



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO**

**Perfil de alcaloides por HPTLC y GC-EIMS de dos especies del  
género *Argemone***

Tesis que presenta:

**Q. Martha Julieta Rosas Becerril**

Para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias**

En la especialidad de:

**Biotecnología de Plantas**

Director de tesis:

**Dr. Jorge Molina Torres**

Asesores:

**Dr. Luis Eugenio González de la Vara**

**Dr. José Juan Ordaz Ortiz**

Irapuato, Guanajuato

2018



La presente investigación se desarrolló en la Laboratorio de Fitobioquímica del departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. Jorge Molina Torres.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgada durante el desarrollo de la presente investigación en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Dr. Jorge Molina Torres**

Por la dirección del trabajo y por aceptarme en su laboratorio de investigación y por compartir sus vastos conocimientos conmigo.

### **Al M. en C. Enrique Ramírez Chávez**

Por la paciencia, los conocimientos brindados y por el constante apoyo que me brindó mientras realizaba esta tesis.

### **A mis sinodales el Dr. Luis Eugenio González de la Vara y al Dr. José Juan Ordaz Ortiz**

Por su apoyo disposición, dirección y revisión durante el desarrollo de este trabajo.

**A todos mis compañeros de generación** y a mi grupo de estudio por el apoyo que me brindaron, por el compañerismo y por transmitirme sus conocimientos.

**A mis papás y a mi hermana** por todo el apoyo que me dieron cuando decidí mudarme a otra ciudad a estudiar, por su cariño y por la constante motivación para que cumpla mis metas

**A mis amigas y compañeras de laboratorio Jess y Aurora** por su apoyo, sus consejos y su amistad durante este trabajo.

**A mis amigas Ana, Areli, Aline, Karla y Cinthya** que a la distancia me enviaban su apoyo y ánimos, que siempre estuvieron pendientes de mí.

## ÍNDICE

<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	9
<b>Productos naturales</b> .....	9
Alcaloides .....	11
<b>Género <i>Argemone</i> L.</b> .....	17
<i>Argemone ochroleuca</i> Link & Otto .....	18
<i>Argemone platyceras</i> Sweet .....	22
<b>Colinesterasas</b> .....	26
Alcaloides como inhibidores de acetilcolinesterasa .....	28
<i>Quorum sensing</i> .....	30
<b>III. OBJETIVO GENERAL</b> .....	35
<b>IV. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	35
<b>Material y equipo</b> .....	36
Material biológico.....	36
Reactivos .....	36
Material y equipo para cromatografía de placa fina .....	36
Material para los ensayos de inhibición .....	36
Equipo para cromatografía de gases y espectrometría de masas .....	37
<b>Métodos</b> .....	37
Métodos de extracción de alcaloides.....	37
Perfil de alcaloides por TLC/HPTLC.....	38
Ensayo de inhibición del mecanismo de <i>quorum sensing</i> por bioautografía.....	39
Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa .....	40
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	41
Extracción de alcaloides.....	41
Perfil de alcaloides por TLC/HPTLC.....	43

---

<b>Cuantificación de alcaloides por TLC</b> .....	54
<b>Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa</b> .....	57
<b>Ensayo de inhibición sobre quorum sensing</b> .....	61
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	65
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	78
<b>APÉNDICE I</b> .....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Argemone ochroleuca</i> Link & Otto.....	19
Figura 2. Estructura de los alcaloides reportados en <i>Argemone ochroleuca</i> Link & Otto. ...	20
Figura 3. <i>Argemone platyceras</i> Sweet.....	24
Figura 4. Estructuras de alcaloides reportados presentes en <i>Argemone platyceras</i> . ....	25
Figura 5. Estructura 3D de la acetilcolinesterasa de <i>Torpedo californica</i> con presencia de un inhibidor del sitio activo.....	27
Figura 6. Representación esquemática de la acetilcolinesterasa. ....	27
Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de comunicación bacteriana conocido como <i>quorum sensing</i> .....	31
Figura 8. Estructura 3D de CViR de <i>Chromobacterium violaceum</i> unida al inhibidor clorolactona. ....	31
Figura 9. Comparación de extractos de k obtenidos por diferentes métodos de extracción en TLC.....	42
Figura 10. Placa de HPTLC de los extractos de <i>Argemone ochroleuca</i> ; <i>Argemone platyceras</i> y estándar de berberina. ....	44
Figura 11. Espectros de masas de los compuestos encontrados en los extractos de <i>Argemone ochroleuca</i> . ....	47
Figura 12. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención de 26.449 min del extracto de tejido de corteza de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .....	52
Figura 13. Espectro de masas experimental del pico en el tiempo de retención 26.7003 min del extracto de tejido de corteza de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .....	53
Figura 14. Cuantificación de berberina por HPTLC de los extractos de diferentes tejidos de <i>Argemone ochroleuca</i> . ....	55
Figura 15. Cuantificación de berberina por HPTLC de los extractos de diferentes tejidos de <i>Argemone platyceras</i> . ....	56
Figura 16. Reacción de la acetilcolinesterasa con naftilacetato. ....	57
Figura 17. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa sobre TLC.....	58
Figura 18. Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa preparativa del extracto de tejido vascular de raíz de <i>A. platyceras</i> . ....	58

