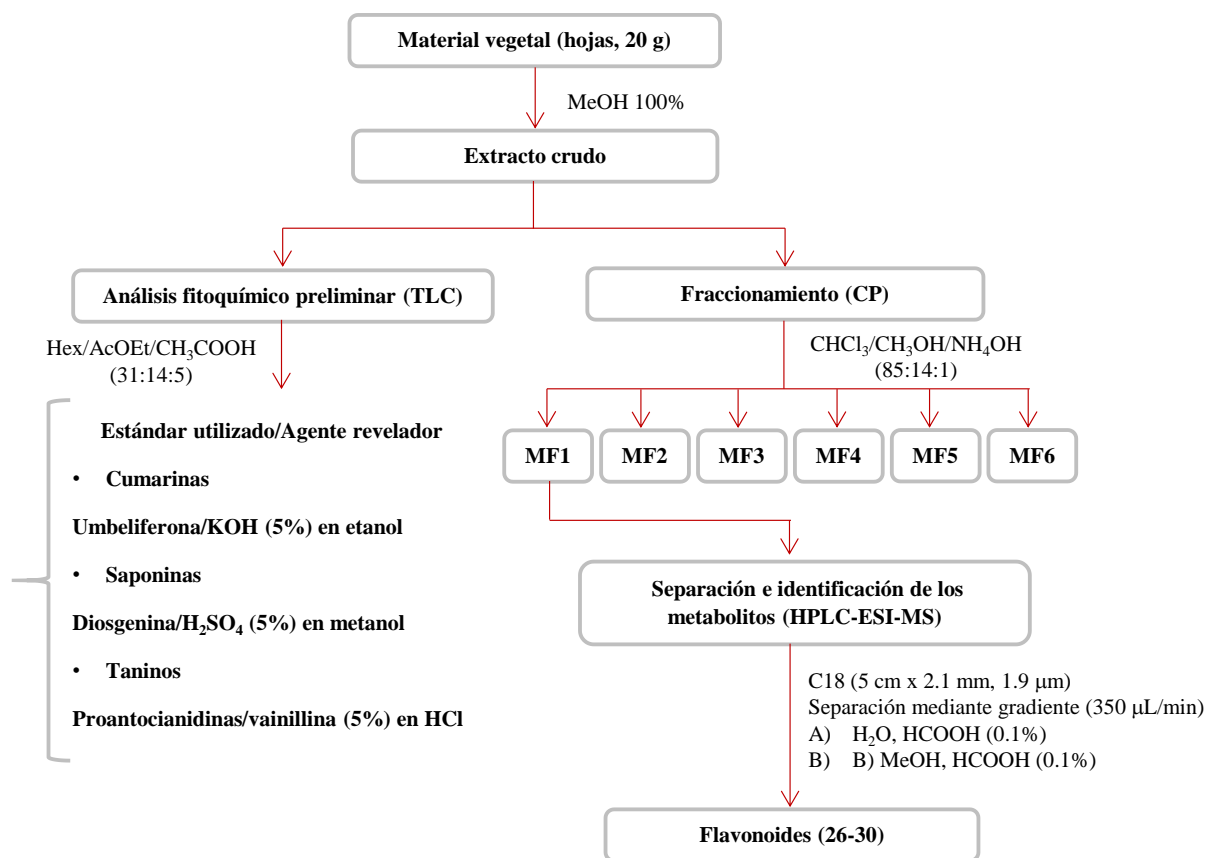


Figura 4. Metabolitos secundarios aislados a partir del extracto de acetato de etilo de *T. albiflora*.

Después de evaluar la actividad hipouricémica de los compuestos **14-25**, se determinó que todos ellos tienen la capacidad de inhibir a la enzima xantina oxidasa, siendo el compuesto **24** el más activo ($IC_{50}=76.4 \mu\text{g/mL}$).

2.2.3 Fitoquímicos de *Tradescantia spathacea* con actividad antiviral *in vitro*

Con el objetivo de discernir qué metabolitos secundarios son los responsables de la actividad antiviral *in vitro* de la especie *T. spathacea*, Sánchez-Roque y colaboradores en 2017, realizaron el estudio químico del extracto metanólico de las hojas de esta planta, en el que se identificaron de forma preliminar: cumarinas, saponinas y taninos.³⁴ Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación del efecto antiviral *in vitro* de las fracciones del extracto metanólico, obtenidas mediante cromatografía preparativa (Esquema 2).



Esquema 2. Procedimiento de separación e identificación estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *T. spathacea*.

A través de cromatografía preparativa del extracto metanólico, se obtuvieron 6 fracciones, de las cuales la fracción MF1 presentó la mejor actividad *in vitro* contra cepas del virus H1N1 ($CC_{50}=0.90 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$; $IC_{50}=0.30 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$). Al efectuar un análisis mediante HPLC-ESI-MS (Esquema 2), se identificaron 5 flavonoides (Figura 5): 7-glucósido de luteolina (**26**), kaempferol (**27**), isoquercetina (**28**), quercetina (**29**) y rutina (**30**), que pueden ser los compuestos responsables de la actividad antiviral.

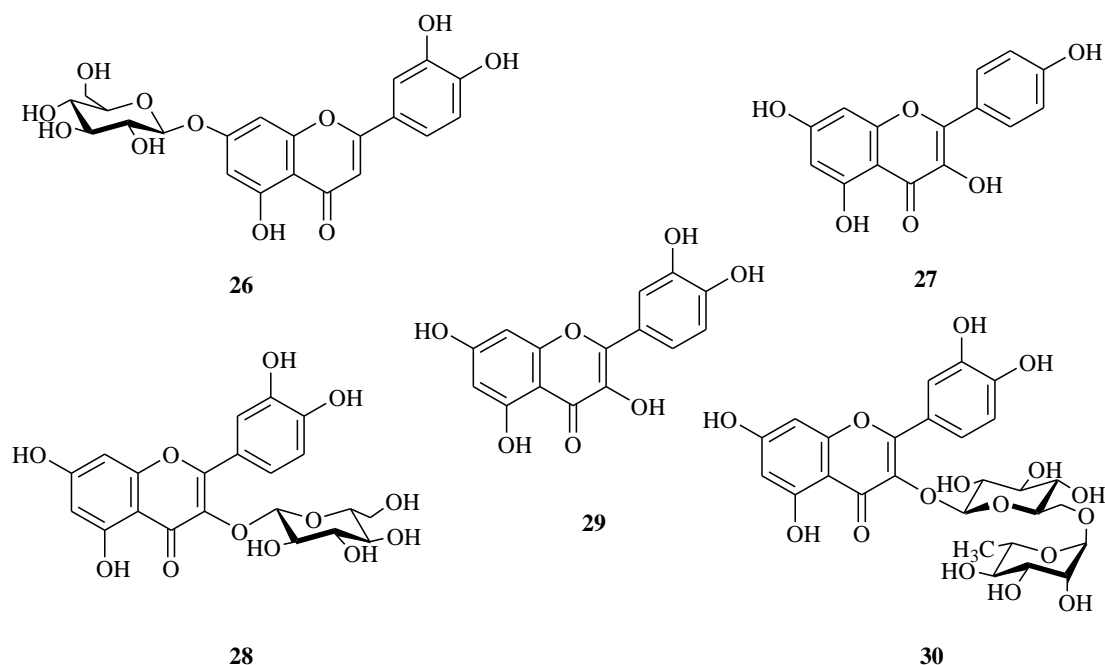
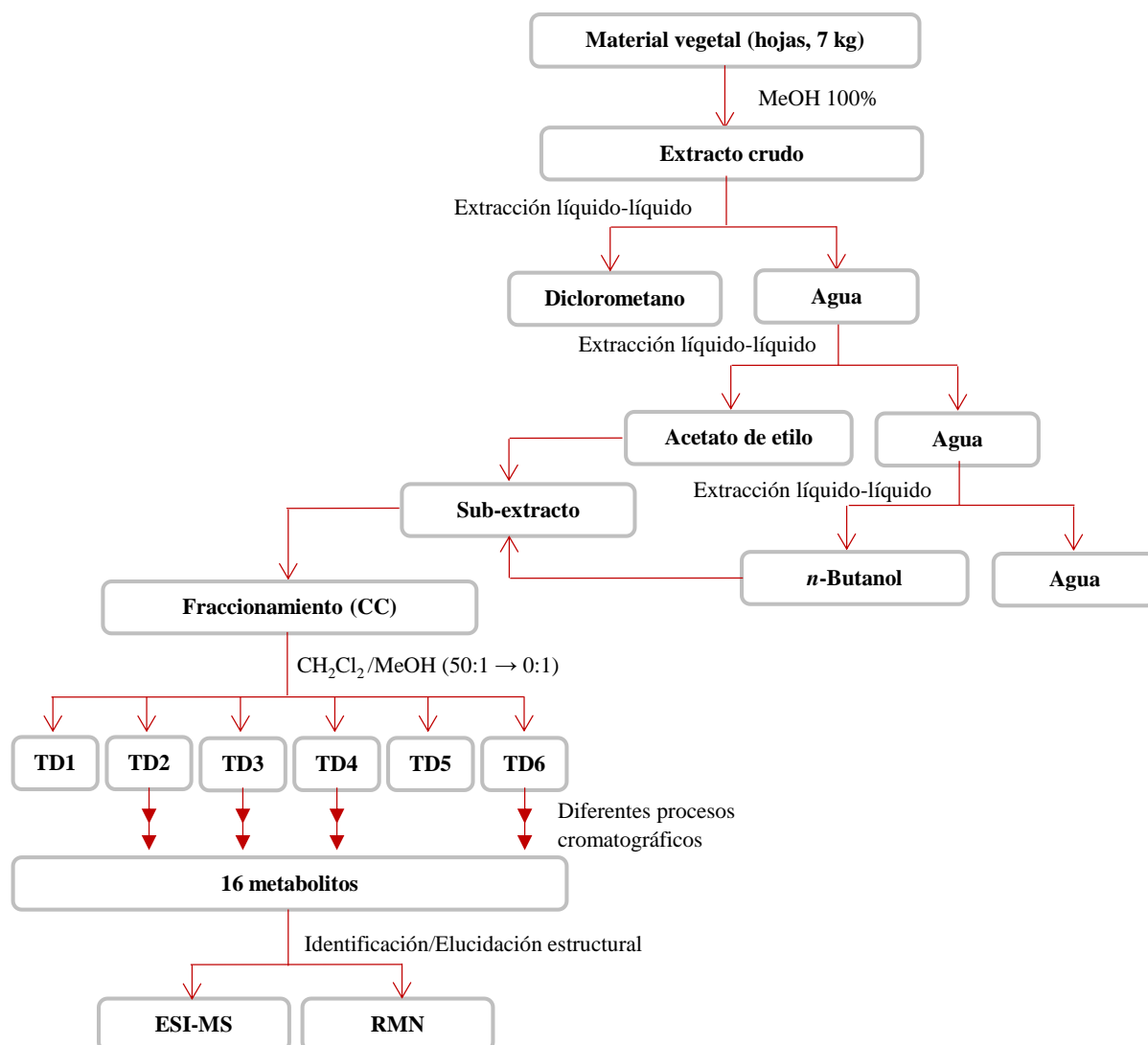


Figura 5. Flavonoides identificados a partir del extracto metanólico de las hojas de *T. spathacea*.

2.2.4 Fitoquímicos de *Tradescantia spathacea* con actividad inhibitoria de la enzima tirosina fosfatasa (PTP1B)

Por otro lado, Vo y colaboradores realizaron un estudio fitoquímico biodirigido en el 2017, partiendo del extracto metanólico de las partes aéreas de la especie *Tradescantia spathacea*, con la finalidad de evaluar la capacidad de inhibir a la enzima PTP1B, la cual es importante debido al rol que desempeña en la regulación de la expresión de proteínas asociadas a enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2.³⁵ Para obtener el extracto, el material vegetal seco fue sumergido en MeOH al 99.8% (v/v) y la solución resultante se evaporó a presión reducida. Posteriormente el extracto fue suspendido en agua y se realizaron extracciones líquido-líquido utilizando disolventes de polaridad creciente. Debido a que las fracciones del extracto metanólico solubles en AcOEt y *n*-BuOH mostraron buena actividad inhibitoria contra la enzima PTP1B, se combinaron para efectuar el aislamiento y purificación de los compuestos bioactivos presentes en la mezcla (Esquema 3).



Esquema 3. Procedimiento de aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de AcOEt/*n*-BuOH de *T. spathacea*.

A través de esta metodología se aislaron e identificaron 16 metabolitos (Figura 6), de los cuales 2 eran desconocidos: (\pm)-tradescantina (**38**) y tradescantósido (**40**). Los metabolitos descritos fueron identificados (mediante la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos) como: (2*R*,3*R*)-2,3-dihidroxi-2-metilbutirolactona (**31**), bracteanólido A (**24**), 4-(3',4'-dihidroxifenil)furan-2(5*H*)-ona (**23**), ácido (*S*)-2-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)propanoico (**32**), ácido (*R*)-2-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)propanoico (**33**), latifolicinina C (**34**), latifolicinina B (**35**), latifolicinina A (**36**), ácido protocatéquico (**19**), 1-(3',4'-dihidroxifenil)-2-hidroxietanona (**22**), hidroxitirosol (**20**), oresbusina A (**37**), kaempferol (**27**), y (6*S*,9*R*)-roseósido (**39**).

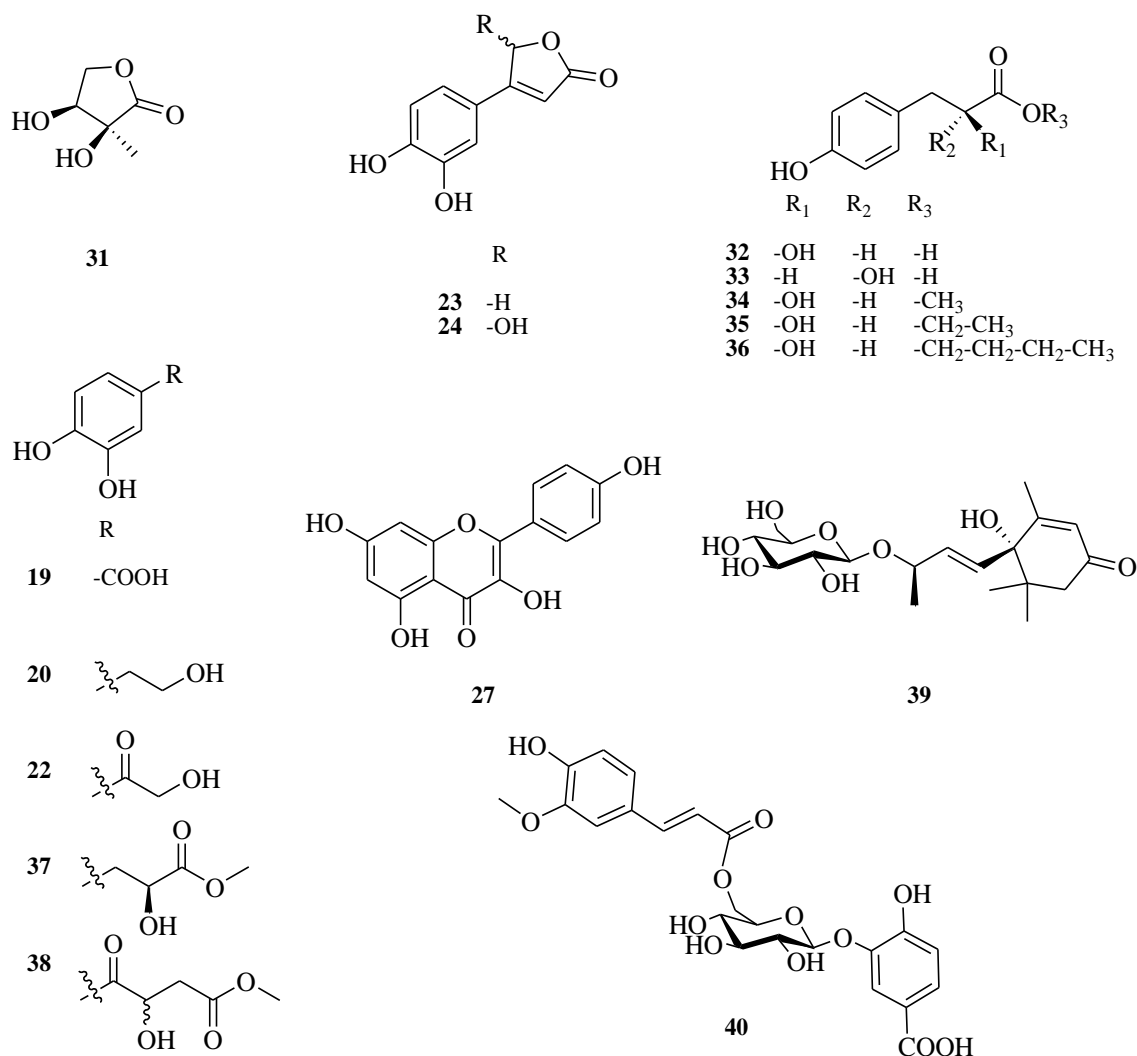


Figura 6. Metabolitos secundarios aislados a partir del extracto de AcOEt/*n*-BuOH de *T. spathacea*.

Los resultados de la evaluación biológica indican que los compuestos **24**, **35**, **37** y **40** poseen una potente inhibición de la enzima PTP1B (valores de IC₅₀ de 7.82 ± 0.79, 6.80 ± 0.89, 4.55 ± 0.92 y 6.38 ± 0.14 μM, respectivamente).

2.2.5 Fitoquímicos de *Tradescantia zebrina* con actividad antineoplásica



Figura 7. *Tradescantia zebrina*.

La especie *Tradescantia zebrina*, o *Zebrina pendula* (Figura 7), es una planta nativa del país, categorizada como invasiva al igual que *T. pallida*. Además de sus usos de forma tradicional, existen estudios que demuestran que *T. zebrina* posee propiedades insecticidas, actividad anticancerígena, y la capacidad de inhibir a la enzima 15-lipoxigenasa, que está involucrada en ataques asmáticos.²⁴

Con respecto a la actividad anticancerígena, Xiaoqi y colaboradores aislaron 3 fitoquímicos (Figura 8) producidos por esta especie con actividad antineoplásica: β -sitosterol (**41**), ácido succínico (**42**) y $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroxiestigmastano (**43**), los cuales presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento del 91% (100 mg/kg), 98% (100 mg/kg) y 43% (160 mg/kg), respectivamente.³⁶ Dicha actividad fue determinada a través de una prueba en células de ascitis sarcoma-180 en ratones.

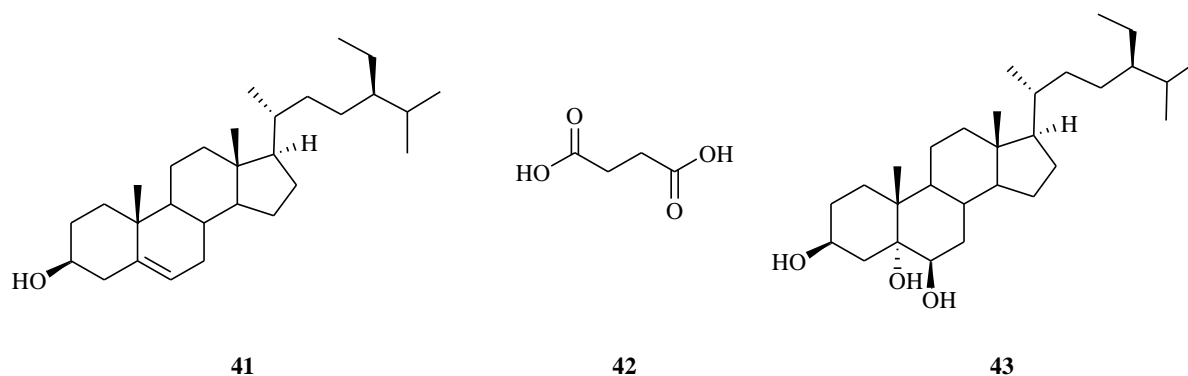


Figura 8. Fitoquímicos aislados a partir de *T. spathacea* con actividad antineoplásica.

2.3 Especie *Tradescantia pallida*



Figura 9. *Tradescantia pallida*.

La especie *Tradescantia pallida*, y/o *Setcreasea purpurea* (Figura 9), es una planta herbácea perenne clasificada dentro del grupo de las plantas suculentas. Posee un tallo cubierto de color violeta-purpúrea; hojas violeta en espiral de forma lanceoladas-oblongas a elípticas-oblongas de ápice agudo; la base es simétrica, de redondeada a ampliamente cuneada con márgenes ciliados y características glabrescentes. Posee inflorescencias terminales, frecuentemente en disposición opuesta a las hojas, presenta pedúnculos y brácteas similares a las hojas con pedicelos densamente blancos y pilosos en la cumbre, y sus pétalos son de color rosa.³⁷

La planta *T. pallida* (también conocida como corazón violeta), es una especie vegetal utilizada principalmente con fines ornamentales que posee una fuerte resistencia contra insectos y parásitos, esto le permite crecer rápidamente y colonizar diferentes entornos, por lo que también es considerada como una planta invasiva. Se encuentra ampliamente extendida en regiones con climas tropicales y subtropicales.³¹

En el contexto farmacológico, existen estudios que demuestran que los extractos obtenidos a partir de esta especie poseen actividades biológicas entre las que destacan su efecto antibacteriano (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de *T. pallida*.

Disolvente de extracción	Cepas Gram + (CMI)	Cepas Gram – (CMI)
MeOH 100% ²⁴	<i>Bacillus cereus</i> (5 mg/mL)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (5 mg/mL)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (5 mg/mL)	<i>Proteus vulgaris</i> (5 mg/mL)
EtOH 70% ²⁸	<i>Streptococcus mutan</i> (20 mg/mL)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10 mg/mL)

2.4 Parasporinas: proteínas con actividad antiproliferativa

A través de estudios realizados por Cruz-Nolasco en el 2017, se purificaron diferentes fragmentos de parasporinas producidas por cepas de *B. thuringiensis*, las cuales han sido aisladas de ecosistemas naturales de la región del Papaloapan. Al realizar la evaluación de la actividad citotóxica de estas proteínas se determinó que los polipéptidos denominados A34-2 (50 kDa) y AX-2 (65 kDa) producen inhibición del crecimiento de cultivos de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 de hasta el 99.30% y 88.94% respectivamente, ambas a una concentración de 1 mg/mL (Figura 10).³⁸ Sin embargo, se desconoce si estos nuevos agentes antiproliferativos poseen la capacidad de actuar de manera sinérgica con otras moléculas bioactivas, y de esta forma sea posible potenciar su actividad y emplearlos en terapias combinadas contra células neoplásicas.

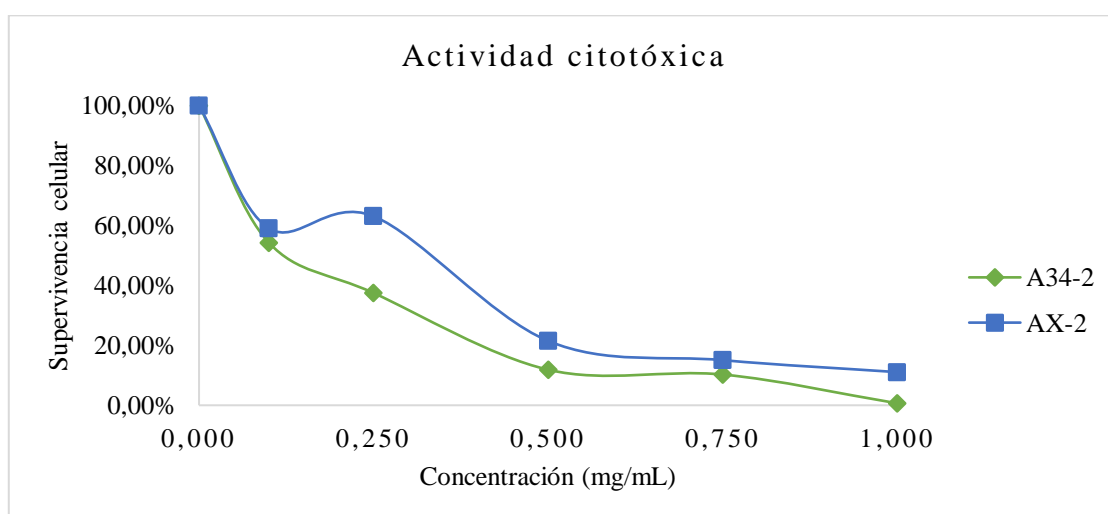


Figura 10. Evaluación citotóxica preliminar de las parasporinas A34-2 y AX-2.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Química de productos naturales

El aislamiento y la caracterización estructural de moléculas procedentes de plantas, hongos, y microorganismos, que puedan ser utilizadas como moléculas líderes o precursores en la síntesis o semi-síntesis de fármacos con un espectro de acción más amplio y una menor cantidad de efectos adversos, es objeto de estudio de la química de productos naturales; para ello se sigue un procedimiento general que consiste en: extraer, separar, y purificar a los metabolitos presentes en una mezcla obtenida a partir de una fuente natural. Después de someter esta mezcla o los compuestos químicos puros a evaluaciones farmacológicas, se determina si poseen actividad biológica. Finalmente, mediante diferentes técnicas que incluyen la espectrometría y la espectroscopía es posible elucidar su estructura química.^{39,40}

3.2 Técnicas de extracción

Actualmente existen diferentes procedimientos enfocados en la extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, como la maceración y la extracción Soxhlet; sin embargo, estos métodos han caído en desuso debido a que requieren grandes volúmenes de disolventes orgánicos y tiempos de extracción largos. Es por ello que han surgido estrategias novedosas que incluyen el uso de fluidos supercríticos y ondas ultrasónicas.⁴¹

3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La técnica de EAU es una alternativa económica, reproducible y segura, que se basa en el principio de cavitación acústica. Este fenómeno surge cuando las ondas de sonido viajan a través del medio líquido, dando paso a la formación de pequeñas burbujas, las cuales cuando alcanzan su tamaño máximo sufren una implosión que genera microambientes con ondas de choque de varios cientos de atmósferas y temperaturas alrededor de los 5 000 K. A través de este efecto es posible dañar las paredes de las células vegetales de la materia prima, liberando así los compuestos bioactivos al medio, lo que tiene un impacto positivo sobre el tiempo y los rendimientos de extracción.^{41,42}

3.3 Técnicas de separación

3.3.1 Cromatografía en columna (CC)

Es una técnica que se basa en la afinidad que presenta cada compuesto químico en una mezcla, por: a) un sistema de disolventes, que recibe el nombre de fase móvil; y b) una fase sólida, llamada fase estacionaria. De acuerdo a las características químicas que exhiban los analitos, tendrán mayor o menor afinidad por una de las fases, lo que permitirá separarlos gradualmente. En el sistema de separación de CC (Figura 11), la fase estacionaria (en forma de partículas finas) es puesta en un cilindro hecho generalmente de vidrio, de varios centímetros de diámetro y con una altura entre 5 y 10 veces más grande que el diámetro. En esta variante de la técnica los analitos interaccionan con las fases estableciendo un equilibrio de adsorción-desorción, sin embargo, el equilibrio es desplazado debido al paso continuo de la fase móvil. La posición vertical de la columna permite recuperar al eluyente (fase móvil combinada con los analitos) que sale de la misma por efecto de la gravedad. Otra forma de realizar el procedimiento es ejerciendo presión positiva sobre el sistema, como en el caso de la cromatografía en columna flash (CCF); lo que se consigue conectando una bomba de aire a la parte superior de la columna, con la finalidad de agilizar el proceso de separación.^{43,44}

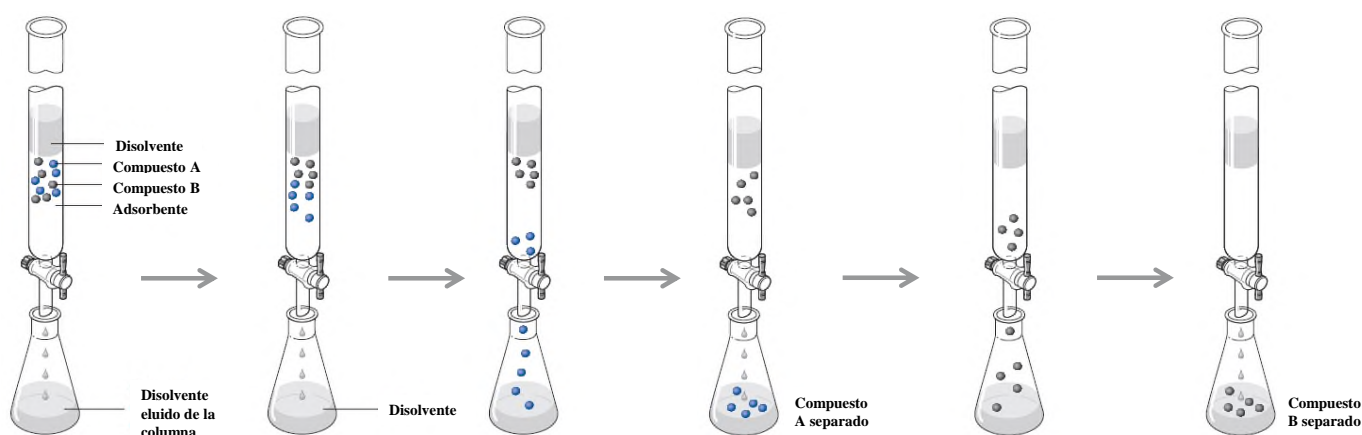


Figura 11. Representación de una separación a través de CC.
Imagen tomada y modificada⁴⁵

3.3.2 Cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC (por sus siglas en inglés, Figura 12), es una técnica de análisis cualitativo que sigue el mismo principio de la CC. La diferencia entre ambas es que en esta variante la fase estacionaria es soportada sobre una placa delgada que puede estar hecha de vidrio o aluminio. La muestra es depositada con un aplicador sobre una línea

(trazada con lápiz) algunos milímetros por encima de la base, posteriormente se agrega fase móvil de composición adecuada a un reservorio (asegurando que el volumen se encuentre por debajo de la línea de aplicación de la muestra). La placa se coloca dentro del reservorio y la fase móvil sube a través de ella por efecto de capilaridad, separando los componentes de la mezcla en función de la afinidad que presenten por cada una de las fases; mediante el uso de agentes reveladores (químicos o físicos) se observan puntos sobre la placa cromatográfica que corresponderán a los componentes de la muestra. Usualmente los compuestos se desplazan a través de la placa en cierta fracción de la velocidad con que se desplaza el disolvente, esta relación recibe el nombre de factor de retención (R_f) y se calcula de acuerdo a la ecuación 1.⁴⁴

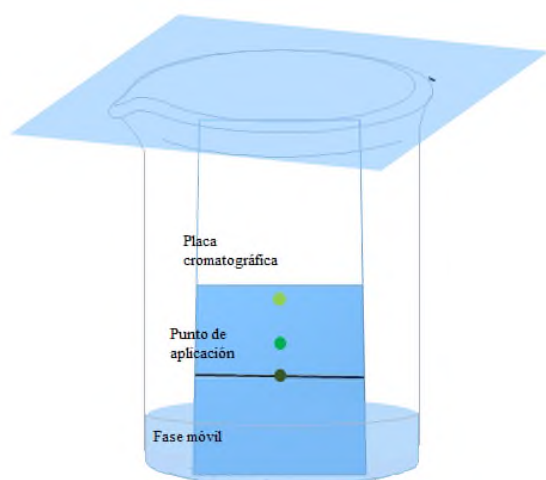


Figura 12. Representación de una separación por TLC

$$R_f = \frac{\text{Distancia que recorre el soluto}}{\text{Distancia que recorre el disolvente}} \quad (1)$$

3.4 Caracterización estructural

3.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los núcleos de algunos isótopos de los elementos químicos tienen la propiedad de comportarse como pequeños imanes que giran en torno a un eje, y por lo tanto, poseen un momento magnético asociado a ellos, como los átomos de ^1H (protio) y ^{13}C (carbono-13) entre otros, por esta razón, la técnica de RMN es de especial importancia en la determinación estructural de moléculas orgánicas. Cuando un compuesto químico que contiene núcleos de esta naturaleza es sometido a un campo magnético externo, B_0 (Figura 13), el momento magnético de una fracción de la población de los núcleos se alinean a favor de B_0 (estado de menor energía o espín α) mientras que el resto se alinea en contra de B_0 (estado de mayor energía o espín β).⁴⁶

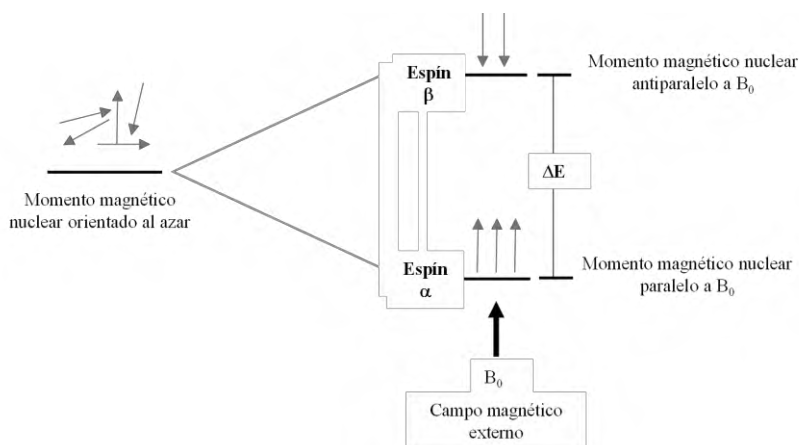


Figura 13. Desdoblamiento de los estados energéticos de espín nuclear de un átomo por efecto de un campo magnético externo.

La diferencia de energía (ΔE) entre ambos estados se relaciona de forma directamente proporcional con el campo magnético externo aplicado, a través de la ecuación: $\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$; donde ΔE indica la diferencia de energía entre los estados de espín nuclear α y β , h es la constante de Planck ($6.63 \times 10^{-34} J \cdot s$), B_0 es la intensidad del campo magnético externo y γ es una constante denominada constante giromagnética (en gauss), que depende del momento magnético que presenta el núcleo que se observa. Al proceso a través del cual una especie química es sometida a un campo magnético externo (B_0) y posteriormente es irradiada con la energía electromagnética apropiada que permita que experimente transiciones de espín nuclear se conoce como resonancia magnética nuclear. Al ser irradiados, la fracción de la población de los núcleos cuyo momento magnético se alineó con el campo magnético externo, absorbe radiación electromagnética y experimenta una transición del estado de espín nuclear α al estado de espín nuclear β . La cantidad de energía que absorban los núcleos se verá influenciada por el ambiente químico que les rodea, lo que permitirá distinguir diferentes señales para el átomo del elemento observado en la molécula de estudio. La información derivada de un espectro de RMN consiste en:^{46,47}

1. Número de señales: indica el número de núcleos del isótopo de estudio con diferente ambiente químico en la molécula.
2. Desplazamiento químico: denotado por la letra griega δ , indica la zona del espectro en la que absorbe energía cada núcleo. El valor del desplazamiento químico de cada señal estará influenciado por el ambiente químico que rodee al núcleo que se esté observando.
3. Multiplicidad: desdoblamiento de las señales por efecto del acoplamiento con núcleos vecinos.

4. Integración de las señales: indica la proporción en la que existen los núcleos (en cada señal) del isótopo de estudio en la molécula.
5. Constante de acoplamiento: separación (en hertz) que se observa entre dos señales en el espectro de RMN, como consecuencia del acoplamiento entre dos núcleos. Depende del ángulo diedro que forman entre sí.

3.4.1.1 Espectroscopía de difusión ordenada (DOSY)

Los experimentos de RMN tienen una gran cantidad de aplicaciones debido a que es posible detectar a todos los compuestos químicos que contienen el isótopo que se analiza; sin embargo, la interpretación de los espectros es complicada en muestras complejas. Una forma de eludir esta limitación es a través del uso de experimentos de difusión ordenada, ya que esta modalidad de la espectroscopía de RMN permite separar las señales del espectro original y relacionarlas con la molécula de la que provienen en virtud de su coeficiente de difusión traslacional (D); esta característica de moléculas en solución se presenta como consecuencia del movimiento browniano de los solutos a través de un líquido. Dicho movimiento está asociado al tamaño y forma de la molécula, además de algunas propiedades del medio en que se encuentra como la temperatura, la composición y la viscosidad.⁴⁸ El desplazamiento de las especies químicas tiene un efecto de reducción sobre la intensidad de las señales del espectro de forma exponencial, cuyo grado de atenuación está en función de la amplitud del gradiente de los pulsos magnéticos suministrados, presentando un comportamiento proporcional al valor del D de la molécula. En la práctica, se adquiere una serie de experimentos de RMN que dependen de la fuerza del gradiente aplicado, generando un conjunto de espectros en los que se observa que las intensidades de las señales siguen un patrón de decaimiento, lo que permite establecer una correlación entre las señales que corresponden a la especie molecular cuya disminución tiene lugar a la misma velocidad (Figura 14).^{49,50}

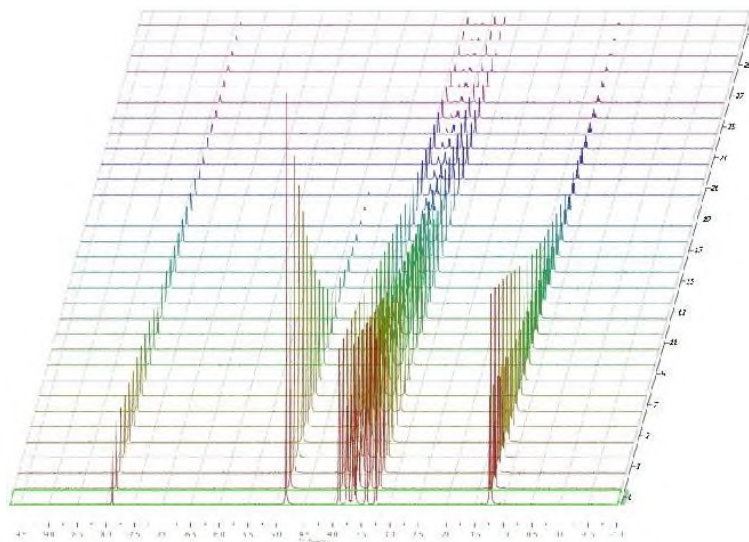


Figura 14. Decaimiento de las señales en un espectro de difusión ordenada.
Imagen tomada⁵⁰

En el experimento DOSY más sencillo (DOSY-Oneshot) el D se muestra a lo largo del eje vertical, mientras en el eje horizontal se disponen las señales del espectro unidimensional de ^1H . Para realizar su interpretación se trazan líneas perpendiculares a los ejes, con puntos de intersección situados en los valores de D y δ obtenidos, de tal forma que es posible establecer una correlación pseudo 2D en la que se asume que todas las señales del espectro original que se asocian a un valor de D pertenecen a la misma especie química; facilitando así la asignación de señales y su seguimiento a través de otros experimentos para construir la estructura molecular.^{49,50}

Un ejemplo de la aplicación de estos experimentos es el análisis de metabolitos secundarios como los flavonoides fisetina (**44**), (+)-catequina (**45**) y quercetina (**29**).⁵¹ Los flavonoides, de manera general, son una familia de metabolitos que comparten una estructura química básica (benzopirano: anillos A y C; fenilo: anillo B), lo que permite que presenten pocas diferencias en sus espectros de RMN, las cuales radican principalmente en la naturaleza de los sustituyentes que contienen. Debido a que D está influenciado en gran medida por el medio en que se encuentran inmersos los solutos, una forma de mejorar la separación de las señales es a través del uso de agentes que establezcan interacciones favorables con los analitos, lo que se conoce como DOSY asistida por matriz (MA-DOSY, por sus siglas en inglés). En el análisis de los flavonoides **29**, **44** y **45**, se empleó una mezcla de los disolventes $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ en una proporción 50/50 (v/v), para incrementar su solubilidad; además de incorporar el agente dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) a una concentración de 80 mM, con la finalidad de manipular el valor de D . Al comparar los espectros MA-DOSY antes y después de

la adición del agente SDS, se observó que en este último caso se favoreció un mayor desdoblamiento de los valores de D , lo que permitió llevar a cabo la asignación de las señales de los analitos correspondientes (Figuras 15a y 15b, respectivamente).

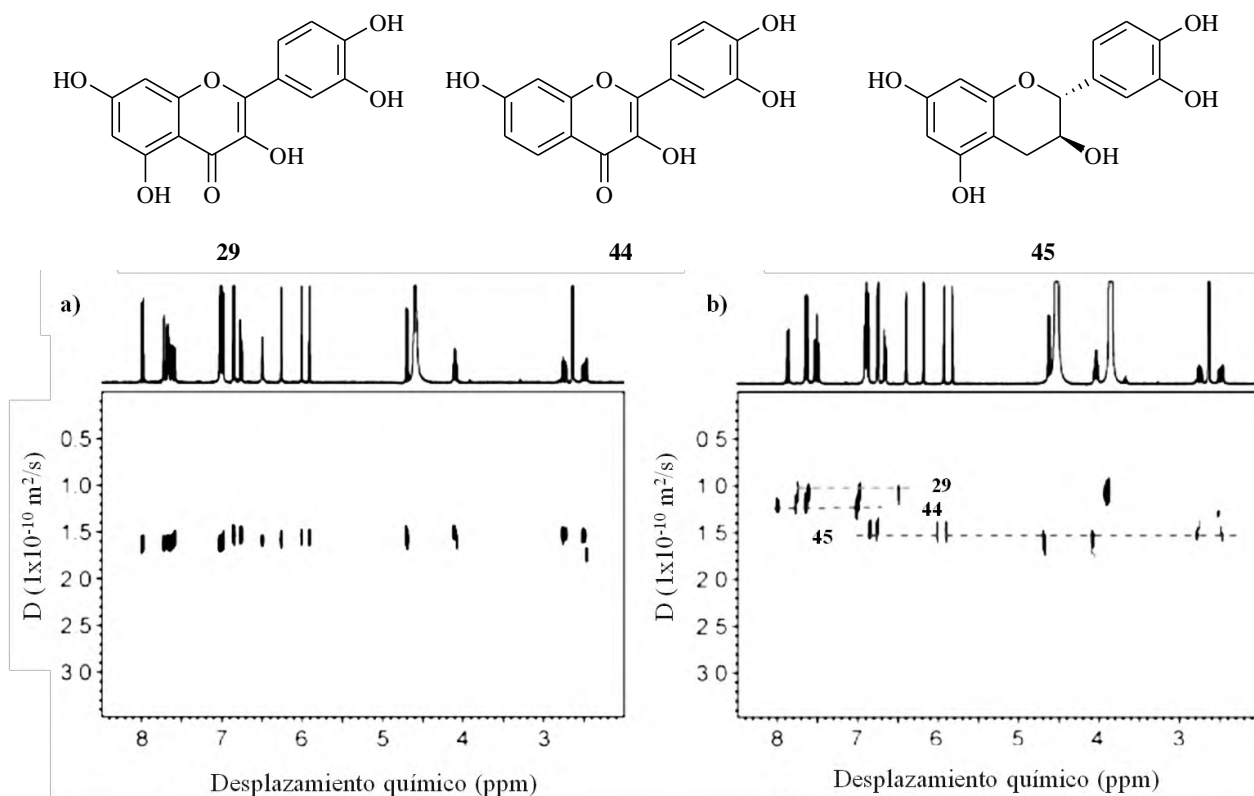


Figura 15. Análisis mediante MA-DOSY de los flavonoides 29, 44 y 45. a) espectro obtenido antes de la adición de SDS. b) espectro obtenido después de la adición de SDS (80 mM)

Por otro lado, a través de la espectroscopía DOSY en combinación con otros experimentos de RMN como COSY, TOCSY, HMBC, HSQC, entre otros, también ha sido posible realizar la asignación de las señales de diferentes productos del metabolismo, como: polialcoholes, ácidos orgánicos y carbohidratos,⁵² lo que la hace una herramienta útil en la elucidación estructural de moléculas de interés biológico como los productos naturales.