Figura 19. Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa preparativa del extracto de tejido de corteza de raíz de <i>A. platyceras</i> . .....	59
Figura 20. Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa de preparativa del extracto de cápsula verde de <i>A. platyceras</i> . .....	59
Figura 21. Placa de TLC para el ensayo de bioautografía bajo luz UV 366 nm. ....	62
Figura 22. Placa de TLC del ensayo de bioautografía bajo luz visible. ....	62
Figura 23. Cromatograma de la zona aislada en el Rf 0.7 del extracto de cápsula seca de <i>A. ochroleuca</i> . .....	62
Figura 24. Cinética de crecimiento de <i>Chromobacterium violaceum</i> con diferentes concentraciones del extracto de cápsula seca de <i>Argemone ochroleuca</i> . .....	64
Figura 25. Cromatograma de gases del extracto de tejido vascular de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . .....	82
Figura 26. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.097 min. 82	
Figura 27. Cromatograma del extracto de tejido de corteza de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . .....	83
Figura 28 Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.097 min.. 83	
Figura 29. Cromatograma de gases del extracto de cápsula verde de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . .....	84
Figura 30. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min. 84	
Figura 31. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.126 min. 84	
Figura 32. Cromatograma de gases del extracto de cápsula seca de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . .....	85
Figura 33. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 27.806 min. 85	
Figura 34. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.310 min. 85	
Figura 35. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.642 min. 85	
Figura 36. Cromatograma de gases del extracto de tallo de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . 86	
Figura 37. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min. 86	
Figura 38. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.129 min. 86	
Figura 39. Cromatograma de gases del extracto de hoja de raíz de <i>Argemone ochroleuca</i> . 87	

Figura 40. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.116 min.	87
Figura 41. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.148 min.	87
Figura 42. Cromatograma de gases del extracto de tejido vascular de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .	88
Figura 43. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.435 min.	88
Figura 44. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.435 min.	88
Figura 45. Cromatograma de gases del extracto de tejido de corteza de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .	89
Figura 46. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.449 min (izq.) y 26.7003 min (der.)	89
Figura 47. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.145 min. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.1636 min.	89
Figura 48. Cromatograma de gases del extracto de cápsula verde de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .	90
Figura 49. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.436 min (izq.) y 26.677 min (der.) arriba y tiempo de retención 26.7506 min abajo.	90
Figura 50. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.115 min.	90
Figura 51. Cromatograma de gases del extracto de tallo de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .	91
Figura 52. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.431 min	91
Figura 53.. Cromatograma de gases del extracto de hoja de raíz de <i>Argemone platyceras</i> .	92
Figura 54. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.430 min	92

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familias de Gimnospermas en donde se encuentran especies con alcaloides, precursores aminoácido y ejemplos de géneros que los contienen. ....	15
Tabla 2. Alcaloides representativos de familias que tienen como precursores el aminoácido L-tirosina. ....	16
Tabla 3. Análisis de GC-EIMS de los diferentes extractos de <i>Argemone ochroleuca</i> . ....	46
Tabla 4. Principales fragmentos reportados en la literatura para los compuestos platycerina, isonorargemonina y norargemonina. ....	49
Tabla 5. Datos de los compuestos observados por GC-EIMS de los extractos de <i>Argemone platyceras</i> . ....	51
Tabla 6. Cuantificación de berberina en extractos de tejidos de <i>Argemone ochroleuca</i> . ....	54
Tabla 7. Cuantificación de berberina en extractos de diferentes tejido de <i>Argemone platyceras</i> . ....	56

## RESUMEN

El género *Argemone* pertenece a la familia Papaveraceae, este género tiene un látex de blanco a amarillo, comprende alrededor de 20 especies que se encuentran en climas templados y tropicales en América, a excepción de una especie nativa de Hawái, además de que especies como *Argemone mexicana* está ampliamente distribuida en el mundo (Carvajal, 2007). En México se les conoce como “chicalote”, estas han sido usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento: contra afecciones de los ojos, como cataratas, y la piel; tos, bronquitis, asma; y por sus propiedades como sedativas, anticonvulsivas y calmantes (Sánchez-Mendoza, Castillo-Henkel y Navarrete, 2008). Asimismo, esta género tiene una presencia de diversos alcaloides, entre estos se encuentran bencilisoquinolinas, benzofenantridinas, protoberberinas, protopinas y pavininas.

En este estudio se llevó a cabo el análisis del perfil de alcaloides por HPTLC y GC-EIMS de *Argemone ochroleuca* Link & Otto y *Argemone platyceras* Sweet. Se encontró que, para la primera especie, algunos alcaloides presentes son de tipo protoberberina mientras que en la segunda hay alcaloides de tipo pavina. Ambas especies comparten alcaloides tipo protopina. El análisis por HPTLC también demostró la distribución de alcaloides en los tejidos analizados, así como la diferencia en la concentración en estos. A partir de este análisis fue posible llevar a cabo estudios de actividad biológica, en los cuales encontramos que los extractos de tejido de corteza de raíz, tejido vascular de raíz y cápsula verde de *Argemone platyceras*, mostraron actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa; mientras que, el extracto de cápsula seca de *Argemone ochroleuca* resultó tener potencial actividad inhibitoria de *quorum sensing*.