3.4.2 Espectrometría de masas (MS)

La MS es una técnica de análisis instrumental que permite separar y analizar iones en fase gaseosa, en virtud de la relación masa/carga eléctrica que poseen, representada como m/z (Figura 16).⁵³

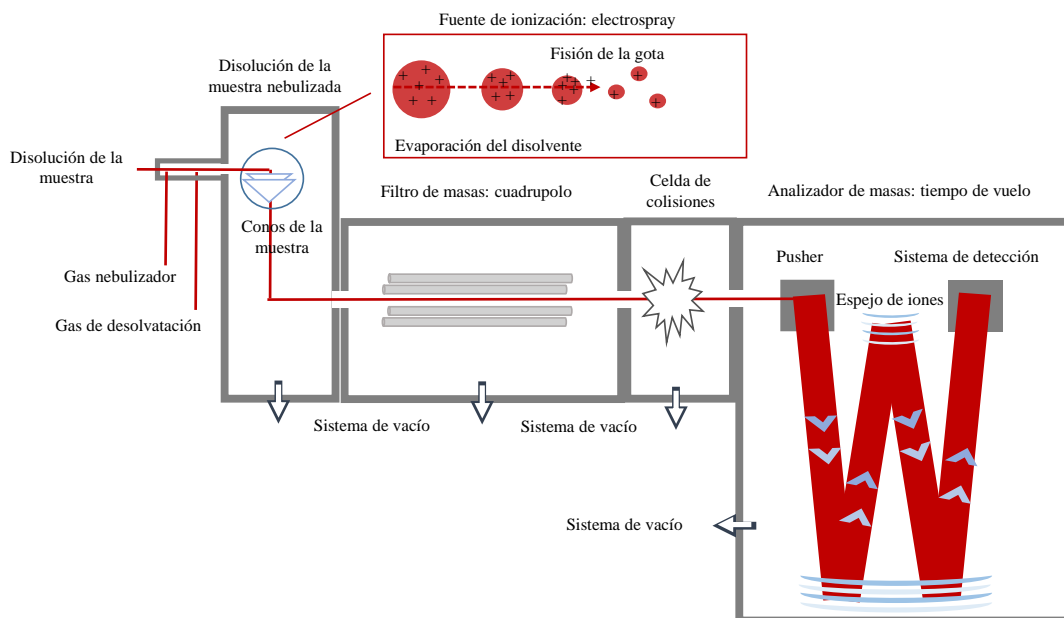


Figura 16. Configuración general de un espectrómetro de masas de tipo ESI-Q-TOF. Imagen tomada y modificada⁵⁴

3.4.2.1 Ionización por electronebulización (ESI)

Es un método de ionización que se lleva a cabo a presión atmosférica, en el cual la muestra es ionizada al hacerla pasar a través de un capilar cargado eléctricamente (voltaje de entre 2.5 kV y 6 kV). Para favorecer la ionización se agregan aditivos que son capaces de ionizar a las moléculas presentes a través de la ganancia o pérdida de iones H^+ , tales como ácidos (ESI-Positivo) y bases (ESI-Negativo) de naturaleza volátil, como el ácido fórmico y el hidróxido de amonio, respectivamente. Posteriormente la disolución es nebulizada dentro de la fuente de ionización, y una vez que se encuentra en forma de gotas pequeñas, son evaporadas gradualmente, ocasionando que las moléculas se acerquen entre sí hasta que son repelidas mutuamente debido a su carga eléctrica, formando iones independientes que migrarán hacia el siguiente dispositivo del sistema.⁵⁵

3.4.2.2 Analizadores y filtros de masas

Después del evento de ionización los iones viajan a través de una serie de dispositivos sometidos a alto vacío, que tienen finalidades diferentes: los filtros de masas o cuadrupolos (Q) son dispositivos que discriminan iones con distinta relación m/z . Por otro lado, los analizadores de masas como el tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) separan iones que viajan a través del sistema con velocidades diferentes, debido a su distinta relación m/z . Además de determinar la masa exacta del ion molecular, también es posible determinar la masa exacta de los iones que forman el patrón de fragmentación; esto se consigue al suministrar energía de colisión a la muestra

(en la celda de colisión) que fragmenta al ion de una forma característica para cada compuesto químico. Finalmente, a través de esta información se puede inferir la estructura química del compuesto de interés.⁵⁶

3.5 Evaluación de la actividad antiproliferativa

3.5.1 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, por sus siglas en inglés) es un ensayo colorimétrico utilizado para determinar la viabilidad celular. Se basa en el cambio de color que exhibe el reactivo MTT (**46**) al ser metabolizado por enzimas de la cadena respiratoria (Figura 17). El reactivo inicial (de color amarillo pálido, soluble en agua), es reducido a formazan (**47**, de color violeta, insoluble en agua) por medio de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales.



Figura 17. Reducción metabólica del MTT a formazan.

El cambio de coloración en el medio indica la actividad mitocondrial de las células para llevar a cabo la reducción del MTT, es decir, medir su actividad funcional; por lo que la disminución de la coloración es directamente proporcional a la pérdida de la viabilidad celular. Para llevar a cabo el experimento es necesario incluir un control para el medio de cultivo celular, un control para el disolvente utilizado y preferentemente un control positivo. Debido a que se trata de una reacción colorimétrica, el producto de la reacción es analizado en un lector de placas a una longitud de onda entre 540 y 595 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (supervivencia celular) de acuerdo a la ecuación 2.^{57,58}

$$\text{Porcentaje de supervivencia celular} = \frac{\text{Absorbancia de las células tratadas}}{\text{Absorbancia de las células control}} \times 100 \quad (2)$$

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que en el 2015 las variantes del cáncer fueron la causa de 8.8 millones de defunciones a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia con 16% de los tumores malignos diagnosticados. Ese mismo año, en México, se determinó que de un total de 655 688 defunciones, 85 201 fueron originadas por neoplasias, de las cuales 6 304 corresponden a tumores malignos de mama diagnosticados en mujeres. En el periodo comprendido entre 2011 a 2016 la incidencia de mortalidad por esta enfermedad aumentó hasta alcanzar una tasa de 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años en adelante.^{9,59} Las estadísticas de los últimos años indican que estas enfermedades han ido en aumento, sin embargo, el desarrollo de nuevos fármacos para tratarlas no sigue el mismo ritmo de crecimiento.

5 JUSTIFICACIÓN

El estudio de plantas que conduzcan al descubrimiento de compuestos que puedan ser empleados en el tratamiento del cáncer es importante debido a que la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado con el paso del tiempo, y se ha posicionado como una de las causas principales de morbilidad en México y el mundo. Actualmente algunos de los medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer han sido obtenidos de fuentes naturales, como el Paclitaxel, aislado a partir de la especie *Taxus brevifolia*,¹³ sin embargo, de los cientos de compuestos bioactivos que han sido evaluados como agentes anticancerígenos, sólo unos pocos pasan la etapa de experimentación *in vitro*.

Debido a que existen estudios farmacológicos que demuestran que los extractos de algunas especies del género *Tradescantia* como *T. spathacea* y *T. zebrina* poseen actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas, a través del estudio químico y la evaluación citotóxica de la especie *T. pallida* se establecerá su posible aplicación como fuente de agentes bioactivos que puedan ser utilizados en el tratamiento del cáncer.

6 HIPÓTESIS

El estudio químico y biológico de la especie *Tradescantia pallida* conducirá a la obtención de extractos con actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Realizar el estudio químico y la evaluación citotóxica de los extractos de las hojas de *T. pallida* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

7.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad citotóxica de cinco extractos de la especie *T. pallida*, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
2. Caracterizar los metabolitos presentes en los extractos activos mediante técnicas espectroscópicas como RMN y técnicas espectrométricas como ESI-MS.
3. Determinar la posible actividad sinérgica del extracto más activo obtenido a partir de *T. pallida* en combinación con dos parasporinas producidas por *Bacillus thuringiensis*, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

8 METODOLOGÍA

8.1 Recolección y secado del material vegetal

Para llevar a cabo la recolección de la materia prima se cortaron únicamente las hojas de la planta que tuvieran una longitud de 10 a 15 cm, cuidando que no presentaran alguna plaga o enfermedad. El material vegetal se secó a la sombra hasta observar un peso constante (7 semanas).

8.2 Obtención de los extractos

Las hojas trituradas se dividieron de forma equitativa en cuatro lotes, y se colocaron en frascos ámbar de 1.5 L de capacidad. Para realizar un fraccionamiento primario de los metabolitos secundarios presentes, se llevaron a cabo extracciones sucesivas asistidas por ultrasonido, utilizando disolventes de polaridad creciente (grado técnico), los cuales fueron destilados previamente. A cada lote se le agregó aproximadamente 400 mL de disolvente y se colocó en un baño de ultrasonido (Bransonic 1510R-MTH, 42 KHz \pm 6%) durante 20 minutos (10 minutos en sonicación-pausa de 5 minutos-10 minutos en sonicación). Este procedimiento se realizó por triplicado. Tras concluir cada repetición, el extractante se colectó en un matraz de bola y el disolvente se retiró mediante evaporación a presión reducida (Rotaevaporador Büchi R-300) para así obtener el extracto seco.

8.3 Perfil fitoquímico preliminar de los extractos

Se realizaron 7 pruebas químicas para determinar la presencia de algunas familias de metabolitos secundarios en los extractos obtenidos, utilizando los protocolos descritos por Patil y Deshmukh,⁶⁰ con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 50 mg de los extractos secos y se solubilizaron en 2 mL de una mezcla EtOH/agua. Para preparar las alícuotas de cada extracto se colocaron de 5 a 10 gotas de la disolución y se adicionó agua destilada para completar el volumen requerido, por último se añadieron los reactivos correspondientes para cada ensayo.

Al mismo tiempo se incluyó un estándar representativo de cada familia de metabolitos a evaluar como control positivo de la reacción y un blanco como control negativo (vehículo en el cual se solubilizaron los reactivos).

8.4 Análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC

Se realizó un perfil cromatográfico preliminar de los extractos mediante TLC. Para ello se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ (5 cm x 4 cm; 3.5 cm x 4.0 cm; 3.0 cm x 4.0 cm), en las cuales se depositó

una pequeña muestra de los extractos solubilizados en los disolventes apropiados, a su vez, en el análisis de los extractos menos polares (Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt) se incluyeron dos estándares.

Posteriormente, las placas fueron eluidas utilizando 5 sistemas binarios de polaridad ascendente (Hex/AcOEt 90:10 y 70:30, CH₂Cl₂/MeOH 95:05 y 50:50, MeOH/H₂O 90:10) y observadas mediante distintos agentes (luz visible, radiación UV-254 nm, radiación UV-365 nm y H₂SO₄/Δ). Por último, se realizó el cálculo de R_f para los componentes mayoritarios de los extractos.

8.5 Evaluación preliminar de la actividad citotóxica de los extractos

Para la evaluación citotóxica preliminar, se utilizó la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama), cultivada en el medio comercial Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biowest), suplementado con suero fetal bovino (Biowest) al 10% (v/v) y una mezcla penicilina/estreptomicina (Biowest) al 1% (v/v). Las células se incubaron a 37 °C en presencia de ambiente humidificado y CO₂ (5%). Posteriormente se utilizó un mililitro de tripsina proteasa (Biowest) para desprender las células, la suspensión celular resultante se transfirió a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 1000 rpm (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R). Del paquete celular obtenido después de la centrifugación se preparó una suspensión celular a una dilución 1:20 y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer.

Se prepararon cajas de cultivo de 6 pozos con diferentes densidades de la línea celular mencionada (Tabla 3) y se incubaron durante 24 h.

Tabla 3. Densidad celular utilizada en la evaluación preliminar de la actividad citotóxica.

Extracto	Vehículo	Controles incluidos (densidad celular)
Hexano	Medio de cultivo, con DMSO al 20%	Medio de cultivo (3.5x10 ⁵)
		Medio de cultivo, con DMSO al 20% (3.5x10 ⁵)
Diclorometano	Medio de cultivo, con DMSO al 4%	Medio de cultivo (1.7x10 ⁵)
		Medio de cultivo, con DMSO al 4% (1.7x10 ⁵)
Acetato de etilo	Medio de cultivo, con DMSO al 8%	Medio de cultivo (1.7x10 ⁵)
		Medio de cultivo, con DMSO al 8% (1.7x10 ⁵)
Metanol 1	Medio de cultivo	Medio de cultivo (5x10 ⁴)
Metanol 2	Medio de cultivo	Medio de cultivo (5x10 ⁴)
Agua	Medio de cultivo	Medio de cultivo (5x10 ⁴)

Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada uno de los extractos y se solubilizaron en un vehículo adecuado. Las soluciones se esterilizaron por filtración con una membrana con tamaño de poro de 0.22 μm (TPP pritzensyringe-filter). Se hicieron diluciones sucesivas, para preparar 5 disoluciones de entre 0.062 y 1 mg/mL y de esta forma realizar un ensayo dosis-respuesta con un tiempo de exposición de 24 h.

Una vez transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se efectuó el ensayo MTT, para ello se colocaron 25 μL de una solución que contenía 5 mg/mL del reactivo MTT y 475 μL de medio de cultivo por cada pozo. Las placas se incubaron durante 4 h, posteriormente los cristales de formazan depositados en el fondo de las placas se solubilizaron en isopropanol (grado técnico), y se realizó la lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Optizen Pop). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de supervivencia celular.

8.6 Separación cromatográfica del extracto MeOH 2 (C1)

La muestra se preparó mezclando el extracto MeOH 2 (3.2873 g) disuelto en metanol con sílica gel 60 con tamaño de partícula 230-400 μm (10.3025 g), la suspensión se sometió a un proceso de evaporación a presión reducida. Posteriormente se preparó una columna cromatográfica de 5 cm de diámetro con un lecho de sílica de 4" de altura, para lo que se utilizó una mezcla de Hex/AcOEt (70:30) como fase móvil inicial. A esta columna se adicionó la muestra seca, los componentes se eluyeron utilizando un gradiente de polaridad (Hex/AcOEt 7:3 \rightarrow 1:1, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 7:3 \rightarrow 1:1, MeOH 100%, MeOH/H₂O 9:1, H₂O 100%).

8.7 Evaluación de la actividad citotóxica de las sub-fracciones del extracto MeOH 2

8.7.1 Ensayo preliminar

La línea celular MCF-7 se propagó empleando la metodología descrita en la sección 8.5, para este ensayo se utilizaron placas de 6 pozos con 5×10^4 células cada uno.

Se pesaron 8 mg de las sub-fracciones **1** a **5** y se disolvieron en 4 mL de medio de cultivo suplementado, posteriormente la solución se filtró. Se realizaron diluciones sucesivas (relación 1:2 en cada caso) partiendo de una concentración de 2 mg/mL, hasta llegar a 0.125 mg/mL. Para la sub-fracción **6**, debido a que contenía agua, se hicieron las mismas diluciones partiendo de una concentración de 2% (v/v) hasta 0.125% (v/v). Los tratamientos se dejaron actuar durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de medio

de cultivo. Como siguiente paso, se agregaron 40 μL del reactivo MTT (5 mg/mL) y 760 μL de medio de cultivo a cada pozo, el cual se dejó actuar durante 4.5 horas. Posteriormente se retiró el excedente y se midió la absorbancia de los cristales disueltos en alcohol isopropílico (grado técnico), en un espectrofotómetro UV-Vis a 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia celular.

8.7.2 Ensayo por duplicado

La línea celular MCF-7 se propagó empleando la metodología descrita en la sección 8.5, en placas de 96 pozos con 5×10^4 células cada uno.

Se pesaron entre 6.3 y 8.4 mg de cada sub-fracción y se añadió el volumen necesario de medio cultivo para preparar soluciones stock de 2 mg/mL. A partir de esta solución se prepararon 4 diluciones (0.125, 0.25, 0.50, 1.00 mg/mL). Se añadieron 200 μL de las 5 soluciones preparadas y se dejaron actuar sobre los cultivos durante 36 h (se incluyó un control negativo).

Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo. Posteriormente, se agregaron 5 μL de MTT (5 mg/mL) y 95 μL de medio de cultivo a cada pozo, el cual se dejó actuar durante 4.5 h. Al terminar la reacción se retiró el excedente y se agregaron 200 μL de DMSO para disolver los cristales depositados en el fondo de la placa, y se hizo una dilución con 150 μL de DMSO más 25 μL de la solución de formazan. Se midió la absorbancia de la muestra en un lector de placas a 595 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia celular.

8.8 Separaciones cromatográficas de la sub-fracción EM2-4 (C2 y C3)

C2: La sub-fracción EM2-4 (1.130 g) se solubilizó en MeOH y se combinó con sílica para cromatografía flash (4.4417 g), posteriormente el disolvente se retiró por evaporación a presión reducida. Se preparó una columna cromatográfica de 4 cm de diámetro con un lecho de sílica de 4" de altura. A esta columna se adicionó la muestra seca. Los componentes se eluyeron mediante un proceso de separación isocrático ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:20:5). Para finalizar la separación, los componentes retenidos en la fase estacionaria se eluyeron utilizando una mezcla de MeOH/ H_2O (90:10).

C3: El extracto presente en el eluyente hidroalcohólico anterior (≈ 662.8 mg) fue disuelto en MeOH nuevamente y se combinó con sílica para cromatografía flash (2.5 g), el disolvente fue retirado mediante evaporación a

presión reducida. Se preparó una columna de 3 cm de diámetro con un lecho de sílica de 4 μ m. A esta columna se adicionó la muestra y se realizó un proceso de separación isocrático (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O, 80:20:1).

8.9 Separación mediante cromatografía en placa preparativa (CP)

Se preparó una placa de cromatografía preparativa utilizando sílica 60 GF₂₅₄ (Merck) suspendida en agua destilada. Las fracciones EM2-4-4 y EM2-4-5 provenientes de la separación cromatográfica C3 se combinaron y se solubilizaron en MeOH destilado. La muestra se aplicó sobre la placa (grosor de la línea=2 mm), y la placa se colocó en un reservorio cerrado donde se eluyó con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (80:20:2). Una vez alcanzada la línea designada como frente de disolvente, la placa se retiró del reservorio y se secó. El procedimiento de elución se repitió dos veces más.

Posteriormente, la placa se observó bajo radiación UV-254 nm y se delimitó un área de 20 cm x 2 cm para llevar a cabo el revelado con ninhidrina. Las bandas elegidas se recuperaron de la placa y se resuspendieron en MeOH destilado para solubilizar los metabolitos secundarios presentes, la suspensión se filtró y el sobrenadante fue evaporado a presión reducida.

8.10 Caracterización estructural

8.10.1 Análisis mediante resonancia magnética nuclear

Se seleccionaron cuatro muestras representativas de la columna C3 y tres de la placa preparativa. Cada muestra fue disuelta en 600 μ L de metanol-*d*₄ (\geq 99.8% de átomos de deuterio, con TMS al 0.05 % v/v) y transferida a un tubo de resonancia magnética (Wilmad, Sigma Aldrich, diámetro 5 mm, límite de frecuencia 600 MHz). Los experimentos (¹H, ¹³C, gCOSY, gHSQC, gHMBC, DOSY-Oneshot) fueron adquiridos a 25 °C en un espectrómetro de RMN Varian/Agilent Premium Compat 600 MHz (14.1 T) con módulo de gradiente de campo pulsado y sonda de 5 mm ¹H-¹⁹F/¹⁵N-³¹P, equipado con el software Varian VNMRJ-2.3 Revision A. Los espectros obtenidos fueron procesados en el software MestreNova versión 6.0.2-5475, 2009.

8.10.2 Análisis mediante espectrometría de masas

El análisis se realizó en un espectrómetro de masas SYNAPT G2-Si (Waters), equipado con fuente de ionización por electronebulización, filtro de masas de cuadrupolo sencillo, celda de colisiones y analizador de masas de tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF). La operación del equipo y el análisis de los datos se llevaron a cabo en el

programa MassLynx 4.1. Los espectros fueron obtenidos con un voltaje de 3000 V y 30 V para la fuente de ionización y el cono de muestra, respectivamente. Como gas de desolvatación se utilizó N₂ a 200 °C con un flujo de 800 L/h. La muestra se analizó mediante infusión directa con un flujo de 10 µL/min a través de un capilar a 100 °C.

Se solubilizaron 0.5 µL de cada muestra (provenientes del análisis mediante RMN) en 1 mL de metanol grado espectrometría de masas y se observaron en ambos modos de ionización, asistidas por 2 µL de ácido fórmico (Fluka, 49-51%, para uso en HPLC, 50% en agua) para ESI-(+) y 3 µL de hidróxido de amonio (Sigma-Aldrich, 28% de NH₃ en H₂O ≥99.99%) para ESI(-). Los datos espectrales fueron corregidos infundiendo continuamente el péptido de referencia Leucina-Encefalina (Leu-Enk-(+): 556.2771; Leu-Enk(-): 554.2615).

8.11 Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas

La línea celular MCF-7 se propagó empleando la metodología descrita en la sección 8.5, en esta ocasión se utilizaron placas de 96 pozos con 5x10⁴ células cada uno.

Se pesaron aproximadamente 35.3 mg de la sub-fracción EM2-4 y se añadió el volumen necesario de medio cultivo suplementado para llegar a una concentración de 2 mg/mL. A partir de esta solución se prepararon 4 diluciones (0.125, 0.25, 0.50, 1.00 mg/mL). Se añadieron 200 µL de las 5 soluciones preparadas y 2 µL de la solución de la parasporina correspondiente a cada pozo, los tratamientos se dejaron actuar sobre los cultivos durante 36 h (se incluyó un control negativo). Se realizaron dos ensayos con cuatro series para cada tratamiento.

Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo excedente y se agregaron 5 µL de MTT (5 mg/mL) y 95 µL de medio de cultivo a cada pozo, el cual se dejó actuar durante 4.5 h. Al terminar la reacción se retiró el excedente y se agregaron 200 µL de DMSO para disolver los cristales depositados en el fondo de la placa, posteriormente se hizo una dilución con 150 µL de DMSO más 25 µL de la solución de los cristales de formazan. Se midió la absorbancia de la muestra en un lector de placas a 595 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de citotoxicidad.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Recolección y secado del material vegetal

La recolección de la planta se efectuó en la colonia El Castillo, en la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca (18° 05' 05.8" N 96° 08' 53.6" O). Las hojas húmedas (6.1 kg) se secaron a temperatura ambiente (Figura 18a) y se trituraron, obteniendo 320 g de material vegetal. El contenido de humedad de esta parte de la planta es de alrededor del 95% (m/m); valor que es acorde con lo descrito para otras especies del género *Tradescantia*, como *T. spathacea*.⁶¹

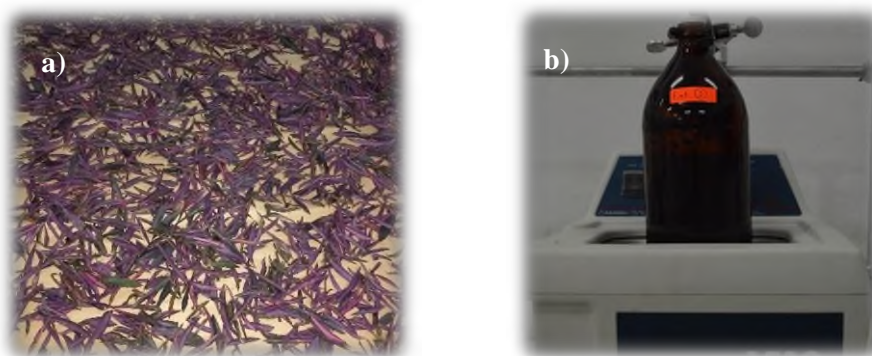


Figura 18. a) Secado del material vegetal. b) EAU.