Así podemos decir que la diversidad de alcaloides presentes en las especies del género *Argemone* que se analizaron en este estudio, les confieren a estas, una variedad de actividades biológicas diferentes dependiendo de la especie. Con los datos obtenidos por HPTLC y GC-EIMS se puede contribuir a aumentar el acervo de información acerca de las plantas de medicinales mexicanas.

## ABSTRACT

The *Argemone* genus belongs to the Papaveraceae family, this genus has a white to yellow latex, comprise around 20 species found in America in areas with mild to tropical weather, except one specie that is Hawaii native, besides species like *Argemone mexicana* are widely distributed worldwide (Carvajal, 2007). In Mexico are known as “chicalote”, this plants had been use in the traditional mexican medicine for the treatment against skin and eyes conditions, like cataracts; cough, bronchitis, asthma; and for its sedatives, anticonvulsant and calming properties (Sánchez-Mendoza, Castillo-Henkel y Navarrete, 2008). Likewise, this genus has the presence of several alkaloids, among this are the benzyloquinolines, benzophenanthridines, protoberberines, protopines and pavines.

In this study we carry on the alkaloid profile analysis of *Argemone ochroleuca* Link & Otto and *Argemone platyceras* Sweet by HPTLC and GC-EIMS. We found that, for the first specie, some alkaloids are protoberberine like while in the second one the alkaloids are pavine like. Both species share protopines alkaloids. The HPTLC analysis shows the alkaloids distribution in the analyzed tissues, as well as its concentration. With this analysis was possible to do biological activity studies, in which we found that the root cortex tissue, root vascular tissue and green capsule extracts of *Argemone platyceras* show inhibitory activity against acetylcholinesterase; while the dry capsule extract of *Argemone ochroleuca* show potential as inhibitor of *quorum sensing*.

We could say that the alkaloid diversity in the genus *Argemone* species studied here, give them a large variety of biological activities depending on the specie. With the HPTLC and GC-EIMS data we contribute to increase the information about mexican medicinal plants.

## I. ANTECEDENTES

### Productos naturales

Los productos naturales son compuestos orgánicos relativamente pequeños, con pesos moleculares de hasta 2,000 Da. Son producidas por un diversos organismos vivos, como hongos, anfibios, reptiles e incluso mamíferos, aunque se encuentran más comúnmente en plantas. En estas últimas la presencia de estos compuestos varía desde la raíz hasta la parte aérea, así como si la muestra se encuentra seca o fresca. Suelen ser intermediarios en procesos metabólicos, aunque aún no se sabe con certeza si están involucrados en el metabolismo primario de los organismos que los producen (Cooper y Nicola, 2015).

Son encontrados en organismos específicos que pertenecen a grupos filogenéticos limitados, o grupos de organismos. Se ha sugerido que no son producidos bajo todas las condiciones, algunas veces se producen debido a la limitación de nutrientes, durante la idiofase, como sustancias de defensa o moléculas reguladoras, en la mayoría de los casos aún no se conoce la función que estos desempeñan en el organismo (Paul, 2002).

Los productos naturales o metabolitos secundarios se han organizado en tres grupos principales: compuestos terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados.

1. Compuestos terpenoides: La familia más grande y diversa de productos naturales, pueden ser desde estructuras lineales de cinco carbonos a policíclicas de cientos de unidades isoprenoides. Son producto de la condensación de unidades de cinco carbonos llamadas isopreno, que se pueden unir de tres maneras diferentes ya sea a través de la iso-terminal o el opuesto. Se clasifican en base al número de unidades isoprenoides presentes: monoterpenos y sesquiterpenos, diterpenos y sesterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Son sintetizados a partir del acetato a través de la ruta del ácido mevalónico. A este grupo pertenecen los esteroides, carotenoides, glicósidos, entre otros. Es el grupo más importante de

compuestos bioactivos con aproximadamente veintitrés mil estructuras conocidas en plantas, algunos son compuestos son ampliamente usados en la industria como saborizantes, fragancias y especias.

2. Compuestos fenólicos: Son el segundo grupo más grande de metabolitos secundarios que se sintetizan en plantas, dentro del cual se encuentran los flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminoides, entre otros. Poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinogénica, etc. Tienen una gran variedad de estructuras, pero todas coinciden en poseer un anillo aromático hidroxilado.

3. Compuestos nitrogenados: Los metabolitos de este grupo poseen átomos básicos de nitrógeno, son producidos por una gran variedad de organismos, algunos son tóxicos para otros organismos y tienen diferentes efectos farmacológicos (Kabera *et al.*, 2014)

El interés en los productos naturales no es únicamente académico, sino que se ha demostrado que tienen una gran variedad de usos como colorantes, polímeros, fibras, pegamentos, aceites, ceras, saborizantes, perfumes y drogas. Las numerosas propiedades biológicas de estos compuestos han dirigido la mirada a este campo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Al mismo tiempo este creciente interés ha derivado a la reevaluación de posibles funciones de estos compuestos dentro de las plantas (Croteau, Kutchan y Lewis, 2000).

## Alcaloides

Los alcaloides han sido un tópico de fascinación en el pasado, y en la actualidad, son objeto de un gran interés científico y económico, especialmente en la medicina y la industria farmacéutica (Aniszewski, 2015).

La primera persona en utilizar el término alcaloide fue W. Meißner a principios del siglo XIX, para nombrar compuestos naturales que reaccionaban como bases, es decir como “álcalis”. En la actualidad no existe una definición simple y concreta de lo que es un alcaloide, además de que puede ser difícil distinguir a los alcaloides de otros metabolitos secundarios que contienen nitrógeno, así, la descripción más utilizada es que son bases orgánicas heterocíclicas nitrogenadas de limitada distribución; aunque puede no ser la más acertada (Bruneton, 1995).

En 1803, Derosne un boticario francés aisló de la “adormidera”, *Papaver somniferum*, el alcaloide ahora conocido como noscapina y en 1805 Sertürner logró aislar la morfina de la misma especie, aunque es a este último al que se le atribuye el hecho de haber aislado el primer alcaloide. A pesar de esto, y debido a que la estructura de la mayoría de los alcaloides es bastante compleja, no fue sino hasta 1840 que se logró elucidar por primera vez la estructura de un alcaloide, la conina, la cual fue sintetizada en 1889.

Para mediados de 1940, los alcaloides ya se habían estudiado por cerca de 150 años, lo que resultaría en el aislamiento de alrededor de 800 compuestos, posteriormente, con los avances tecnológicos en los 50 años posteriores este número se incrementaría hasta llegar a un aproximado de 10000 (Evans, 2009).

Los alcaloides son casi siempre heterocíclicos y pueden tener bases primarias, secundarias y terciarias, así como grupos amonio cuaternario. Los químicos enfatizan que los alcaloides son cualquier grupo de compuestos heterocíclicos complejos que contengan nitrógeno, los cuales tienen una fuerte actividad fisiológica, tienden a ser tóxicos, y tienen

sus propias propiedades básicas; asimismo, se debe tener en cuenta que hay algunas excepciones a esta definición. Los científicos reconocen que son de vital importancia para la biología, medicina y química (Aniszewski, 2015).

Los alcaloides en plantas se encuentran en estado libre como sales o *N*-óxidos, generalmente están compuestos por carbono, hidrógeno y nitrógeno, y la mayoría contienen oxígeno. Suelen tener forma cristalina, amorfa, inodora y son no volátiles, sin embargo, algunos compuestos de bajo peso molecular y con ausencia de oxígeno en su estructura pueden aparecer de forma líquida. Asimismo, la mayoría de los alcaloides son incoloros, aunque existen en la naturaleza algunos alcaloides que tienen color, como el color amarillo de la berberina y la colchicina, rojo de la betaína y la sanguinarina, naranja de la canadina (Kukula-Koch y Widelski, 2016).

Los alcaloides pueden ser clasificados según cuatro aspectos, los cuales se mencionan a continuación:

1. Por su actividad biológica y ecológica
2. Por su relación con la innovación química y tecnológica.
3. Por su estructura química.
4. Por su ruta biosintética.

Estas dos últimas son las clasificaciones más utilizadas dentro de la comunidad científica, pues proveen la información necesaria para el estudio de éstos.

Por su estructura química se produce la clasificación más grande. La mayoría de los alcaloides provienen de la biosíntesis a partir de aminoácidos, como: ergots, tropanos, imidazoles, indoles, bisindoles, indolizidinas, manzamines, oxindoles, quinolinas, quinolizidinas, fenilisoquinolinas, feniletilaminas, piperidinas, purinas, pirrolidinas, pirrolizidinas, pirroindoles, piridinas, tetrahidroisoquinolinas. Sin embargo, otros surgen

de reacciones de aminación de diferentes tipos de sustratos como los siguientes: sesquiterpenos, esteroides, terpenoides, diterpenos y triterpenos.

En cambio, la clasificación por ruta biosintética se basa en los precursores moleculares en común, basados en la ruta bioquímica para formar la molécula.

Se dividen en tres tipos principales:

- a) Alcaloides verdaderos, son los derivados de aminoácidos y poseen un nitrógeno dentro de un anillo heterocíclico, altamente reactivos y con actividad biológica aún en dosis bajas;
- b) Protoalcaloides, son compuestos en donde el átomo de nitrógeno derivado del aminoácido no es parte de un heterociclo, forman una minoría dentro de los alcaloides;
- c) Pseudoalcaloides, en los cuales el esqueleto de carbono no proviene de aminoácidos, aunque puede estar conectado a sus rutas, suelen resultar de reacciones de aminación o transaminación, sin embargo, también pueden derivar de precursores no-aminoácidos.