9.2 Obtención de los extractos

De la EAU (Figura 18b) se obtuvieron en total 53.5380 g de extracto crudo (al sumar las masas de los extractos obtenidas con cada disolvente), lo que representa un rendimiento de extracción del 17% (m/m) con respecto a la masa del material vegetal seco (Tabla 4). Los extractos polares (MeOH y agua), presentaron un mejor rendimiento en comparación con los de mediana y baja polaridad. La tendencia observada en los rendimientos de extracción sigue el orden: agua > MeOH > CH₂Cl₂ > Hex > AcOEt.

Durante el proceso de extracción con MeOH, se observó que una fracción de este extracto adquirió una tonalidad magenta similar a la que presentó el extracto acuoso y se formó un precipitado, por lo que se decidió tratarla como una sub-fracción del extracto metanólico (designado como MeOH 2).

Tabla 4. Resumen del procedimiento de EAU.

Disolvente	Masa de extracto (g)	Rendimiento (%)*
Hex	3.0370	0.92
CH ₂ Cl ₂	3.7809	1.15
AcOEt	1.8915	0.57
MeOH	4.2714 (MeOH 1)	1.29
	3.4548 (MeOH 2)	1.05
Agua	40.1034	12.15
Masa total=56.5390		17.13

*Porcentaje calculado con respecto a la cantidad de material vegetal seco

9.3 Perfil fitoquímico preliminar

Para realizar el estudio fitoquímico preliminar se emplearon 7 ensayos basados en la formación de un derivado colorido y/o precipitado (Tabla 5), con la finalidad de identificar a las principales familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos.

Tabla 5. Resumen de las pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos.

Metabolitos a determinar	Reactivos	Resultado esperado (Referencia utilizada)	Hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH		Agua	BLK	Ref
						M1	M2			
Taninos Ensayo de Braymer	2 mL de extracto + 2 mL H ₂ O, + 2-3 gotas de FeCl ₃ (5%)	Precipitado verde (Ácido tánico)	X	X	✓	X	X	✓	X	✓
Flavonoides	1 mL de extracto + 1 mL de Pb(OAc) ₄ (10%)	Coloración amarilla (Quercetina)	X	X	✓	X	X	✓	X	✓
Glicósidos Ensayo de Liebermann	2 mL de extracto + 2 mL de CHCl ₃ + 2 mL de AcOH	Coloración violeta- verde	X	X	*	X	X	X	X	-
Cumarinas	1 mL de extracto + 1.5 mL de NaOH (10%)	Coloración amarilla (Ácido 4-hidroxi-3- metoxicinámico)	X	X	✓	X	X	✓	X	✓
Proteínas Ensayo xantoprotéico	1 mL de extracto + 1 mL de H ₂ SO ₄ (conc.)	Precipitado blanco	X	X	X	X	X	X	X	-
Esteroides Ensayo de Salkowski	1 mL de extracto + 1 mL de CHCl ₃ + 1 mL de H ₂ SO ₄ (conc.)	Anillo rojizo en la unión de las dos fases (Colesterol)	X	X	✓	✓	✓	X	X	✓
Terpenoides	1 mL de extracto + 1 mL de (CH ₃ CO) ₂ + 1 mL de H ₂ SO ₄ (conc.)	Coloración roja oscura	X	X	X	X	X	X	X	-

*Resultados no concluyentes.

Los extractos en los que se observó un mayor número de resultados positivos fueron los de polaridad media a alta (Figura 19), por ejemplo, en los extractos de AcOEt y agua se detectó la presencia de compuestos fenólicos como **flavonoides**, **cumarinas** y **taninos**. Por otro lado en los extractos de AcOEt y MeOH (ambas subfracciones) se detectó la presencia de compuestos de naturaleza **esteroidal**. Para el caso del ensayo de Liebermann no se obtuvieron resultados concluyentes debido a que los extractos donde se observó un posible resultado positivo poseen color rojo-magenta, lo que interfiere con la identificación.

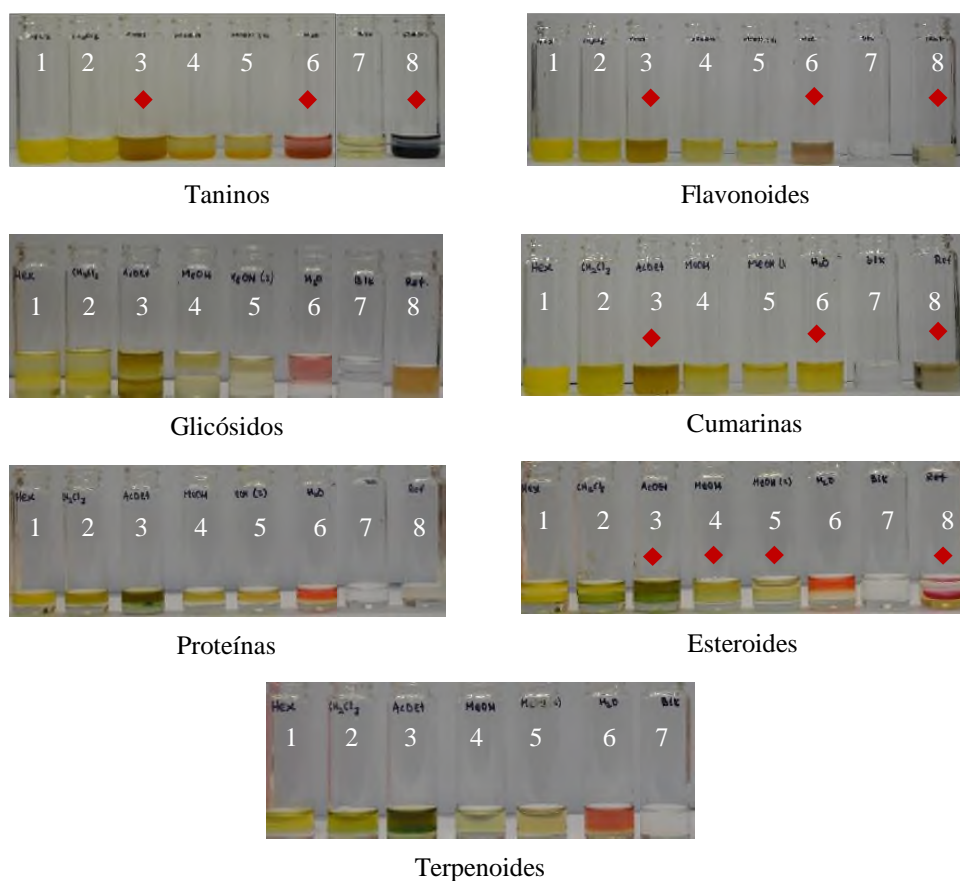


Figura 19. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos.

Nota: 1: Hex, 2: CH₂Cl₂, 3: AcOEt, 4: MeOH 1, 5: MeOH 2, 6: Agua, 7: Blanco, 8: Referencia. Los rombos indican resultados positivos

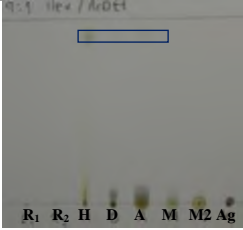
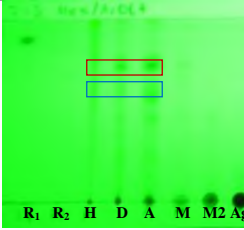
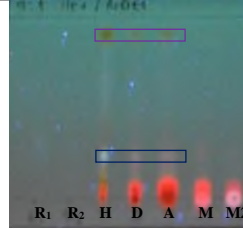
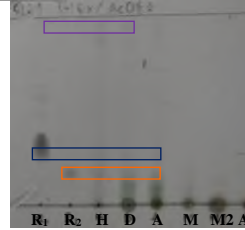
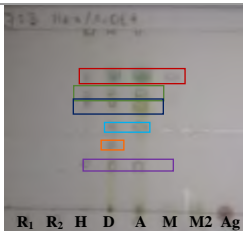
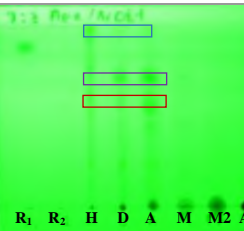
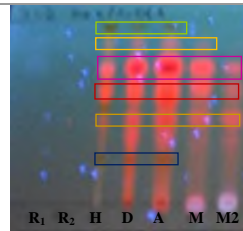
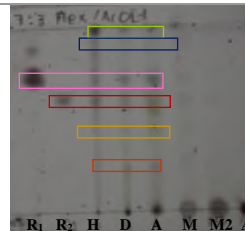
Estos resultados complementan la información que se conocía hasta el momento en cuanto a la composición química de los extractos de *T. pallida*, ya que algunas de las familias de metabolitos secundarios que se han descrito en el extracto metanólico de esta especie mediante ensayos fitoquímicos son: flavonoides (tiras de zinc y HCl conc.), alcaloides (ensayo de Mayers, ensayo de Dragendorff y ensayo de Hager), taninos (dicromato de potasio al 10%) y carbohidratos (ensayo de Fehling).⁶²

Por otro lado, a través de técnicas instrumentales como HPLC-ESI-MS se ha demostrado que las especies *T. albiflora* y *T. spathacea* contienen dentro de sus constituyentes químicos metabolitos secundarios como: quercetina, isoquercetina, kaempferol, bracteanólido A y B, entre otros, a los cuales se les atribuyen algunas de las actividades biológicas que presentan.^{33,34} Debido a que a través de varios estudios fitoquímicos se ha establecido que *T. pallida*, *T. albiflora* y *T. spathacea* producen metabolitos secundarios que pertenecen a la misma familia (como es el caso de los compuestos fenólicos), se plantea la posibilidad que compartan un perfil fitoquímico similar.

9.4 Análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC

Tomando en cuenta que cada punto en las placas cromatográficas indica la presencia de un compuesto químico, y partiendo de la premisa que en la mismas condiciones de separación los metabolitos que se encuentren en más de un extracto conservan el mismo valor de R_f , al realizar el análisis mediante TLC con Hex/AcOEt en una proporción 90:10 como sistema de elución (Tabla 6) se concluyó que los extractos de Hex, AcOEt y CH_2Cl_2 poseen un perfil fitoquímico similar, ya que se observan tentativamente los mismos metabolitos al revelar las placas con luz visible ($R_f=0.90$), radiación UV-254 nm ($R_f=0.64, 0.53$), radiación UV-365 nm ($R_f=0.73, 0.29$) y $\text{H}_2\text{SO}_4, \Delta$ ($R_f=0.73, 0.24, 0.18$). Al incrementar la polaridad del sistema de elución Hex/AcOEt a una proporción 70:30, se logró apreciar un perfil de metabolitos más amplio en los tres extractos mencionados, especialmente al revelar la placa cromatográfica con H_2SO_4 y calentamiento ($R_f=0.97, 0.87, 0.72, 0.63, 0.47$).

Tabla 6. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (1).

Sistema de elución: Hex/AcOEt (90:10)							
Luz Visible		UV-254 nm		UV-365 nm		H ₂ SO ₄ , Δ	
							
0.90		0.64	0.53	0.73	0.29	0.73 0.24	0.18
Sistema de elución: Hex/AcOEt (70:30)							
Luz Visible		UV-254 nm		UV-365 nm		H ₂ SO ₄ , Δ	
							
0.75	0.47	0.97	0.62	0.97	0.62	0.97	0.63
0.63	0.34	0.73		0.87	0.48	0.87	0.47
0.59	0.25			0.73	0.29	0.72	0.23

Nota: R₁: fitol, R₂: β-sitosterol, H: Hexano, D: CH₂Cl₂, A: AcOEt, M: MeOH 1, M2: MeOH 2, Ag: Agua.

En este último análisis se incluyeron dos estándares (Figura 20), los metabolitos secundarios β-sitosterol (**41**) y fitol (**48**), los cuales presentan un R_f de 0.87 y 0.62 respectivamente, por lo que fue posible identificarlos en los tres extractos de menor polaridad.

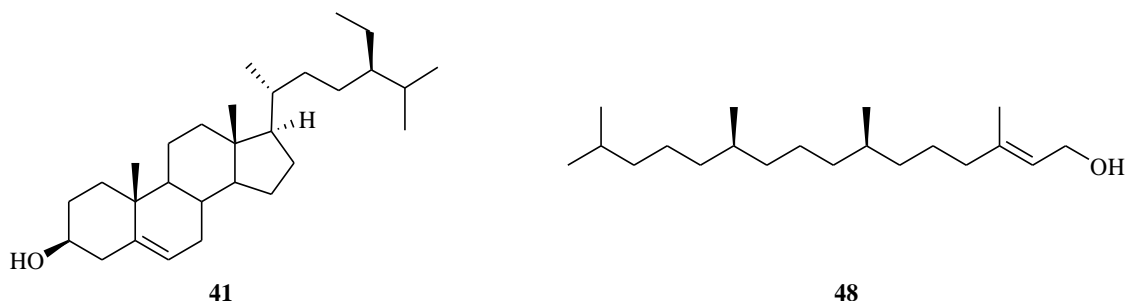


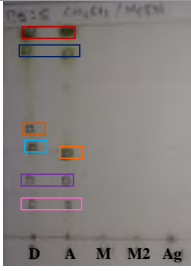
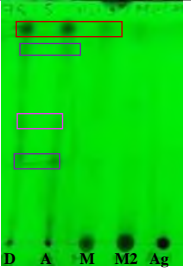
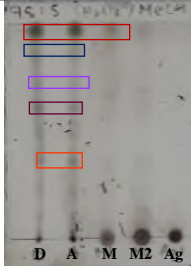
Figura 20. Metabolitos secundarios identificados por TLC.

El compuesto β-sitosterol es un metabolito secundario de naturaleza esteroidal clasificado dentro del grupo de los fitosteroles (isopentenoides policíclicos hidroxilados), que son compuestos presentes comúnmente en aceites

vegetales, semillas y nueces. Los fitosteroles son conocidos por la variedad de actividades biológicas que poseen; se ha descrito que β -sitosterol presenta actividad anti-inflamatoria, antipirética e inmuno-moduladora; por otro lado, debido a su similitud con el colesterol, posee un efecto reductor de los niveles de colesterol además de un efecto antineoplásico.⁶³ En este último contexto, se han utilizado diferentes modelos de cáncer para evaluar la actividad antiproliferativa de β -sitosterol, entre los resultados obtenidos destaca el hecho de que este metabolito secundario posee un efecto dual, en el que a concentraciones bajas (1-150 $\mu\text{mol/L}$) favorece el crecimiento de la línea celular MCF-7 (modelo *in vitro*), hasta 2.4 veces mayor con respecto al control negativo; mientras que en ratones atímicos ovariectomizados (modelo *in vivo*) la introducción de β -sitosterol a través de la dieta tiene un efecto de protección contra el crecimiento del tumor implantado (estimulado con 17β -estradiol).⁶⁴ Por su parte, fitol, es un metabolito secundario producido por la mayoría de los organismos fotosintéticos ya que es una molécula que forma parte de la clorofila, por lo que es considerado el isoprenoide acíclico mayoritario en la biósfera; este compuesto posee una gran cantidad de actividades biológicas, entre las que destacan su actividad antimicrobiana (*E. coli*, *S. aureus*, *A. niger*, etc.), anticonvulsionante (ratones *Swiss*), anti-inflamatoria (edema inducido), anti-diabética (ratas Wistar), y anticancerígena (células MDA-MB-231).⁶⁵ Sin embargo, en el caso de ambos metabolitos no se han establecido completamente los mecanismos de acción que siguen para presentar dichos efectos biológicos.

En un segundo ensayo, para desplazar los metabolitos retenidos en el punto de aplicación de los extractos más polares (CH_2Cl_2 en adelante) se aumentó la polaridad de la fase móvil a un sistema de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:05), lo que permitió observar al menos 9 compuestos diferentes (sistema, al revelar bajo radiación UV-365 nm) con factores de retención que oscilan entre 0.13 y 0.97 (Tabla 7).






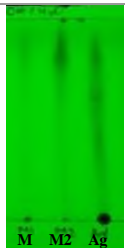

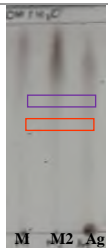
Tabla 7. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (2).

Sistema de elución: CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95:05)							
Luz Visible			UV-254 nm		H ₂ SO ₄ , Δ		
							
0.97	0.39	0.25	0.97	0.57	0.97	0.51	
0.88	0.38	0.13	0.88	0.37	0.85	0.35	
0.50					0.62		

Nota: D: CH₂Cl₂, A: AcOEt, M: MeOH 1, M2: MeOH 2, Ag: Agua.

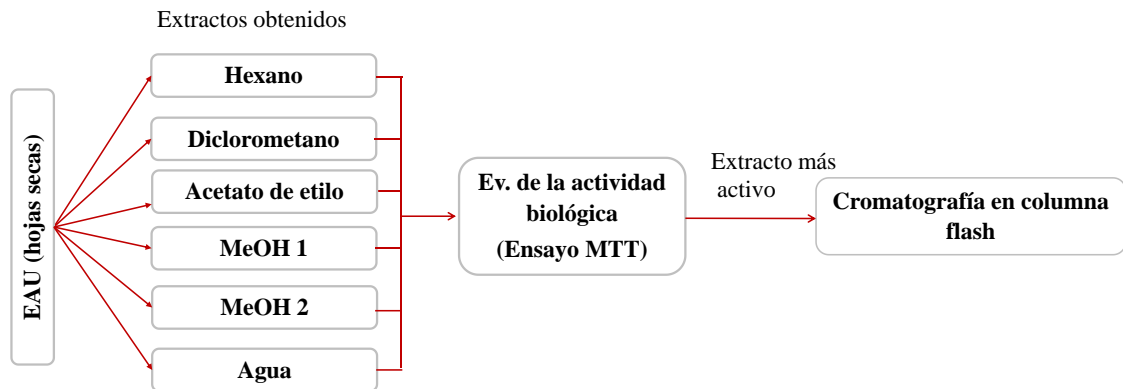
Debido a que con el sistema de elución anterior no fue posible separar los compuestos de los extractos más polares (MeOH 1 en adelante), se incrementó la proporción de MeOH a 50% en CH₂Cl₂ y posteriormente 90% en agua. Con este último sistema se observaron al menos 7 compuestos (Tabla 8) en las fracciones del extracto metanólico y el extracto acuoso, al revelar a placa con radiación UV a 365 nm.

Tabla 8. Resultados del análisis cualitativo preliminar de los extractos mediante TLC (3).

Sistema de elución: CH ₂ Cl ₂ /MeOH (50:50)							
Luz Visible		UV-254 nm		UV-365 nm		H ₂ SO ₄ , Δ	
							
0.97	0.81	0.97	0.81	0.97	0.81	0.97	0.81
Sistema de elución: MeOH/H ₂ O (90:10)							
Luz Visible		UV-254 nm		UV-365 nm		H ₂ SO ₄ , Δ	
							
0.93	0.82	-	-	0.94 0.84 0.75	0.66 0.42 0.31	0.93	0.82

Nota: M=MeOH 1, M2=MeOH 2, Ag=Agua.

9.5 Evaluación preliminar de la actividad citotóxica



Esquema 4. Evaluación preliminar de la actividad citotóxica.

La actividad citotóxica de los seis extractos obtenidos se evaluó frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, a través del ensayo de MTT (Esquema 4), siendo el extracto **MeOH 2** el que presentó la mayor disminución de la proliferación celular de manera dosis-dependiente (Figura 21). El mejor efecto fue observado a la dosis de 1 mg/mL, con una inhibición del crecimiento del 37.94% con respecto al control negativo

(supervivencia=62.06%). Por otro lado, es importante mencionar que los extractos no polares a polaridad media (Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt) indujeron un aumento en el crecimiento de la población celular, de los cuales el extracto hexánico (concentración=0.06 mg/mL) presentó el mayor porcentaje de proliferación, con un aumento de aproximadamente 4 veces la cantidad de células presentes en el control negativo (medio de cultivo + vehículo de disolución del extracto). Este comportamiento puede atribuirse a la presencia del metabolito secundario β-sitosterol, el cual fue identificado en los tres extractos mencionados mediante el análisis por TLC, y se ha demostrado a través de estudios *in vitro* que induce un aumento en la proliferación de la línea celular MCF-7, como consecuencia del efecto estrogénico que presenta sobre dicha línea celular.⁶³

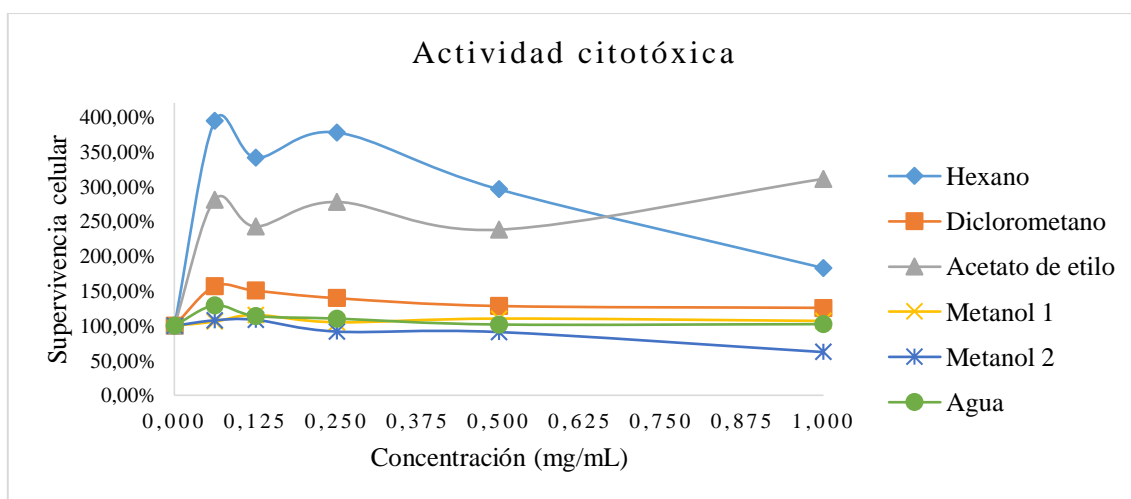


Figura 21. Evaluación citotóxica preliminar de los extractos.