De todos los metabolitos secundarios, los alcaloides son las moléculas con mayor variedad de beneficios y usos verificados, pueden ser considerados como sumamente útiles y también como altamente peligrosos. Son abundantes en las plantas superiores, casi el 25% de estas contienen este tipo de moléculas (Aniszewski, 2015).

Dentro de las Pteridofitas y Gimnospermas los alcaloides de los géneros *Lycopodium*, *Ephedra* y *Taxus* tienen interés medicinal, mientras que la distribución en los Angiospermas es desigual. Los órdenes de Dicotiledóneas: Salicales, Fagales, Cucurbitales y Oleales parecen no contener alcaloides. Mientras que son frecuentes en los órdenes Caryophyllales, Magnoliales, Ranunculales, Rosales, Rutales, Gentiales, Tubiflorae y Campanulales (Evans, 2009).

Los alcaloides están ampliamente distribuidos en plantas superiores, por ejemplo, en las familias Apocyanaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae, Solanaceae y Rutaceae. Se encuentran distribuidos en diferentes órganos de la planta (Wansi *et al.*, 2013).

**Tabla 1. Familias de Gimnospermas en donde se encuentran especies con alcaloides, precursores aminoácido y ejemplos de géneros que los contienen.**

<b>Familia</b>	<b>Aminoácido del que derivan sus alcaloides</b>	<b>Géneros que contienen alcaloides (ejemplos)</b>
<b>Apocynaceae</b>	L-triptófano	<i>Rauvaolfia, Catharanthus, Tabernaemontana, Strophanthus, Alstonia</i>
<b>Asteraceae</b>	L-ornitina, L-triptófano	<i>Senecio, Jacobea, Agregantum, Verbesina, Artemisia</i>
<b>Loganiaceae</b>	L-tirosina	<i>Strychnos, Gelsemium, Fagraea</i>
<b>Papaveraceae</b>	L-tirosina	<i>Papaver, Chelidonium, Glaucium, Eschscholzia, Argemone</i>
<b>Rutaceae</b>	Ácido antranílico, L-histidina	<i>Dictamnus, Euxylophora, Skimmia, Pilocarpus, Zantholium</i>
<b>Solanaceae</b>	L-ornitina	<i>Atropa, Deboisia, Datura, Capsicum, Hyoscyanus</i>
<b>Erythroxyloaceae</b>	L-ornitina	<i>Erythroxylum</i>
<b>Boraginaceae</b>	L-ornitina	<i>Heliotropium, Helotrium, Anchusa, Echium, Pulmonaria</i>
<b>Fabaceae</b>	L-ornitina, L-lisina, L-triptófano	<i>Crotalaria, Lupinus, Cytisus, Sophora, Chronantus</i>
<b>Menispermaceae</b>	L-tirosina	<i>Stephania, Curare, Epinetrum, Cissampelos, Spirospermum</i>
<b>Berberidaceae</b>	L-tirosina	<i>Berberis, Mahonia, Nandina</i>
<b>Ranunculaceae</b>	L-tirosina	<i>Hydrastis, Thalictrum, Aconitum, Delphinium, Nigella</i>
<b>Liliaceae</b>	L-tirosina	<i>Kreysigia, Colchinium, Veratrum, Fritillaria, Paris</i>
<b>Rubiaceae</b>		<i>Coffea, Theaceae, Sapinidaceae, Sterculiaceae, Waltheria</i>
<b>Amaryllidaceae</b>	L-tirosina	<i>Galanthus, Boophone, Zephyranthes, Pancratium, Leucojum</i>
<b>Elaegnaceae</b>	L-triptófano	<i>Elaeagnus, Hippophae</i>
<b>Zygophyllaceae</b>	L-triptófano, ácido antranílico	<i>Peganum, Nitraia, Fagonia, Tribulus</i>

Tomado de Aniszewski, 2015

Tabla 2. Alcaloides representativos de familias que tienen como precursores el aminoácido L-tirosina.

<b>Familia</b>	<b>Especies representativas</b>	<b>Alcaloides representativos</b>
<b>Graminae</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	Hordenina, tiramina
<b>Cactaceae</b>	<i>Lophophora williamsii</i>	Mescalina, anhalamina, anhalonina, anhalinidina
<b>Papaveraceae</b>	<i>Corydalis</i> spp.	Salsolinol
	<i>Papaver somniferum</i>	Morfina, codeína, papaverina
<b>Menispermaceae</b>	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	Curare
	<i>Cissampelos pereira</i>	Fragchinolina
	<i>Stephania dinklagel</i>	Dicentrinona
<b>Loganiaceae</b>	<i>Strychnos toxifera</i>	Turbocurarina
<b>Berberidaceae</b>	<i>Berberis</i> spp.	Berberina, berbamina, glaucina
	<i>Nandina domestica</i>	Nantenina
<b>Ranunculaceae</b>	<i>Hydrastis canadensis</i>	Hydrastina
	<i>Thalictrum orientale</i>	Fuzitina
<b>Fumariaceae</b>	<i>Corydalis flabellate</i>	Spallidamina, oxosanguinarina
	<i>Dicentra</i> spp.	Bicucullina, metiodina
<b>Liliaceae</b>	<i>Kreysigia multiflora</i>	Autumnalina, floralmultina, kreysigia
	<i>Colchium autumnale</i>	Colchicina
<b>Rubiaceae</b>	<i>Cephaelis ipecacuantha</i>	Emetina, cefalina, secolaganina
	<i>Mitragyna speciosa</i>	Mitraginina
<b>Amaryllidaceae</b>	<i>Leucojum vernum</i>	Licorina, leucovernina
	<i>Lycorus radiata</i>	Licorina
	<i>Galanthus</i> spp.	Galantamina
	<i>Galanthus plicatus</i>	Galantindol
	<i>Pancratium sickenbergeri</i>	Hippadina, pancracina
	<i>Zeohyanthes citrina</i>	Maritidina, vittatina

Modificada de Aniszewski, 2015

## **Familia Papaveraceae**

La familia Papaveraceae pertenece al grupo de las Angiospermas, consta de aproximadamente 40 géneros y alrededor de 900 especies (*The Plant List*, 2010).

Dentro de esta familia se encuentra *Papaver somniferum* L., la “adormidera”, de la cual se extraen el opio y drogas como la morfina y la heroína. Se le considera una de las familias más importantes debido su variado contenido de alcaloides, por lo cual son ampliamente estudiadas.

Botánicamente las plantas de esta familia son herbáceas, algunas veces leñosas, que poseen un látex con color, con hojas en un orden alternado, las cuales suelen estar dispuestas en roseta basal; sus flores son solitarias, algunos géneros presentan inflorescencias casi siempre racimosas; son hermafroditas; llegan a tener de 2 a 6 sépalos que pueden estar unidos en uno solo, usualmente caducos; tienen de 4 a 6 pétalos ausentes, libres e incluso algo connados, frecuentemente caducos; estambres numerosos, libres o con filamentos unidos en forma de dos falanges; ovario súpero, unilocular, 2 o más carpelos, óvulos en 2 o más placentas parietales, algunas veces solo 1 óvulo fértil, estilo corto o largo, suele estar ausente o caedizo; fruto capsular polispermo, dehiscente por poros o valvas, muy infrecuentemente monospermo o indehiscente (Carvajal, 2007).

### **Género *Argemone* L.**

El género *Argemone* pertenece a la familia de Papaveraceae, este género se identifica por tener un látex de blanquecino a amarillento. Existen poco más de 20 especies originarias de regiones templadas y tropicales casi exclusivamente de América, aunque la *Argemone mexicana* es una planta introducida en varias partes del mundo. En México se les llama con el nombre común “chicalote”, además de que es usada para tratar afecciones de los ojos y la piel. Se comportan como malezas, su hábitat comúnmente son las parcelas de descanso y los bordes de los caminos (Carvajal, 2007).

### ***Argemone ochroleuca* Link & Otto**

Esta especie está reportada en la herbolaria mexicana como remedio para la tos, bronquitis, asma, remoción de cataratas, además de poseer propiedades sedativas, anticonvulsivas, tranquilizantes, antidiabéticas y antiespasmódicas. Algunas investigaciones sobre la especie, sugieren la presencia de alcaloides como la sanguinarina, queleritrina, protopina, berberina, dihidrosanguinarina, dihidroqueleritrina,  $\alpha$ -alocriptopina, heleritrina, queilantifolina, esculetrina, reticulina y coptisina (Sánchez-Mendoza, Castillo-Henkel y Navarrete, 2008).

Su descripción botánica se refiere que es una planta anual o perenne de vida corta, glauca, con presencia de látex de color amarillo a naranja, de 0.30 a 1.5 m de alto, con espinas rectas, blanquecinas, espaciadas con diferentes longitudes que se encuentran en tallo, hojas y cápsula; de uno o pocos tallos, que se ramifican en las partes superiores; hojas inferiores dispuestas en roseta basal, de oblanceoladas a elípticas, de hasta 35 cm de ancho y aproximadamente 7 cm de ancho, las hojas superiores suelen ser de menor tamaño, lóbulos oblongos, dentados de forma irregular, estos suelen tener una fina espina apical, envés con pocas espinas; botones florales en forma de cilindro, cuerpo de 8 a 18 mm de largo y 4 a 22 mm de ancho; 3 o más espinas sobre los sépalos, , cuernos apicales divergentes; pétalos amarillos, más frecuentemente color crema e incluso blancos, obcuneiformes a elípticos; estambres de 20 a 75, con filamentos y anteras amarillas, estigma púrpura; cápsulas de 3 a 6, de 2 a 5 cm sin tomar en cuenta espinas (Carvajal, 2007). Ampliamente distribuida en México, especialmente en la altiplanicie.

En lo que se refiere a los compuestos bioquímicos presentes en la planta, los más estudiados han sido los alcaloides, en un estudio sobre la incidencia de glaucoma en relación con la presencia de alcaloides en amapolas se determinó que también se hallaban presentes berberina, coptisina y sanguinarina (Hakim, 1954). Un par de años después, Giral y Sotelo en 1959 en México aislaron de esta planta dos alcaloides: protopina y

alocriptopina; mismos compuestos identificados en *Argemone mexicana* (Verpoorte *et al.*, 1983).