Nota: Los resultados son expresados como la media de los datos obtenidos. El primer punto de la curva corresponde al control negativo.

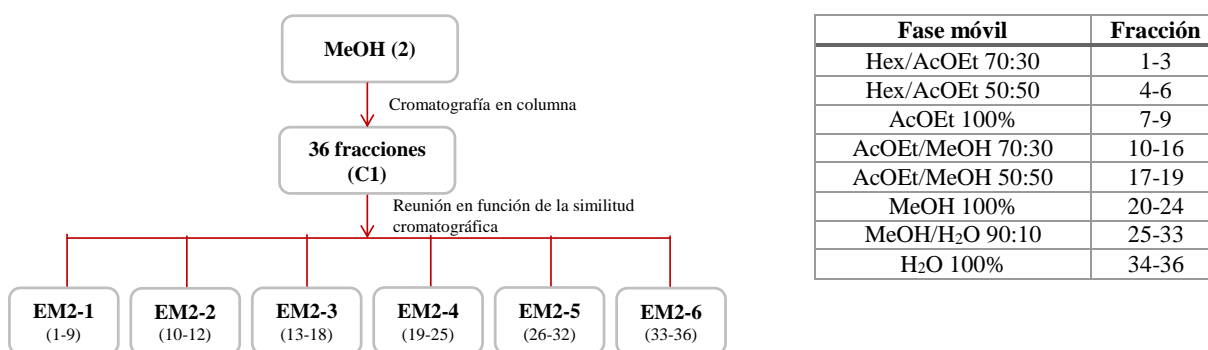
La actividad citotóxica no ha sido descrita para la especie *T. pallida*, sin embargo, otras especies del género han presentado resultados promisorios a nivel extracto, como es el caso de *T. spathacea*, cuyo extracto hidroalcohólico posee actividad citotóxica contra la línea celular MCF-7, de hasta el 50% de inhibición del crecimiento a una concentración de 229 µg/mL.⁵

En un estudio alterno, al realizar la evaluación de 10 extractos de polaridad ascendente de las hojas de *T. spathacea*, se comprobó que sus extractos polares (acuoso, metanólico y etanólico) poseen actividad citotóxica específica contra diferentes líneas de cáncer como HT-29, Hep-G2 y PC-3 a concentraciones bajas (10 µg/mL).⁶ Además, mediante un análisis a través de HPLC-MS-TOF se comprobó que los extractos evaluados poseen metabolitos secundarios pertenecientes a la familia de los compuestos fenólicos (antocianinas, y los ácidos:

ferúlico, clorogénico, *p*-cumárico, etc.), los cuales además de su efecto citotóxico, también presentan efectos benéficos sobre la salud ya que actúan como agentes antioxidantes y antimicrobianos. El efecto citotóxico de metabolitos secundarios como el ácido ferúlico y algunas antocianinas ha sido atribuido a su capacidad de intervenir y modificar mecanismos del ciclo celular, además de ofrecer quimioprotección hacia las células sanas en las etapas tempranas de la enfermedad.

Debido a que es común observar similitud en el perfil de metabolitos secundarios que producen especies vegetales que pertenecen al mismo género, se espera que la especie *T. pallida* presente entre sus constituyentes químicos estas moléculas o derivados de ellas en las fracciones de mayor polaridad (extractos MeOH 1, MeOH 2 y acuoso), es por ello que resulta congruente inferir que los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos que compartan estas dos especies se conserve, siendo la apoptosis uno de los mecanismos que se ve favorecido por la presencia de compuestos polares como los polifenoles.¹⁴

9.6 Separación cromatográfica del extracto MeOH 2 (C1)



Esquema 5. Procedimiento de la separación cromatográfica C1.

Con base en los resultados obtenidos para la evaluación biológica, se eligió el extracto MeOH 2. Durante la separación cromatográfica C1 se colectaron 36 fracciones de aproximadamente 50 mL, mediante un gradiente de polaridad, iniciando con un sistema de elución de Hex/AcOEt (70:30), hasta eluir completamente con sistemas polares como MeOH/H₂O (Esquema 5). El seguimiento de la separación se realizó mediante TLC, con el uso de tres agentes reveladores (Tabla 9).

Tabla 9. Perfil cromatográfico mediante TLC de las fracciones de C1

	Fracciones C1			
	2 – 10 Hex/AcOEt (70:30)	12 – 20 Hex/AcOEt (50:50)	22 – 30 <i>n</i> -BuOH/H ₂ O (4:0.5)	28 – 32 <i>n</i> -BuOH/H ₂ O (4:1)
UV-254 nm				
UV-365 nm				
Ninhidrina, Δ				

Después de observar el perfil cromatográfico de las fracciones, se estableció un criterio de similitud con base en el revelador ninhidrina (**49**), el cual es un agente químico que reacciona de forma selectiva con compuestos que contienen aminas primarias principalmente (Figura 22), para producir un derivado colorido conocido como púrpura de Ruhemann (**50**).⁶⁶

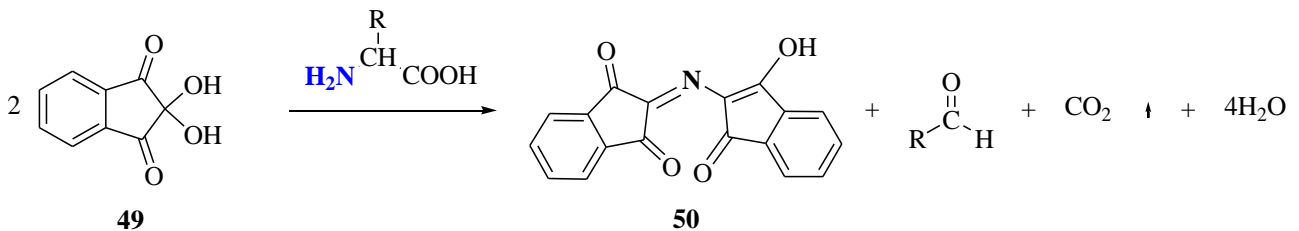


Figura 22. Reacción entre el revelador ninhidrina y un aminoácido genérico.

A través del criterio de similitud cromatográfica, las 36 fracciones obtenidas de C1 se reunieron en 6 sub-fracciones representativas, con la finalidad de repetir el ensayo de citotoxicidad y asociar la actividad biológica

del extracto original a una fracción de menor complejidad. Tomando como rendimiento del 100% a la cantidad total de extracto obtenida durante la separación, la tendencia observada en los rendimientos de las sub-fracciones sigue el orden: EM2-4 > EM2-3 > EM2-5 > EM2-6 > EM2-2 > EM2-1 (Tabla 10), siendo la sub-fracción EM2-4 la más abundante (38.51% m/m).

Tabla 10. Reunión de las fracciones de C1 en función de la similitud cromatográfica (Ninhidrina, Δ).

Fracciones	Clave	Cantidad (mg)	Rendimiento* (% m/m)
1-9	EM2-1	92,3	2.81
10-12	EM2-2	137,1	4.17
13-18	EM2-3	877,1	26.68
19-25	EM2-4	1162,4	35.36
26-32	EM2-5	565,5	17.20
33-36	EM2-6	183.6	5.59
Masa total=3.018 g			91.81

*Rendimiento con respecto a la cantidad de extracto inicial

9.7 Evaluación de la actividad citotóxica de las sub-fracciones del MeOH 2

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación biológica de las sub-fracciones del extracto MeOH 2, se observaron tres comportamientos diferentes (Figura 23): a) Las sub-fracciones **EM2-1** y **EM2-2** no presentaron actividad citotóxica significativa, b) Las sub-fracciones **EM2-3** y **EM2-4** disminuyeron el crecimiento de los cultivos de manera favorable, y por el contrario, c) Las subfracciones **EM2-5** y **EM2-6** a concentraciones bajas indujeron un aumento en la proliferación celular con respecto al control negativo (medio de cultivo, representado como el primer punto de la curva dosis-respuesta). En cuanto a la evaluación de las sub-fracciones **EM2-3** y **EM2-4**, al administrar una dosis de 1 mg/mL se observó una inhibición del crecimiento celular del 23.4%, este porcentaje se incrementó hasta $\approx 55.4\%$ al duplicar la dosis administrada (2 mg/mL), es decir, a concentraciones superiores de 1 mg/mL ambas sub-fracciones presentan el mismo porcentaje de inhibición. Debido a que el porcentaje de inhibición es congruente con lo observado durante la evaluación preliminar de los extractos crudos, se asume que fue posible enriquecer los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica en dos sub-fracciones con menor complejidad que el extracto original.

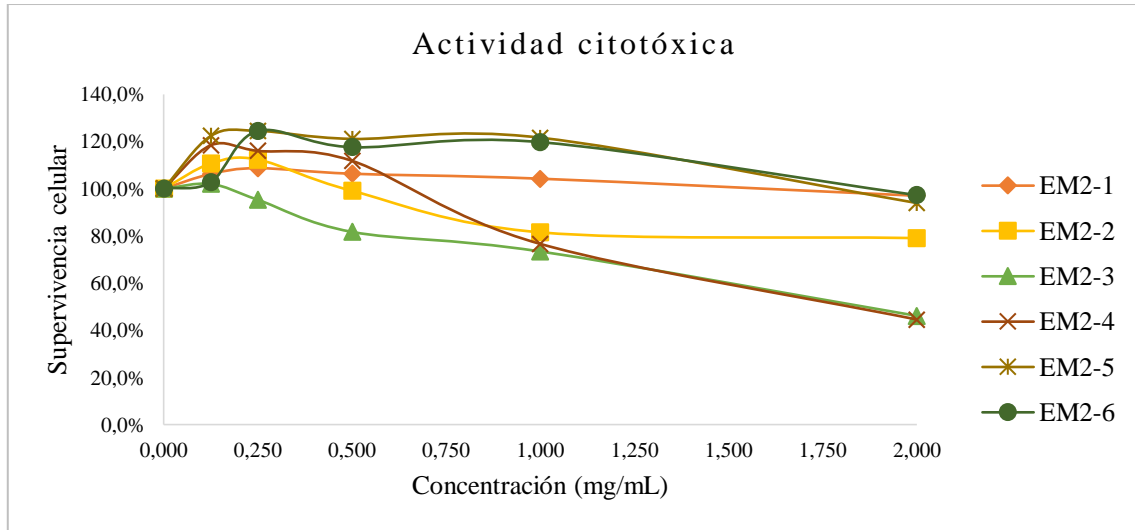


Figura 23. Resultados de la evaluación citotóxica de las sub-fracciones de MeOH 2.

Nota: Los resultados son expresados como la media de los datos obtenidos. El primer punto de la curva corresponde al control negativo.

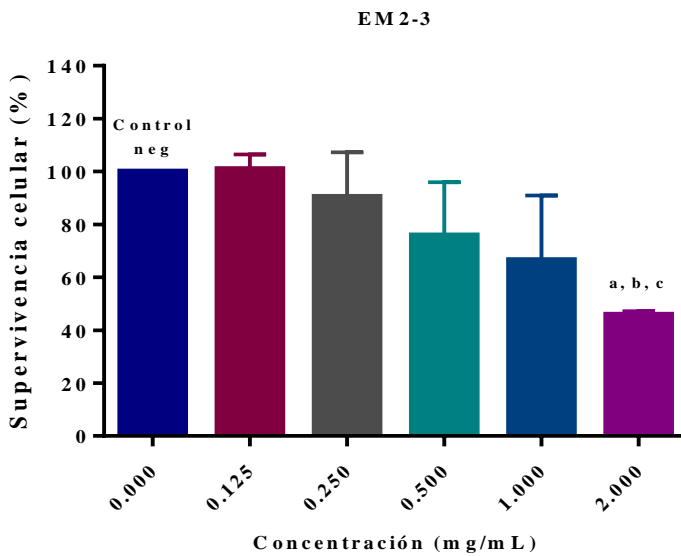
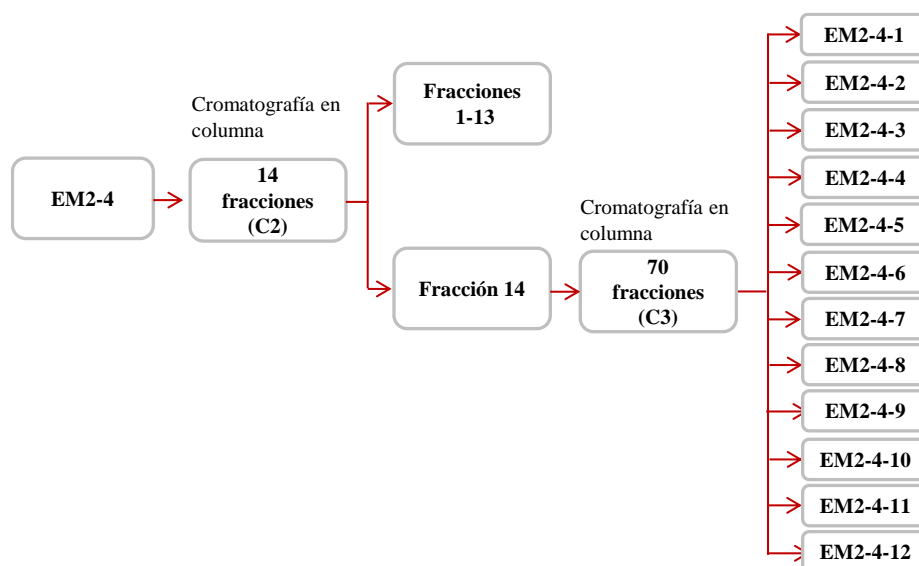


Figura 24. Análisis de varianza de EM2-3.

^ap < 0.05 vs Control, ^bp < 0.05 vs 0.125, ^cp < 0.05 vs 0.250.

Para determinar si existe diferencia significativa entre la respuesta observada con respecto a las concentraciones evaluadas se realizó un análisis de varianza de un factor (one-way ANOVA) mediante el software GraphPad Prism 6. A través de este análisis estadístico se determinó que la sub-fracción EM2-3 (concentración=2 mg/mL) presentó un nivel de significancia adecuado al compararlo con la respuesta observada para el control negativo (Figura 24), por lo que se concluye que sí existe diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas.

9.8 Separación cromatográfica de la sub-fracción EM2-4



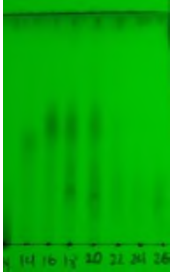





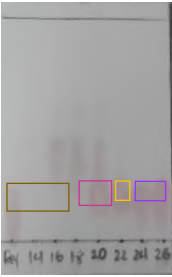
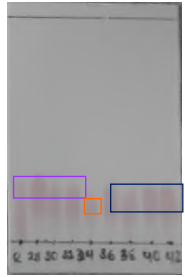


Esquema 6. Procedimiento de las separaciones cromatográficas C2 y C3.

Para realizar el fraccionamiento de una de las sub-fracciones activas (EM2-4) se realizaron dos separaciones cromatográficas (Esquema 6), utilizando procedimientos isocráticos basados en la adición de eluyentes de composición polar.

C2: Se colectaron 13 fracciones de aproximadamente 10 mL utilizando el sistema inicial de elución ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:20:05), sin embargo, la cantidad de agua utilizada sobrepasó la capacidad del sistema para formar una mezcla homogénea, como consecuencia la separación no fue adecuada por lo que se eluyó totalmente el extracto con un sistema $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10). La muestra se recuperó y se realizó una tercera separación tomando como punto de partida la fracción número 14, que corresponde al lavado de la columna cromatográfica con un sistema hidroalcohólico.

C3: Se colectaron 70 fracciones de aproximadamente 10 mL utilizando un proceso de separación isocrático ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80:20:01), al realizar el perfil cromatográfico mediante TLC (Tabla 11) se observó que a través de la separación cromatográfica C2 se lograron aislar los metabolitos que fluorescen en color rojo al revelar las placas a 365 nm (fracciones 12 a 20 de C1).

Tabla 11. Perfil cromatográfico mediante TLC de las fracciones obtenidas de C3.

	Fracciones C3			
	CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O (80:20:1)			
	14 – 26 1 elución	28 – 42 1 elución	44 – 50 2 eluciones	54 – 70 3 eluciones
UV-254 nm				-
UV-365 nm				-
Ninhidrina, Δ				

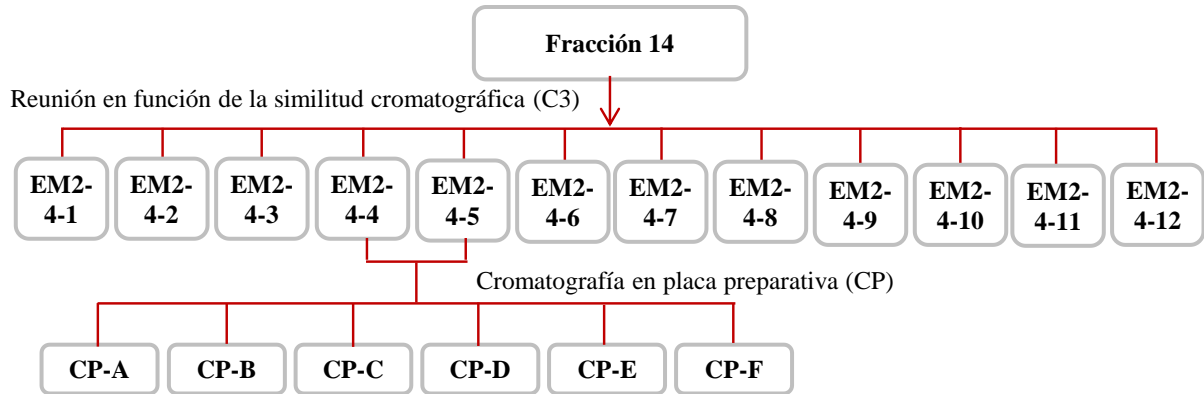
A partir de la fracción 54, hasta la fracción 70, se observó el mismo comportamiento en las placas cromatográficas, por lo que se decidió terminar la separación. Se eluyó la columna cromatográfica con 100 mL de MeOH y posteriormente con 120 mL de un sistema MeOH/H₂O (90:10). Durante la elución con MeOH se observó el desplazamiento de una banda de color marrón que se colectó por separado. De acuerdo a la similitud cromatográfica observada se hicieron 12 reuniones, que en conjunto representan un rendimiento del 99.72% con respecto a la cantidad de extracto inicial (Tabla 12), siendo la fracción EM2-C3-12 la más abundante (19.81% m/m).

Tabla 12. Resumen de la separación cromatográfica C3.

Fracciones	Clave	Cantidad (mg)	Rendimiento* (% m/m)
1-12	EM2-C3-1	13.6	2.05
13-18	EM2-C3-2	94.7	14.29
19-21	EM2-C3-3	50.8	7.66
22	EM2-C3-4	13.9	2.10
23-32	EM2-C3-5	109.7	16.55
34	EM2-C3-6	6.4	0.97
33, 35-42	EM2-C3-7	56.7	8.55
43-51	EM2-C3-8	36.9	5.57
52	EM2-C3-9	4.8	0.72
53-70	EM2-C3-10	73	11.01
Lav. metanólico	EM2-C3-11	69.2	10.44
Lav. hidroalcohólico	EM2-C3-12	131.3	19.81
Masa total=661 mg			Rendimiento total=99.72%

*Rendimiento con respecto a la cantidad de extracto inicial

9.9 Separación mediante cromatografía en placa preparativa (CP)



Esquema 7. Procedimiento de la separación mediante CP.

Debido a que al realizar los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas de C3, se logró resolver adecuadamente los metabolitos secundarios mayoritarios, se decidió escalar el procedimiento empleado a través de cromatografía en placa preparativa para determinar si el comportamiento observado en TLC se conservaba. Para ello se utilizaron las sub-fracciones EM2-4-4 y EM2-4-5 (Esquema 7), ya que hasta el momento eran las que sumaban el mayor rendimiento de C3.



Figura 25. a) CP revelada bajo radiación UV-365 nm. b) CP revelada con ninhidrina, Δ .

Al observar la placa bajo radiación ultravioleta de 365 nm se observaron 2 bandas que fluorescían en color azul (Figura 25a). Tras revelar con el agente químico ninhidrina se observaron 3 bandas adicionales a las identificadas mediante radiación ultravioleta (Figura 25b). Las 5 bandas más la línea de aplicación se retiraron de la placa, y se etiquetaron con las letras A a F en orden ascendente con las siguientes claves: CP-A, CP-B, CP-C, CP-D, CP-E, CP-F (iniciando con la banda correspondiente a la línea de aplicación).

9.10 Caracterización estructural

Se eligieron muestras representativas de cada sistema para llevar a cabo la elucidación estructural correspondiente. Para las fracciones provenientes de CC (C3) se seleccionaron las fracciones C3-6, C3-7, C3-11, ya que de acuerdo a los perfiles de TLC estas muestras presentaron un rango completo de los posibles metabolitos presentes. Por otra parte, para el caso de cromatografía en placa preparativa, se seleccionaron las muestras CP-D, CP-F y CP-G, debido principalmente a que son las fracciones que presentaron mejor pureza mediante TLC.

9.10.1 Resonancia magnética nuclear

Mediante diferentes experimentos de RMN (Figuras 26 y 27) se determinó que la muestra C3-7 está compuesta por una mezcla de metabolitos en diferentes proporciones, entre los que destacan L-fenilalanina (**51**) y L-arabinitol (**52**). Cabe mencionar que a través de estos experimentos de RMN no es posible establecer la configuración absoluta de los compuestos mencionados, sin embargo, debido a que en la naturaleza la configuración L es la disposición espacial que adoptan los aminoácidos predominantemente,⁶⁷ y a que se realizó una comparación de datos espectroscópicos con dichos estereoisómeros, se asume que los metabolitos encontrados poseen esta configuración.