Una década más tarde fueron descritos diez alcaloides, dentro de estos se encuentran los cinco mencionados anteriormente además de la quelantifolina, queleritrina, la cual se menciona en el artículo de Hakim, sin embargo, marcan como no presente, al metohidróxido de  $\alpha$ -canadina, metohidróxido de estilopina y metohidróxido de  $\alpha$ -tetrahidropalmitina (Haisová & Slavík, 1973). En 1983, se publicó un nuevo estudio sobre sus metabolitos, esta vez agregando solo dos más a la lista, la esculerina y la reticulina, siendo la primera vez que se mencionan como componentes de los extractos de la planta (Israílov, Chelombit'ko and Nazaroza, 1987). Por último, se mencionan en la literatura dos compuestos más, la dihidrosanguinarina y la dihidroqueleretrina (Takken, Fletcher y Blaney, 1993).



**Figura 1. *Argemone ochroleuca* Link & Otto.**

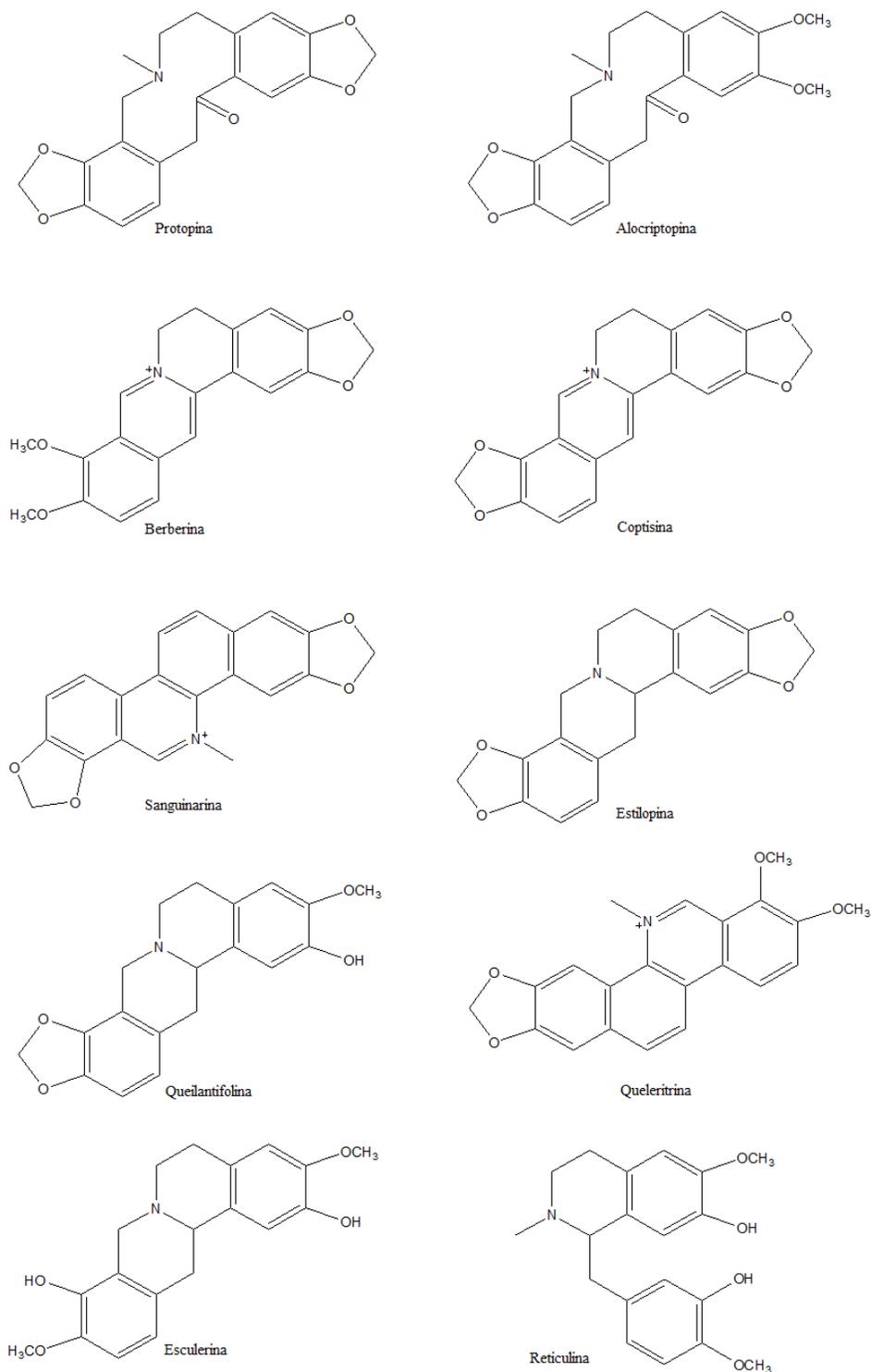


Figura 2. Estructura de los alcaloides reportados en *Argemone ochroleuca* Link & Otto.