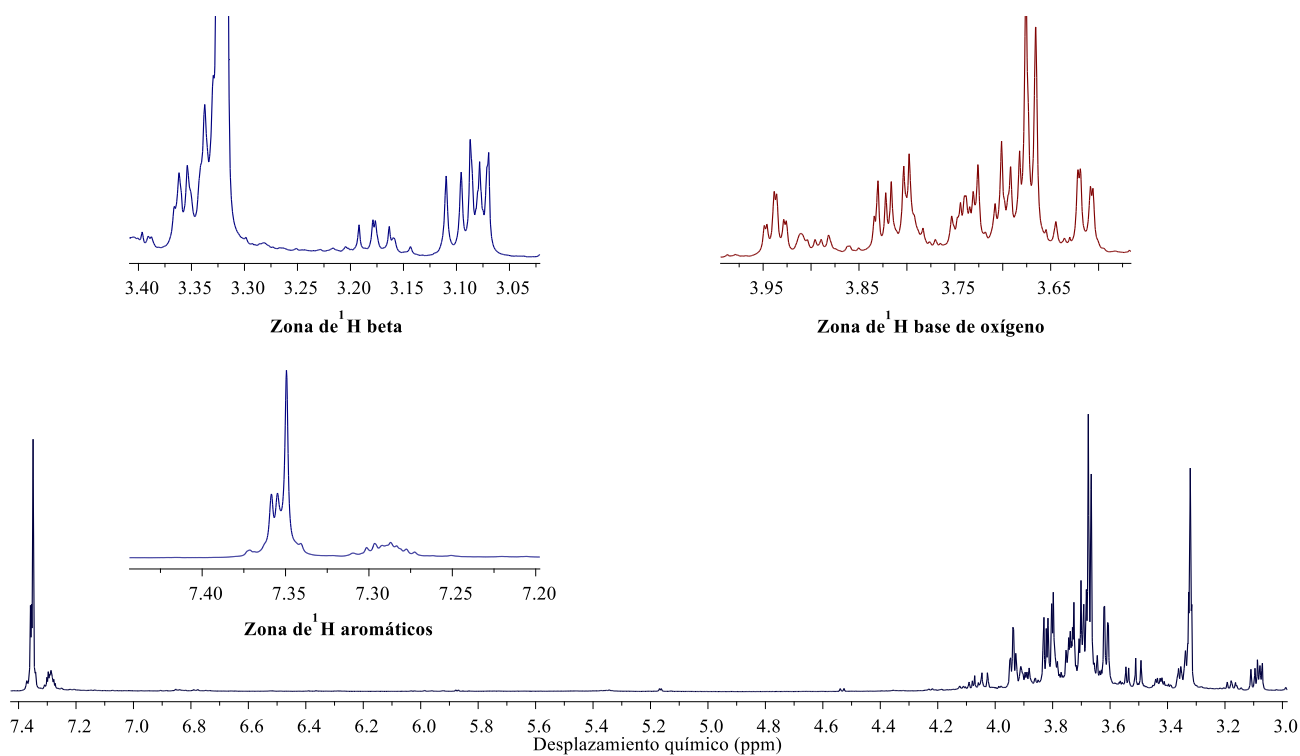


Figura 26. RMN de ^1H (Presat) de la fracción C3-7.

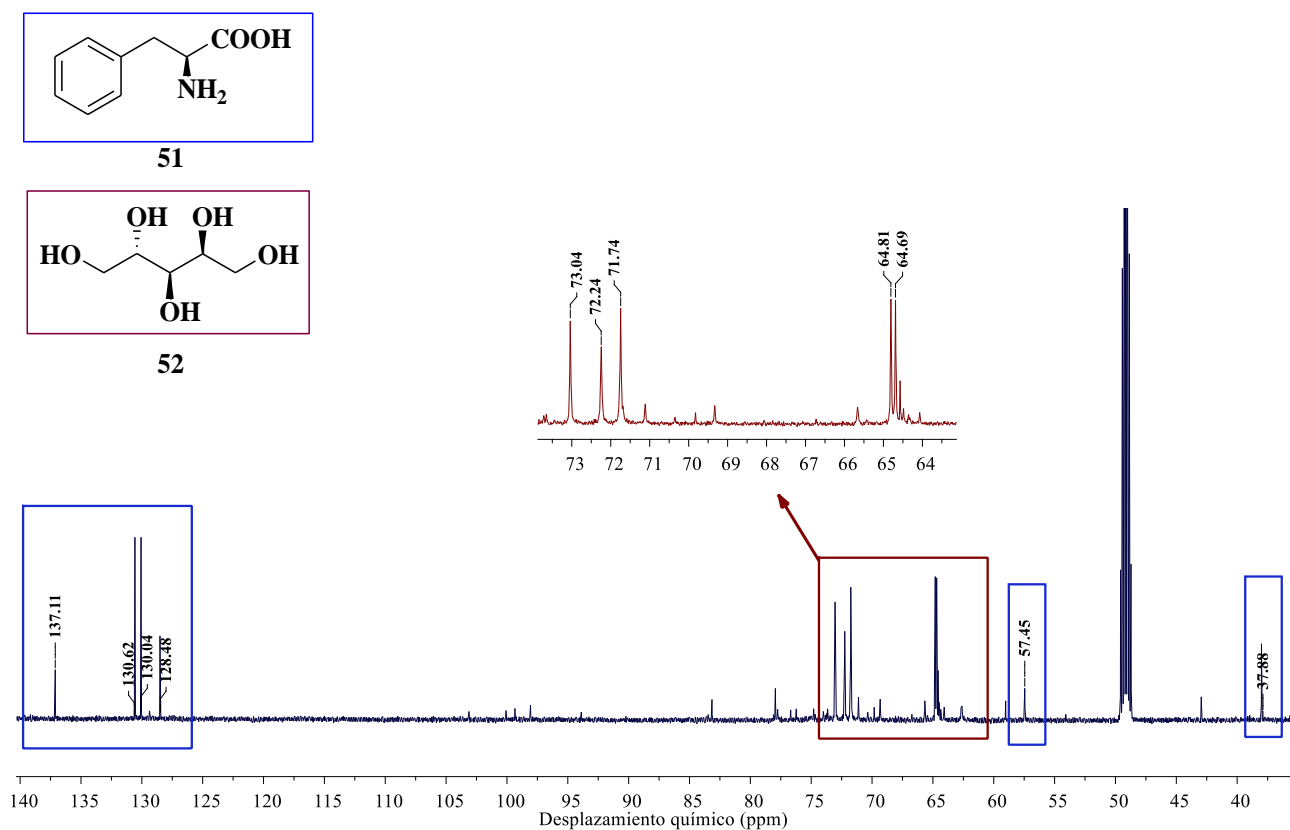


Figura 27. RMN de ^{13}C de la fracción C3-7.

Nota: Las señales resaltadas en azul pertenecen a la molécula de L-fenilalanina, mientras que las resaltadas en rojo pertenecen a L-arabinitol.

9.10.1.1 L-fenilalanina

En el espectro gCOSY de la muestra C3-7 (Figura 28), se observó la correlación entre las señales correspondientes a los hidrógenos β y β' (3.34 ppm y 3.08 ppm) los cuales a su vez presentan correlación con la señal del hidrógeno α (3.89 ppm).

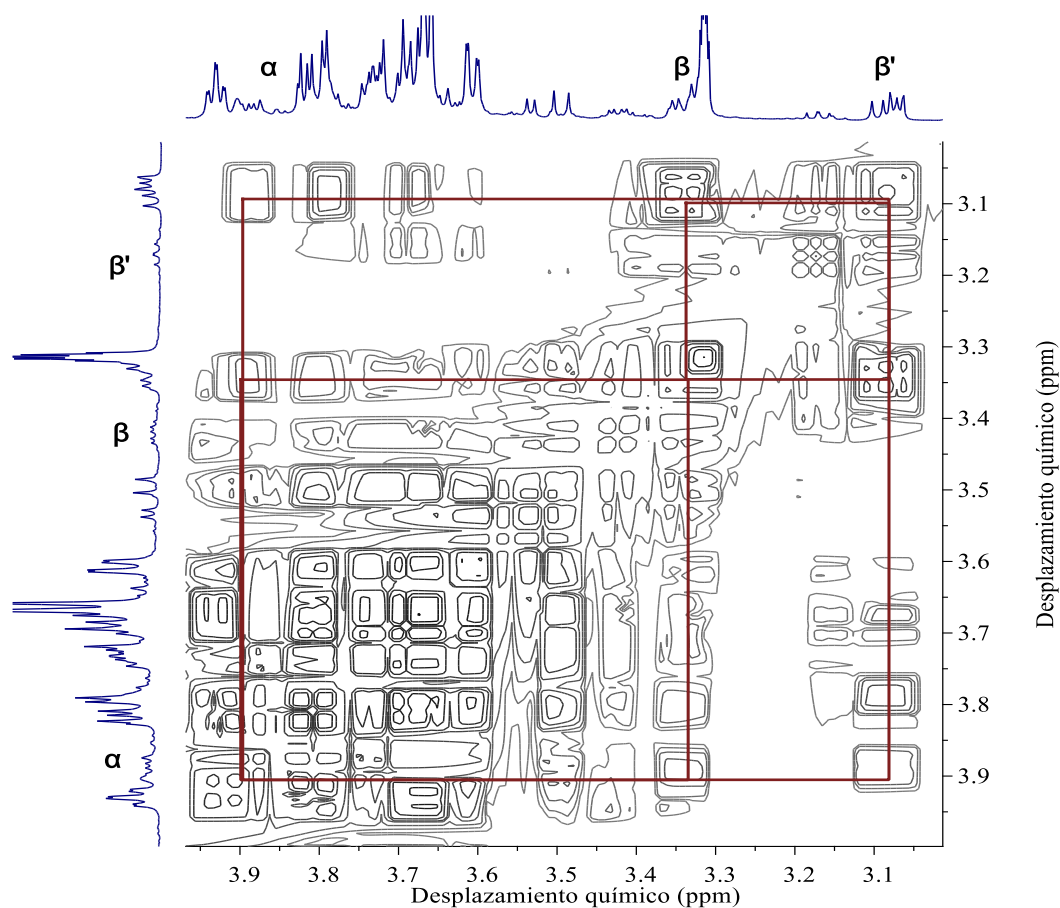
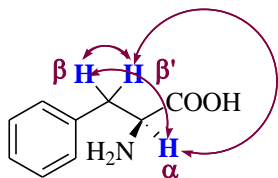


Figura 28. Espectro de RMN de gCOSY de la fracción C3-7.

A través del espectro gHSQC (Figura 29) se estableció la correlación entre los hidrógenos observados en gCOSY con su respectivo átomo de carbono; se determinó que los hidrógenos β y β' se encuentran unidos al mismo átomo (37.93 ppm), es decir se trata de hidrógenos de naturaleza diasterotópica, mientras que el hidrógeno α correlaciona para una señal en el espectro de ^{13}C (57.46 ppm).

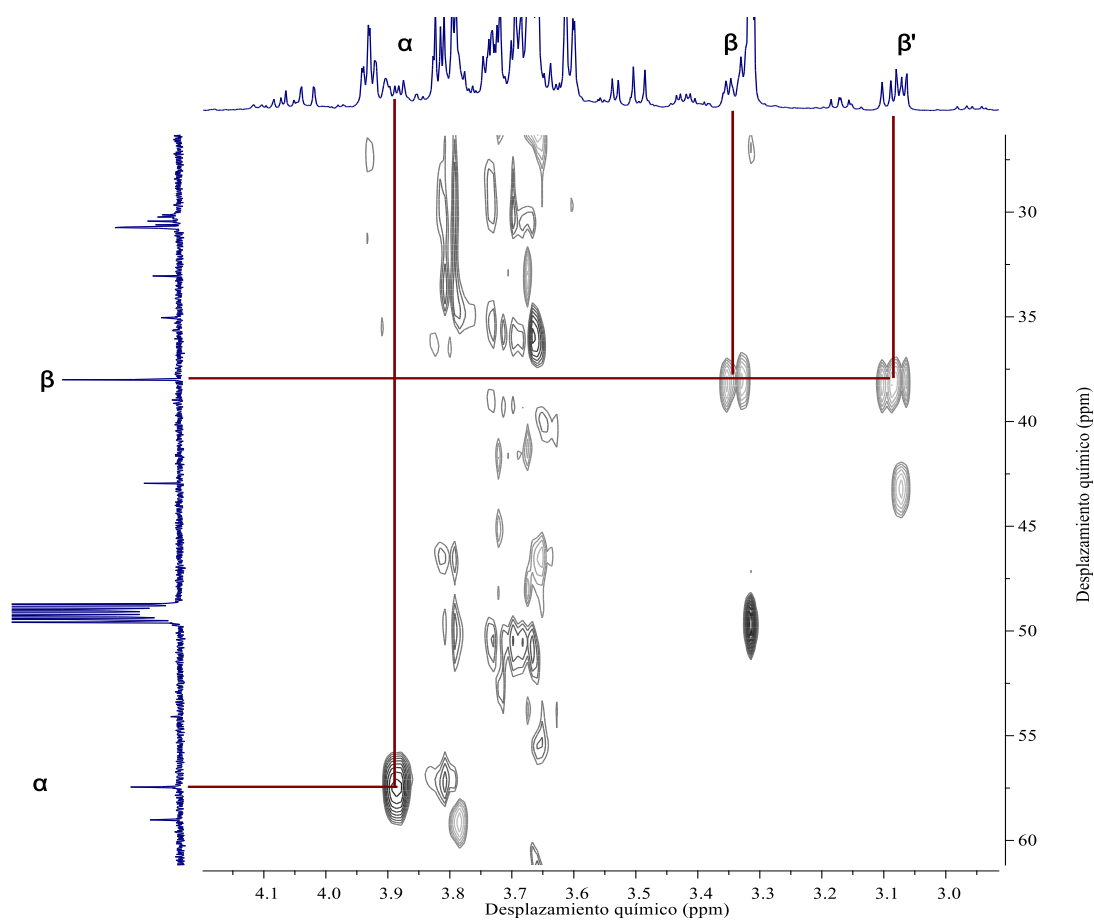
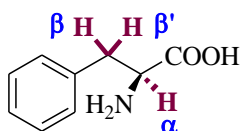


Figura 29. Espectro de RMN de gHSQC de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).

En la región aromática (Figura 30) se observa la correlación de los carbonos del anillo aromático (128.31, 130.09 y 130.59 ppm) con sus respectivos átomos de hidrógeno en la molécula, a excepción del carbono 1 (137.13 ppm) que no muestra correlación con ninguna señal del espectro de ^1H , lo que indica que se trata de un carbono cuaternario, es decir, el carbono *ipso* de la L-fenilalanina.

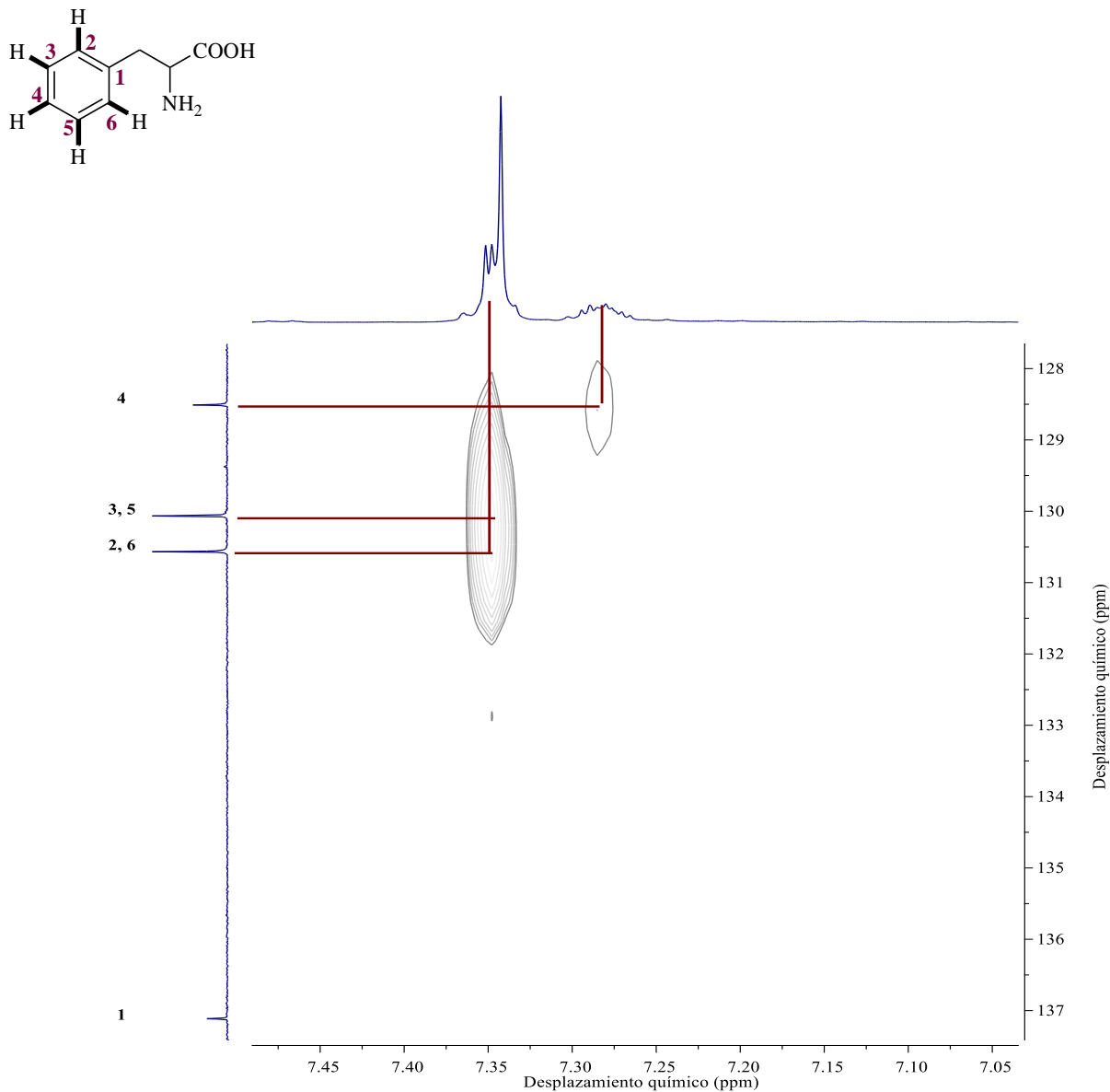


Figura 30. Espectro de RMN de gHSQC de la fracción C3-7 (zona aromática).

Por otro lado, en el espectro de gHMBC (Figura 31) se observaron correlaciones entre los hidrógenos β y β' (3.34 y 3.08 ppm) con los carbonos ubicados en la zona aromática (130.59 y 137.13 ppm), además de presentar correlación con el carbono α (57.46 ppm). También se observó una última serie de señales que no correlacionan con ninguna señal en el espectro de ^{13}C , debido al desplazamiento químico que comparten estas señales se puede inferir una última correlación entre los hidrógenos α , β y β' con un átomo de carbono cuaternario con un desplazamiento que coincide con el de un grupo carbonilo de un ácido carboxílico (174.37 ppm).

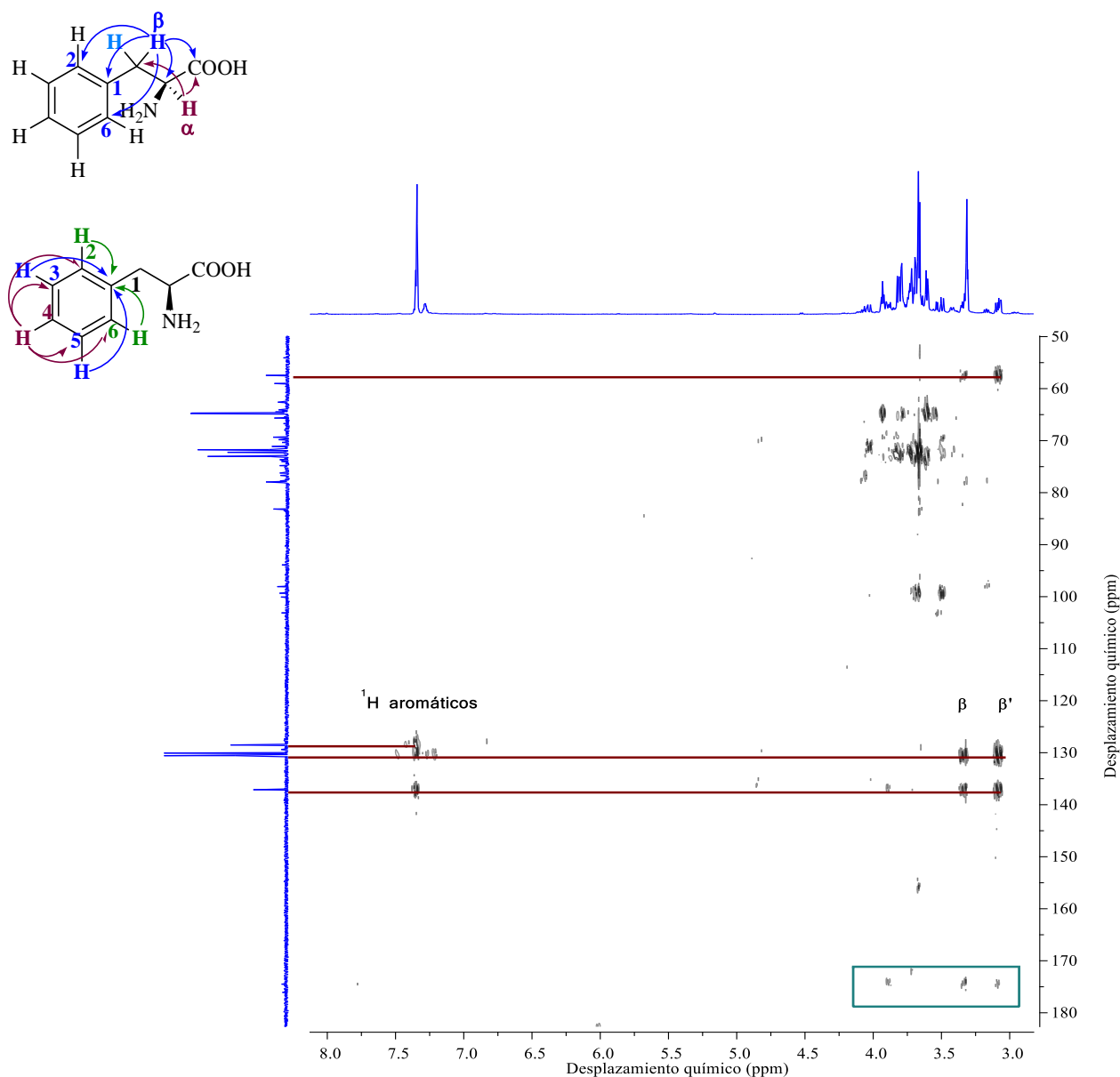
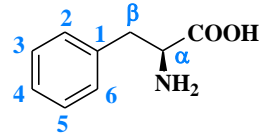


Figura 31. Espectro de gHMBC de la fracción C3-7.

A través del análisis de los espectros de ^1H , ^{13}C , gCOSY, gHSQC y gHMBC se realizó la asignación de las señales para L-fenilalanina (Tabla 13); dentro de las aplicaciones terapéuticas de este producto del metabolismo primario se encuentra el tratamiento de pacientes que padecen depresión o vitiligo, además de que su ingesta a través de la dieta es imprescindible por tratarse de un aminoácido esencial.^{68,69}

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN para la molécula de L-fenilalanina.

L-fenilalanina Fracción: C3-7 (EM2-4) Disolvente: CD ₃ OD				
Posición	^1H	^{13}C	gCOSY	gHMBC
α	3.89	57.46	β, β'	$\beta, \beta', 1, \text{C}=\text{O}$
β	3.34	37.93	α, β'	$\alpha, 1, 2, 6, \text{C}=\text{O}$
β'	3.08	37.93	α, β	$\alpha, 1, 2, 6, \text{C}=\text{O}$
1	-	137.13	-	-
3, 5	7.33-7.37	130.09	-	1
2, 6	7.33-7.37	130.59	-	1
4	7.26-7.31	128.31	3,5	2,6,3,5
C=O	-	174.37	-	-

9.10.1.2 L-arabinitol

Debido a que la muestra C3-7 es una mezcla de metabolitos cuyo espectro de ^1H se encuentra especialmente saturado en la zona de ^1H base de oxígeno, se realizó un experimento DOSY-Oneshot (Figura 32) para diferenciar las señales en éste y asociarlas a una molécula en particular, en función de su D . Al trazar una línea paralela al eje horizontal que intersecta el eje vertical en 2.89×10^{-6} (unidades de difusión) se observó que la recta hace contacto únicamente con cinco señales en esta zona del espectro, por lo que se determinó que pertenecen al mismo compuesto químico.

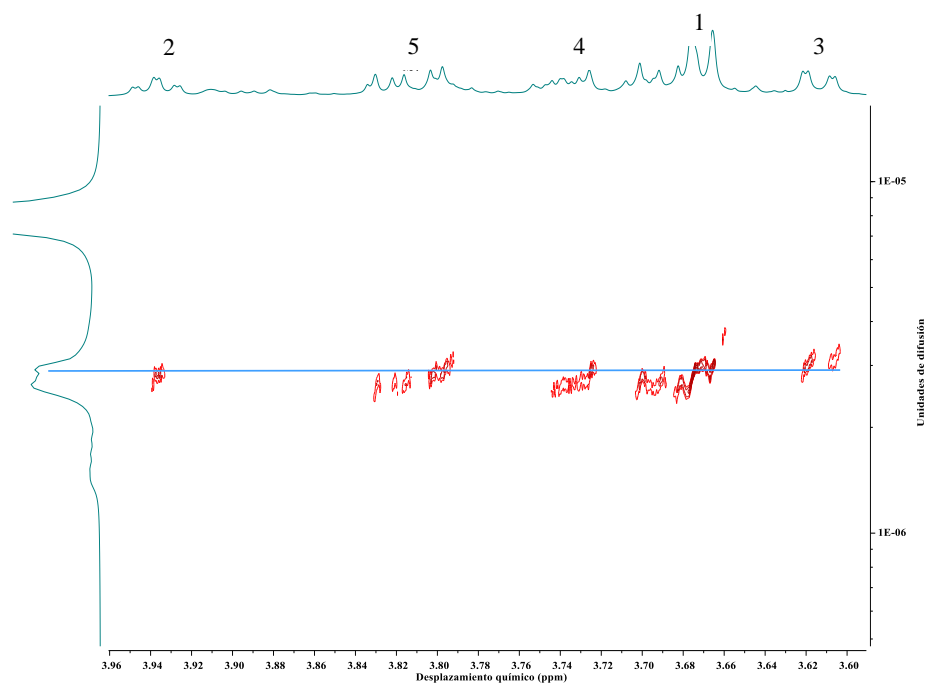


Figura 32. Espectro de RMN de DOSY-Oneshot de la muestra C3-7 (zona base de oxígeno).

Una vez identificadas las señales correspondientes para la molécula de L-arabinitol, se estableció el desplazamiento químico de cada una de ellas y se realizó su integración (Figura 33). Al cotejar los datos obtenidos con los descritos en la literatura,⁷⁰ se comprobó la proporción esperada para las dos señales externas que no presentan solapamiento (δ 3.61 y 3.94). Con la integración se llegó a la conclusión de que todas las señales a excepción del multiplete (δ 3.64-3.69) corresponden a un núcleo de hidrógeno, lo que es congruente ya que la molécula contiene 3 metinos; en el caso de los metilenos debido a que en ambos casos se trata de hidrógenos diasterotópicos, las señales se comportan como núcleos independientes, de las cuales una señal se encuentra en 3.81 ppm, mientras que las tres restantes caen dentro del intervalo 3.64-3.69 ppm.

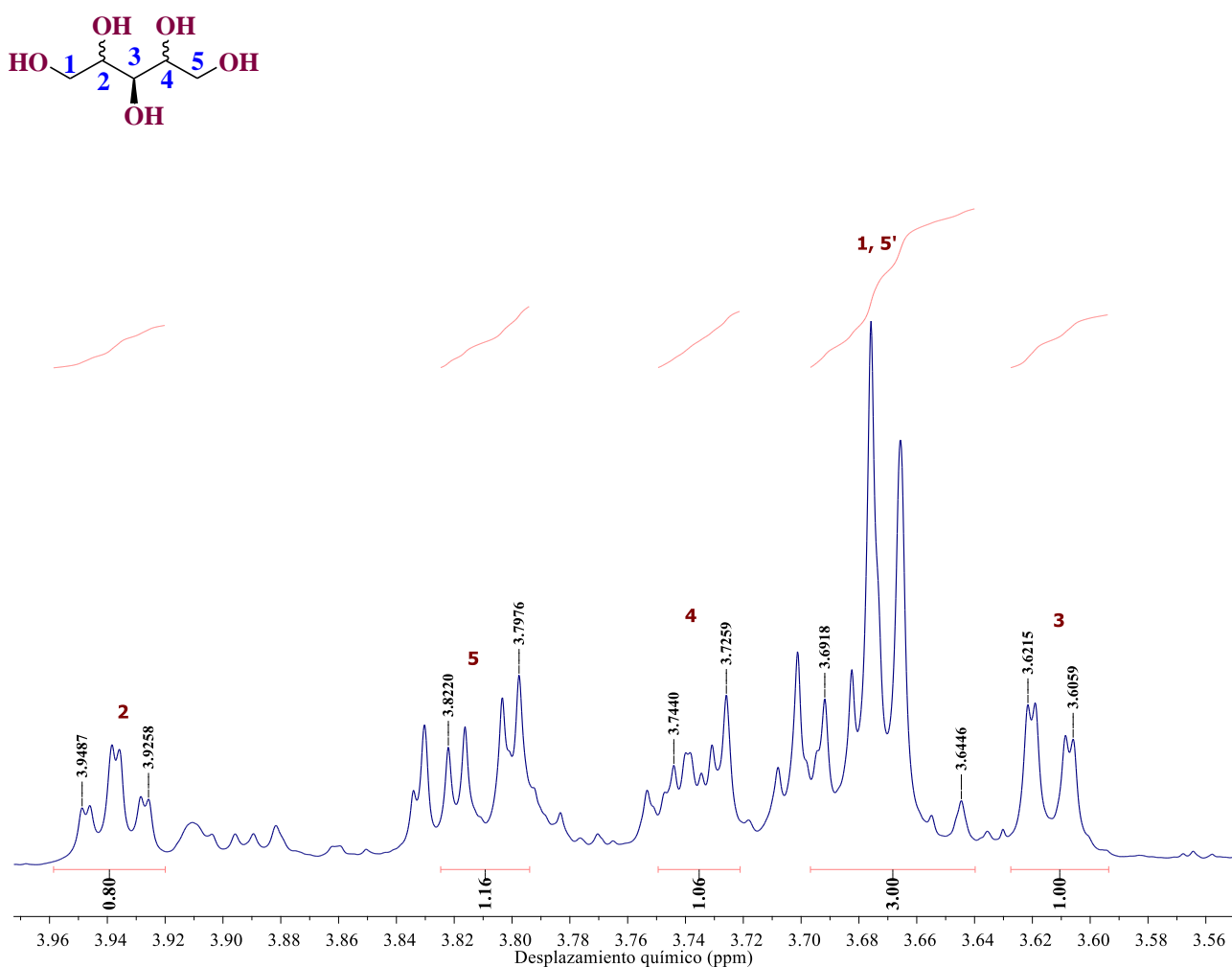


Figura 33. Espectro de ¹H de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).

En el análisis del espectro de gHSQC (Figura 34) se observaron las señales esperadas para la molécula, sin embargo, presentaron ligeras variaciones en cuanto al desplazamiento químico descrito,⁷¹ ya que las muestras se analizaron en diferentes disolventes (Tabla 14).

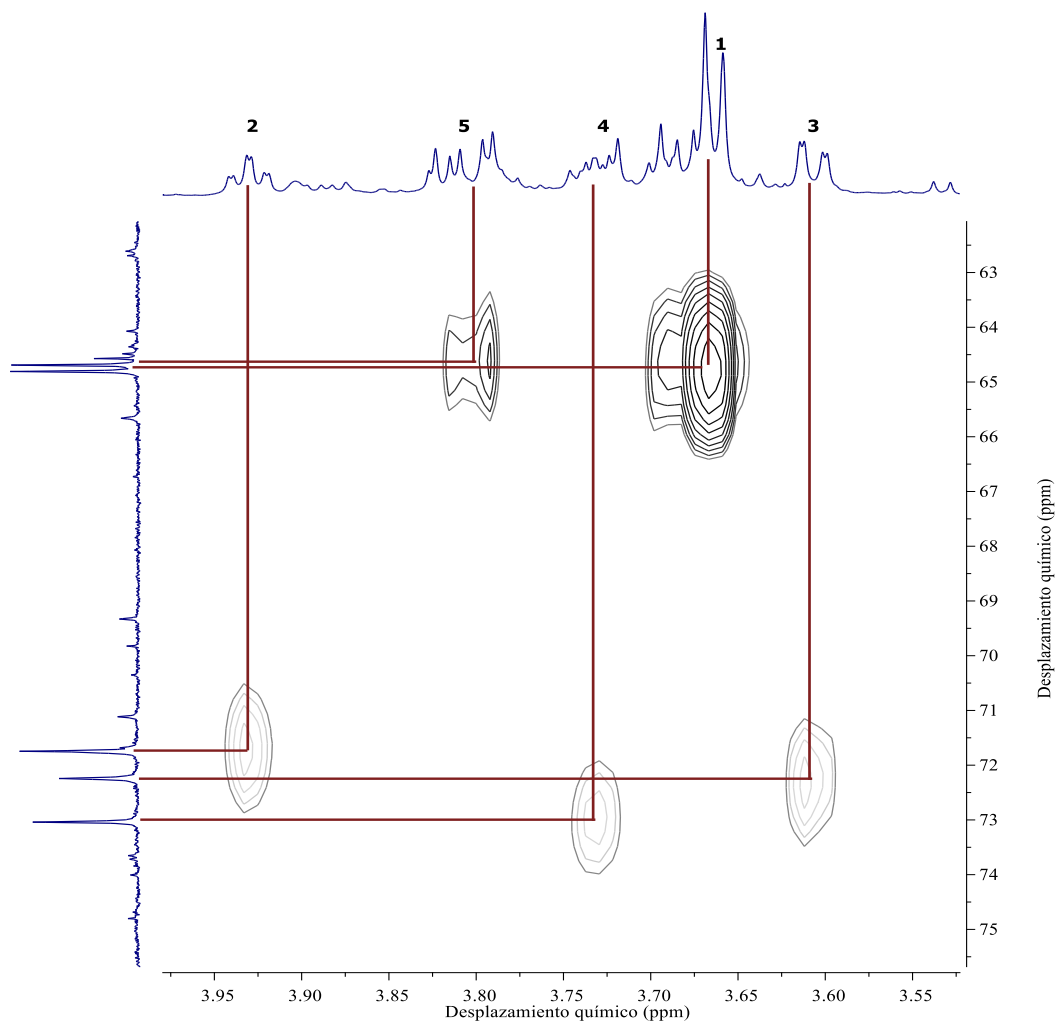


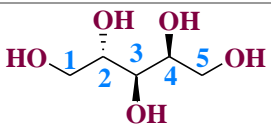
Figura 34. Espectro de gHSQC de la fracción C3-7 (zona base de oxígeno).

Una vez que se determinaron las correlaciones ^1H - ^{13}C (1 enlace) y se realizó la predicción de la multiplicidad de cada señal, se llevó a cabo el seguimiento de las correlaciones COSY descritas en la literatura para L-arabinitol.⁷² A través de esta comparación se concluyó que la señal en 3.61 ppm corresponde al átomo de hidrógeno en la posición 3, sin embargo, debido a que como ya se mencionó, existen 4 señales de hidrógenos diastereotópicos en la molécula con la misma conectividad, no es posible realizar su asignación de forma inequívoca con la información disponible, por lo que se llegó a la conclusión de que las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno unidos a los carbonos en las posiciones 1 y 5 pueden ser intercambiables.

Para determinar por similitud espectral que el metabolito presente en la muestra C3-7 es el polialcohol L-arabinitol, se consultaron en la literatura los espectros de ^1H correspondientes a sus diasterómeros (xilitol⁷³ y ribitol⁷⁴); de esta forma se concluyó que efectivamente se trata de la molécula mencionada (Tabla 14).

Este conjunto de moléculas pertenecen a la familia de los pentitoles, los cuales a través de diferentes estudios se ha demostrado que tienen aplicaciones biológicas en áreas como la industria alimenticia y terapéutica. Específicamente, L-arabinitol, tiene la capacidad de reducir la formación de tejido adiposo y prevenir la deposición de grasas en el tracto digestivo; además de funcionar como un bioindicador en la progresión de enfermedades como el Alzheimer.^{75,76}

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN para la molécula de L-arabinitol.

L-arabinitol Fracción: C3-7 (EM2-4) Disolvente: CD ₃ OD			
Posición	^1H (D ₂ O) ⁷⁰	^1H (experimental, CD ₃ OD)	^{13}C
1	3.63-3.68 (2H, m)	3.64-3.69 (2H, m)*	72.29
2	3.93 (1H, m)	3.94 (1H, td, $J= 6.1, 1.6$ Hz)**	64.79
3	3.56 (1H, dd)	3.61 (1H, dd, $J= 7.8, 1.5$ Hz)	73.08
4	3.74 (1H, m)	3.73 (1H, m) **	64.64
5	3.83 (1H, dd) 3.63-3.68 (1H, m)	3.81 (1H, dd, $J= 11.2, 3.5$ Hz)* 3.64-3.69 (1H, m)*	71.74

*/**Señales intercambiables entre sí

Nota: m: multiplete, td: triple de dobles, dd: doble de dobles.

9.10.2 Espectrometría de masas

En el análisis por MS modo ESI-(+) y ESI(-) de las fracciones representativas de las separaciones cromatográficas y de cromatografía preparativa antes mencionadas, se consideraron únicamente los iones cuyas señales superaron el 20% de abundancia relativa en cada uno de los modos de ionización.

Para el caso de los iones analizados en modo ESI-(+), se observaron 14 iones diferentes (Tabla 15), cuya relación m/z oscila entre 129.0040 y 575.4136. De estas señales se estableció que los iones de $m/z=360.3242$ y 421.2336 corresponden a los aductos con sodio de los iones 338.3419 y 399.2515 , de los cuales 338.3419 está identificado como el compuesto erucamida,⁷⁷ un contaminante proveniente del polietileno del material de laboratorio. Por otro lado, también se observó el ion 175.0579 , el cual es producto de la formación de un aducto con agua del ión original 157.0357 .

Tabla 15. Iones observados mediante ESI-(+) en las muestras representativas (> 20% abundancia relativa).

Muestra	Iones observados (m/z)	
C3-6	[M+H] ⁺	129.0040, 157.0357, 203.0536, 245.0876, 338.3419
	[M + Na] ⁺	360.3242
	[M+H ₂ O] ⁺	175.0579
C3-7	[M + H] ⁺	129.0040, 157.0360
	[M+H ₂ O] ⁺	175.0584
C3-11	[M + H] ⁺	129.0039, 157.0360, 245.0864, 305.1354, 365.1060, 437.1943
CP-D	[M + H] ⁺	157.0358, 338.3422, 399.2513, 487.3609, 575.4136
	[M + Na] ⁺	421.2336
CP-F	[M + H] ⁺	338.2423, 399.2515
	[M + Na] ⁺	360.3246, 421.2335
CP-G	[M + H] ⁺	338.3421, 399.2516
	[M + Na] ⁺	421.2334

Por otro lado, en el caso del análisis en modo ESI(-) se observaron 18 iones diferentes, cuya relación m/z oscila entre 115.9316 y 555.2844 (Tabla 16). El ion 336.3272 es el análogo del ion contaminante 338.3419 identificado en ESI(+), y se encuentra en cuatro de las seis muestras analizadas.

Tabla 16. Iones observados mediante ESI(-) en las muestras representativas (> 20% abundancia relativa).

Muestra	[M - H] ⁻	Iones observados (m/z)
C3-6	[M - H] ⁻	115.9316, 134.8959, 151.0626 , 154.0727, 164.0727 , 255.2339 , 283.2648, 555.2841
C3-7	[M - H] ⁻	151.0626 , 164.0727 , 336.3272 , 555.2835
C3-11	[M - H] ⁻	149.0468, 163.0417, 341.1066, 377.0855
CP-D	[M - H] ⁻	209.9509, 255.2338 , 283.2653, 291.2009 , 336.3272
CP-F	[M - H] ⁻	255.2337 , 283.2653, 291.2009 , 317.0555, 336.3275 , 555.2842
CP-G	[M - H] ⁻	255.2336 , 281.2498, 283.2653, 291.2010 , 305.2161, 336.3275 , 555.2844

Mediante este segundo análisis se confirmó la presencia de los compuestos L-fenilalanina ($m/z=164.0727$, $C_9H_{11}NO_2$)⁷⁸ y L-arabinitol ($m/z=151.0626$, $C_5H_{12}O_5$)⁷⁹ en las fracciones C3-6 y C3-7 (Figuras 35 y 36). En la fracción C3-7 se observó uno de los iones provenientes de la fragmentación de la L-fenilalanina (147.0467) por debajo del 20% de abundancia relativa, correspondiente al fragmento que ha perdido el grupo amino de la molécula (ion=[M-H-NH₂]).⁷⁸

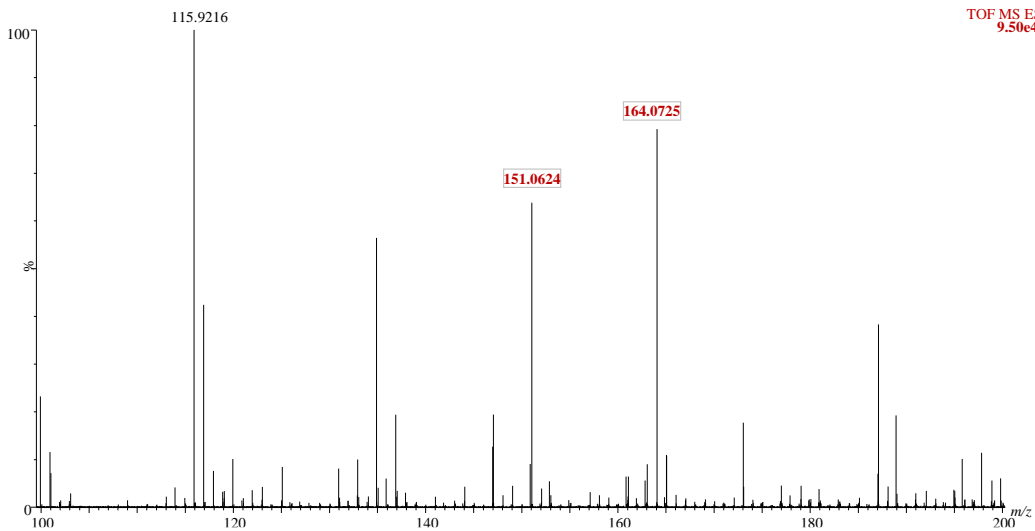


Figura 35. Espectro de ESI(-)-MS de la fracción C3-6 (ventana espectral: 100-200 Da).

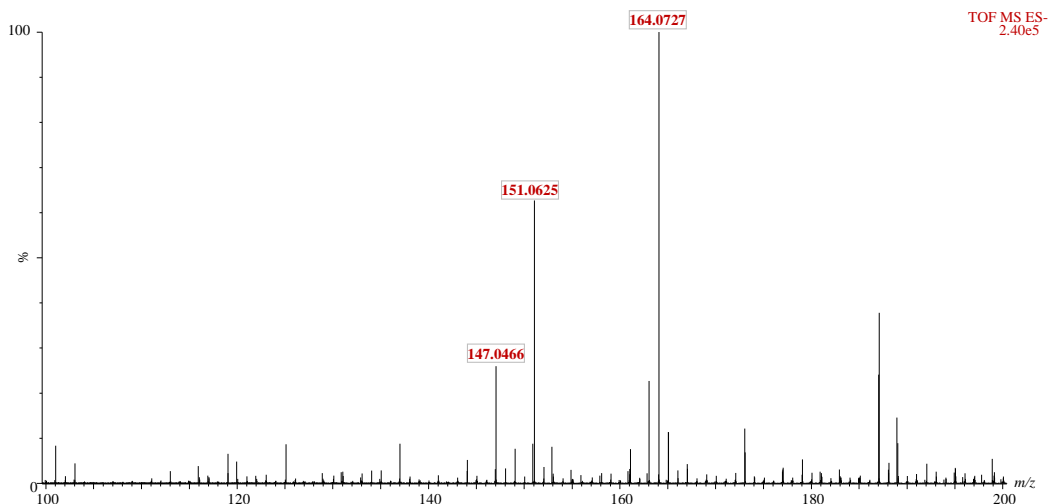


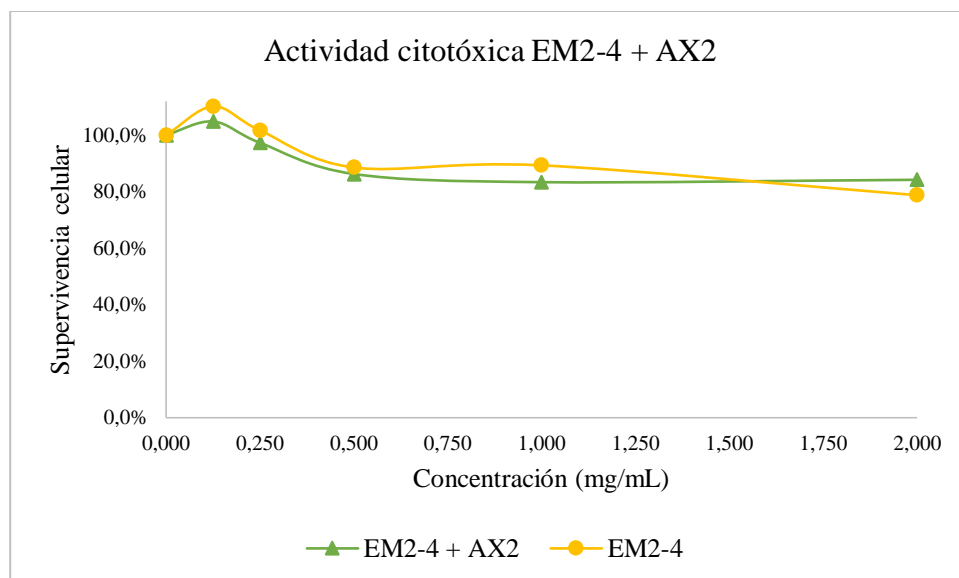
Figura 36. Espectro de ESI(-)-MS de la fracción C3-7 (ventana espectral: 100-200 Da).

Se asume que las señales observadas en ambos modos de ionización corresponden a metabolitos producidos por la especie vegetal, a excepción de las señales identificadas como contaminantes provenientes de la manipulación de las muestras. Debido a que no fue posible llegar hasta el aislamiento de compuestos puros, y a que los constituyentes de las mezclas se encuentran en una proporción muy baja, solo se lograron elucidar las estructuras químicas de L-arabinitol y L-fenilalanina mediante experimentos de RMN y MS.

9.11 Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas

Al realizar la evaluación de la actividad citotóxica de la sub-fracción EM2-4 (concentraciones: 0.125, 0.250, 0.50 y 1.00 mg/mL) en combinación con las parasporinas AX2 y A34 (concentración constante=1 mg/mL), se observó que en ambos casos se presentó un ligero aumento de la actividad en comparación con el efecto que presentó la sub-fracción de manera individual (Figura 37), sin embargo, el porcentaje de inhibición no es significativo como para ser considerado como efecto sinérgico (inhibición del crecimiento celular < 5%).

a)



b)

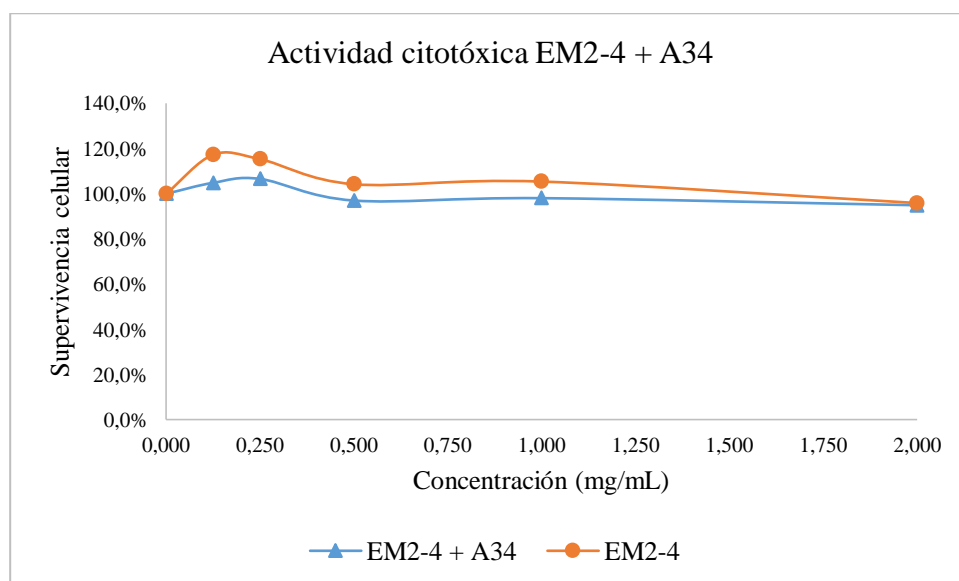


Figura 37. Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica EM2-4 + parasporinas.

Nota: Los resultados son expresados como la media de los datos obtenidos. El primer punto de la curva corresponde al control negativo.

Algunos de los factores que se considera que tuvieron influencia sobre los resultados son: a) tiempo que permaneció el extracto almacenado, b) posibles interacciones entre los metabolitos secundarios presentes en el extracto y las proteínas, que inhiban su efecto citotóxico, y además, c) pérdida de la actividad citotóxica de las parasporinas; es necesario realizar la cuantificación del contenido de proteínas en la muestra utilizada, ya que se sabe que las parasporinas AX2 y A34 presentan una disminución de la proliferación celular considerable al ser evaluados de manera individual (88.94% y 99.30% respectivamente, a 1 mg/mL);³⁸ éste efecto no fue

observado en el control empleado, el cual consistió en el medio de cultivo más las proteínas AX2 y A34 a dicha concentración. Sin embargo, para comprobar estas hipótesis se deben realizar estudios complementarios, además de evaluar el efecto de otras variables del sistema como la proporción sub-fracción activa/parasporina.

10 CONCLUSIONES

En este estudio se determinó que la especie *T. pallida* presenta actividad citotóxica al ser evaluada en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, lo cual es consistente con lo descrito para otras especies del género *Tradescantia* como *T. spathacea* y *T. zebrina*.

En la evaluación de la actividad citotóxica (ensayo MTT) de 5 extractos de polaridad ascendente de la especie *Tradescantia pallida*, se estableció que la fracción 2 del extracto metanólico (MeOH 2) presentó la mayor disminución en la actividad celular en la línea MCF-7 (cáncer de mama), con un porcentaje de inhibición del crecimiento del 37.94% (concentración=1 mg/mL). Después de fraccionar el extracto más activo mediante diferentes técnicas cromatográficas, se asoció la actividad biológica a 2 sub-fracciones de menor complejidad (EM2-3 y EM2-4), las cuales presentaron una inhibición del crecimiento celular de 26.6% y 23.4% (1 mg/mL), respectivamente; este porcentaje se incrementó hasta $\approx 55\%$ en ambos casos al duplicar la dosis empleada (2 mg/mL).

A través del análisis de RMN y MS se caracterizaron los metabolitos L-fenilalanina y L-arabinitol en las fracciones C3-6 y C3-7 (provenientes de la separación cromatográfica de la sub-fracción EM2-4).

Después de evaluar la actividad biológica de una de las sub-fracciones activas en combinación con las parasporinas AX2 y A34 se observó un ligero incremento de la actividad citotóxica con respecto a los efectos individuales, sin embargo, el porcentaje de inhibición no fue significativo para ser considerado como un efecto sinérgico.

11 Bibliografía

1. <https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.htm> (accesado ene 8, 2019).
2. Kermez-Sarukhán, J.; Seco-Mata, R. M. El Conocimiento de la Biodiversidad Mexicana: Antecedentes. En *Dos décadas de historia, 1992-2012*; Redacta, S. A. de C. V., 2012; pp 13–15.
3. Magaña-Alejandro, M. A.; Gama-Campillo, L. M.; Mariaca-Méndez, R. El Uso de las Plantas Medicinales en las Comunidades Mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica* **2010**, *29*, 212–262.
4. Frei, B.; Baltisberger, M.; Sticher, O.; Heinrich, M. Medical Ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and Assessment of Indigenous Uses. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *62* (2), 149–165.
5. Prakash, R.; Rajesh, R. Aberrant Expression of WNT/ β -Catenin Signaling Pathway and *In Vitro* Cytotoxic Activity of *Tradescantia spathacea* Medicinal Plant Used to Treat Human Breast Adenocarcinoma (MCF-7 Cell Lines). *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5* (12), 5230–5234.
6. García-Varela, R.; Fajardo-Ramírez, O. R.; Serna-Saldivar, S. O.; Altamirano, J.; Cardineau, G. A. Cancer Cell Specific Cytotoxic Effect of *Rhoeo discolor* Extracts and Solvent Fractions. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *190*, 46–58.
7. <http://www.who.int> (accesado jun 15, 2018).
8. <http://www.inegi.org.mx> (accesado jun 15, 2018).
9. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf (accesado ene 2, 2019).
10. Stuckey, A. Breast Cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* **2011**, *54* (1), 96–102.
11. <http://www.who.int/topics/cancer/es/> (accesado nov 29, 2018).
12. Alonso-Castro, A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar-Olivo, L. A.; Gomez-Sanchez, M.; Dominguez, F.; Garcia-Carranca, A. Mexican Medicinal Plants Used for Cancer Treatment: Pharmacological, Phytochemical and Ethnobotanical Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133* (3), 945–972.
13. Khazir, J.; Riley, D. L.; Pilcher, L. A.; De-Maayer, P.; Mir, B. A. Anticancer Agents from Diverse Natural Sources. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9* (11), 1655–1669.
14. de Oliveira-Júnior, R. G.; Christiane-Adrielly, A. F.; da Silva-Almeida, J. R. G.; Grougnet, R.; Thiéry, V.; Picot, L. Sensitization of Tumor Cells to Chemotherapy by Natural Products: A Systematic Review of Preclinical Data and Molecular Mechanisms. *Fitoterapia* **2018**, *129*, 383–400.
15. Vinod, B. S.; Maliekal, T. T.; Anto, R. J. Phytochemicals as Chemosensitizers: From Molecular Mechanism to Clinical Significance. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18* (11), 1307–1348.
16. Dandawate, P.; Padhye, S.; Ahmad, A.; Sarkar, F. H. Novel Strategies Targeting Cancer Stem Cells through Phytochemicals and Their Analogs. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3* (2), 165–182.
17. Ohba, M.; Mizuki, E.; Uemori, A. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* **2009**, *29* (1), 427–433.

18. Höfte, H.; Whiteley, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53* (2), 242–255.
19. Cannon, R. J. C. *Bacillus thuringiensis* Use in Agriculture: A Molecular Perspective. *Biol. Rev.* **1996**, *71* (4), 561–636.
20. Kitada, S.; Abe, Y.; Shimada, H.; Kusaka, Y.; Matsuo, Y.; Katayama, H.; Okumura, S.; Akao, T.; Mizuki, E.; Kuge, O.; Sasaguri, Y.; Ohba, M.; Ito, A. Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-Tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (36), 26350–26360.
21. Ito, A.; Sasaguri, Y.; Kitada, S.; Kusaka, Y.; Kuwano, K.; Masutomi, K.; Mizuki, E.; Akao, T.; Ohba, M. A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (20), 21282–21286.
22. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/117574> (accesado oct 22, 2017).
23. Evans, T. M.; Faden, R. B.; Simpson, M. G.; Sytsma, K. J. Phylogenetic Relationships in the Commelinaceae: I. A. Cladistic Analysis of Morphological Data. *Syst. Bot.* **2000**, *25* (4), 668–691.
24. Tan, J.; Yap, W.; Tan, S.; Lim, Y.; Lee, S. Antioxidant Content, Antioxidant Activity, and Antibacterial Activity of Five Plants from the Commelinaceae Family. *Antioxidants* **2014**, *3* (4), 758–769.
25. Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican Plants with Hypoglycaemic Effect Used in the Treatment of Diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99* (3), 325–348.
26. Amaral, F. M. M.; Ribeiro, M. N. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Reis, A. S.; Nascimento, F. R. F.; Macedo, R. O. Plants and Chemical Constituents with Giardicidal Activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 696–720.
27. González-Avila, M.; Arriaga-Alba, M.; de la Garza, M.; Hernández-Pretelín, M. del C.; Domínguez-Ortíz, M. A.; Fattel-Fazenda, S.; Villa-Treviño, S. Antigenotoxic, Antimutagenic and ROS Scavenging Activities of a *Rhoeo discolor* Ethanolic Crude Extract. *Toxicol. In Vitro* **2003**, *17* (1), 77–83.
28. Silva, A. M. A. P.; Silva, A. M.; Masson, R. D.; Costa, N. C.; Ribeiro, E. E. Avaliação da Atividade Antimicrobiana da Planta *Tradescantia pallida* Munt (Taboquinha Roxa). *Rev. Bras. Plantas Med.* **2015**, *17* (3), 374–378.
29. Benítez-Azaola, R.; García-Varela, R.; Suárez-Jacobo, A.; Cardineau, G. A.; Altamirano, J.; Serna-Saldivar, S. O. *Listeria monocytogenes* Growth Inhibition in Inoculated Fresh Panela Cheese by the Addition of *Rhoeo discolor* Aqueous Extracts Combined with Potassium Sorbate. *Rev. Mex. Ing. Química* **2017**, *16* (2), 425–534.
30. Yang, D. S.; Pennisi, S. V.; Son, K.-C.; Kays, S. J. Screening Indoor Plants for Volatile Organic Pollutant Removal Efficiency. *HortScience* **2009**, *44* (5), 1377–1381.
31. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/117574#toDistributionMaps> (accesado nov 15, 2017).
32. Arriaga-Alba, M.; Blasco, J. L.; Ruíz-Pérez, N. J.; Sánchez-Navarrete, J.; Rivera-Sánchez, R.; González-Avila, M. Antimutagenicity Mechanisms of the *Rhoeo discolor* Ethanolic Extract. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, *63* (3), 243–248.

33. Wang, W. L.; Sheu, S. Y.; Huang, W. D.; Chuang, Y. L.; Tseng, H. C.; Hwang, T. S.; Fu, Y. T.; Kuo, Y. H.; Yao, C. H.; Kuo, T. F. Phytochemicals from *Tradescantia albiflora* Kunth Extracts Reduce Serum Uric Acid Levels in Oxonate-Induced Rats. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12* (46), 223-227
34. Sánchez-Roque, Y.; Ayora-Talavera, G.; Rincón-Rosales, R.; Gutiérrez-Miceli, F. A.; Meza-Gordillo, R.; Winkler, R.; Gamboa-Becerra, R.; Ayora-Talavera, T. del R.; Ruiz-Valdiviezo, V. M. The Flavonoid Fraction from *Rhoeo discolor* Leaves Acts Antiviral Against Influenza A Virus. *Rec. Nat. Prod.* **2017**, *11* (6), 532-546.
35. Vo, Q. H.; Nguyen, P. H.; Zhao, B. T.; Ali, M. Y.; Choi, J. S.; Min, B. S.; Nguyen, T. H.; Woo, M. H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitory Constituents from the Aerial Parts of *Tradescantia spathacea* Sw. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 113-121.
36. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZCYA199202023.htm (accesado dic 23, 2017).
37. http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.flora.fna022_tradescantia_pallida?searchUri=genus%3DTradescantia%26species%3Dpallida (accesado nov 10, 2017).
38. Cruz-Nolasco, A. (2017). Síntesis de Nanoliposomas que Contienen Parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con Actividad Antiproliferativa, Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan.
39. Ringuelet, J. Introducción a los Productos Naturales Vegetales. En *Productos Naturales Vegetales*; Editorial de la Universidad de la Plata, 2013; pp 4-17.
40. Mesa-Arango, A. C.; Bueno-Sánchez, J. G.; Betancur-Galvis, L. A. Natural Products with Antimycotic Activity. *Rev. Esp. Quimioter.* **2004**, *17* (4), 325-331.
41. Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sánchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **2017**, *7* (3), 47-66.
42. Esclapez, M. D.; García-Pérez, J. V.; Mulet, A.; Cárcel, J. A. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng. Rev.* **2011**, *3* (2), 108-120.
43. Durst, H. D.; Gokel, G. W. Cromatografía. En *Química Orgánica Experimental*; Reverté, 1985; pp 78-96.
44. Christian, G. D. Cromatografía: Principios y Teoría. En *Química Analítica*; Limusa/Noriega, 1993; pp 555-559.
45. Mohrig, J.; Hammond, C.; Scharz, P. Thin-Layer Chromatography. En *Techniques in Organic Chemistry*; W. H. Freeman and Company, 2010; pp 221-233.
46. Carey, F. A. Espectroscopía. En *Química Orgánica*; McGraw-Hill, 2014; pp 528-576.
47. Wade, L. G. J. Espectroscopía de RMN, IR y Espectrometría de Masas. En *Química Orgánica*; McGraw-Hill, 2004; pp 490-586.
48. Gilard, V.; Trefi, S.; Balayssac, S.; Delsuc, M.-A.; Gostan, T.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Prigent, Y.; Taulelle, F. DOSY NMR for Drug Analysis. En *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*; Elsevier, 2008; pp 269-289.
49. <https://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/25> (accesado ene 19, 2019).
50. <http://resources.mestrelab.com/dosy/> (accesado ene 19, 2019).

51. Cassani, J.; Nilsson, M.; Morris, G. A. Flavonoid Mixture Analysis by Matrix-Assisted Diffusion-Ordered Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (2), 131–134.
52. Deborde, C.; Moing, A.; Roch, L.; Jacob, D.; Rolin, D.; Giraudeau, P. Plant Metabolism as Studied by NMR Spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, *102–103*, 61–97.
53. Paré, J. R. J.; Bélanger, J. M. R. Mass Spectrometry: Principles and Applications. En *Instrumental Methods in Food Analysis*; Elsevier, 1997; pp 239–241.
54. www.waters.com (accesado nov 22, 2017).
55. Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, R. C. K.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin. Biochem. Rev.* **2003**, *24* (1), 3–12.
56. de Hoffmann, E.; Stroobant, V. Mass Analyzers. In *Mass spectrometry: Principles and Applications*; Wiley, 2007; pp 85–166.
57. Ali, N.; Chhetri, B.; Dosoky, N.; Shari, K.; Al-Fahad, A.; Wessjohann, L.; Setzer, W. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Ocimum forskolei* and *Teucrium yemense* (Lamiaceae) Essential Oils. *Medicines* **2017**, *4* (2), 17–31.
58. Escobar, L.; Rivera, A.; Aristizábal, F. A. Estudio Comparativo de los Métodos de Resazurina y MTT en Estudios de Citotoxicidad en Líneas Celulares Tumoraes Humanas. *Vitae* **2010**, *17* (1), 67–74.
59. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf (accesado ene 5, 2019).
60. Patil, U.; Deshmukh, O. S. Preliminary Phytochemical Screening of Six Medicinal Plants Used as Traditional Medicine. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2016**, *7* (1), 77–81.
61. Tan, J. B. L.; Lim, Y. Y.; Lee, S. M. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn Leaves. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (4), 2394–2400.
62. Huq, S.; Shawkat Ali, M.; Islam, R.; Manzoor, F.; Rahman, I. Biological Evaluation of Native and Exotic Plants of Bangladesh. *J. Appl. Pharm.* **2016**, *8* (3), 1–9.
63. Ju, Y. H.; Clausen, L. M.; Allred, K. F.; Almada, A. L.; Helferich, W. G. β -Sitosterol, β -Sitosterol Glucoside, and a Mixture of β -Sitosterol and β -Sitosterol Glucoside Modulate the Growth of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells *In Vitro* and in Ovariectomized Athymic Mice. *J. Nutr.* **2004**, *134* (5), 1145–1151.
64. Ovesná, Z.; Vachálková, A.; Horváthová, K. Taraxasterol and β -Sitosterol: New Naturally Compounds with Chemoprotective/Chemopreventive Effects. *Neoplasma* **2004**, *51* (6), 407–414.
65. Islam, M. T.; Ali, E. S.; Uddin, S. J.; Shaw, S.; Islam, M. A.; Ahmed, M. I.; Chandra Shill, M.; Karmakar, U. K.; Yarla, N. S.; Khan, I. N.; Billah, M.M.; Pieczynska, M. D.; Zengin, G.; Malainer, C.; Nicoletti, F.; Gulei, D.; Berindan-Neagoe, I.; Apostolov, A.; Banach, M.; Yeung, A. W. K.; El-Demerdash, A.; Xiao, J.; Dey, P.; Yele, S.; Jóźwik, A.; Strzałkowska, N.; Marchewka, J.; Rengasamy, KRR.; Horbańczuk, J.; Kamal, M. A.; Mubarak, M. S.; Mishra, S. K.; Shilpi, J. A.; Atanasov, A. G. Phytol: A Review of Biomedical Activities. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *121*, 82–94.

66. Friedman, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (3), 385–406.
67. Cooper, R.; Nicola, G. Nitrogen-Containing Compounds. En *Natural Products Chemistry: Sources, Separations, and Structures*; CRC Press, 2015; pp 77–79.
68. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00120> (accesado feb 23, 2019).
69. Akram, M.; Asif, H. M.; Uzair, M.; Akhtar, N.; Madni, A.; Shah, S. M. A.; Hasan, Z.; Ullah, A. Amino Acids: A Review Article. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5 (17), 3997–4000.
70. http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1755 (accesado oct 30, 2018).
71. http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1695 (accesado oct 30, 2018).
72. Gonsior, M.; Hertkorn, N.; Conte, M. H.; Cooper, W. J.; Bastviken, D.; Druffel, E.; Schmitt-Kopplin, P. Photochemical Production of Polyols Arising from Significant Photo-Transformation of Dissolved Organic Matter in the Oligotrophic Surface Ocean. *Mar. Chem.* **2014**, 163, 10–18.
73. http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/5166 (accesado ene 15, 2019).
74. http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1912 (accesado ene 15, 2019).
75. http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1399 (accesado ene 15, 2019).
76. Jiang, M.; Wang, B.; Yang, L.; Lin, S.; Cheng, H. Microbiological Purification of L-Arabitol from Xylitol Mother Liquor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 21 (1), 43–49.
77. Shetty, H. U.; Holloway, H. W.; Schapiro, M. B. Cerebrospinal Fluid and Plasma Distribution of Myo-Inositol and Other Polyols in Alzheimer Disease. *Clin. Chem.* **1996**, 42 (2), 298–302.
78. https://beta-static.fishersci.ca/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/posters/fisher-chemical-poster.pdf (accesado ene 2, 2019).
79. <https://metlin.scripps.edu/showChart.php?molid=28&h=240&collE=20&Imode=p&etype=experimental> (accesado oct 30, 2018).
80. <https://metlin.scripps.edu/showChart.php?molid=141&h=240&collE=20&Imode=p&etype=experimental> (accesado oct 30, 2018).