Existe escasa información de la actividad biológica de los componentes de *Argemone ochroleuca* en la literatura. Uno de los pocos artículos referentes a esto es el de Sánchez-Mendoza, Castillo-Henkel y Navarrete (2008), en donde se estudia el comportamiento de tres extractos de la planta como relajantes del músculo traqueal en cuyos, reportando que efectivamente existe esta actividad, sobre todo en el extracto que realizaron con diclorometano; además de comparar dicho efecto con el de otros relajantes y la relación de estos con sus antagonistas, observando que en algunos casos estos últimos no afectaban la acción del extracto. De igual forma aislaron el compuesto de interés determinando por rayos X y por comparación espectros de técnicas como  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR y MS, que se trataba de la berberina.

Singh y otros (2010) valoraron la inhibición de los extractos de alcaloides ternarios y cuaternarios a la germinación de distintos hongos patógenos de plantas entre ellos algunos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Curvularia* y *Colletotrichum*. En el caso de la mezcla de compuestos ternarios la inhibición fue completa a baja concentración para *Fusarium udum* y *Helminthosporium* sp. Para los alcaloides cuaternarios *Curvularia* sp. y *Colletotrichum musae* fueron los más sensibles. Todos los demás hongos también sufrieron alta sensibilidad a ambas mezclas y a sus diferentes concentraciones. Sin embargo, en este caso no hubo identificación de los compuestos que estaban presentes en los extractos estudiados.

Otro de los estudios es de Hernández y otros (2011) en donde se evalúa la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la planta contra trece bacterias y nueve hongos; encontraron que existía actividad antibacterial contra cuatro bacterias Gram positivas y dos Gram negativas, además de que estas últimas eran menos sensibles que las primeras. En el caso de la actividad antifúngica solo dos especies fueron afectadas, *Candida albicans* (cepa clínica) y *Cryptococcus neoformans*. Igualmente determinaron la identidad del compuesto activo por IR y cristalografía de rayos X, siendo la misma molécula que el artículo antes mencionado, la berberina.

### ***Argemone platyceras* Sweet**

Esta especie perteneciente a la familia Papaveraceae, es una maleza espinosa anual con flores blancas. Está distribuida en la Ciudad de México y en los estados de Michoacán, Morelos, Puebla, Veracruz y Tlaxcala. Es una maleza muy común en los campos de cultivo abandonados, sobre suelos volcánicos de regiones elevadas (Martínez y Castillo, 2008). Varias etnias mexicanas utilizan la infusión de las flores como remedio para la tos, bronquitis y neumonía. Dentro de los compuestos reportados en esta planta se encuentran principalmente alcaloides isoquinolínicos terciarios y cuaternarios entre los que destacan la platycerina, munitagina, argemonina y protopina (Siatka *et al.*, 2017).

Su descripción botánica indica que es una planta herbácea anual, que tiene un látex amarillo, de 30 a 80 cm de alto: tallo uno o pocos, que se ramifican en dirección al ápice, el cual tiene espinas de largo similar; hojas glaucas, inferiores oblanceoladas, medianas y superiores elípticas de aproximadamente 30 cm de largo a 13 cm de ancho, algunas veces abrasadoras en la base, dentadas con terminación en espina fina, haz y envés provistos de espinas; botones florales en forma de cilindro, de 18 a 24 mm de largo y de 14 a 18 mm de ancho, con moderada presencia de espinas; flores carentes de brácteas, pétalos blancos, algunas veces ligeramente amarillos en su base, muy poco frecuente rosados o con el borde rosado, obcuineiformes; estambres con filamentos amarillos claro a rojizo-morado, anteras amarillas a moradas; estigma subsésil color púrpura; cápsulas de 4 a 5 carpelares, ampliamente elipsoides, de 2.5 a 4.5 cm de largo, sin tomar en cuenta las espinas que son abundantes, delgadas y fuertes; semillas de 2 mm de diámetro (Martínez y Castillo, 2008).

La información referente a esta especie es muy poca, en comparación con otras especies de este género. Hay pocos artículos relacionados con la presencia de alcaloides en *A. platyceras*, además de no ser actuales. La poca información disponible se presenta en artículos o tesis que recopilan los datos de diversas especies, como la tesis "Study of the alkaloids of *Argemone ochroleuca* in Saudi Arabia". En esta tesis se menciona que algunos

de los alcaloides encontrados en *A. platyceras* son: reticulina, estilopina, argemonina, norargemonina, munitagina, platycerina, alocriptopina, protopina y berberina (Al-Hayyan, 2006).

Cabe mencionar que únicamente hay dos artículos que hablan sobre la actividad biológica que presentan los componentes de esta planta. En 2005, el grupo de Fernández y colaboradores, realizaron un estudio sobre las propiedades antiasmáticas de la especie, así como la identificación del compuesto activo. Llevaron a cabo un estudio similar al realizado por Sánchez Navarrete para *A. ochroleuca*, utilizando músculo traqueal de cuyo. Sin embargo, en este estudio el compuesto al que se le atribuye el efecto relajante de músculo traqueal es la isoquercitrina.

Posteriormente, en 2017, Siatka y colaboradores presentaron un artículo respecto a la actividad como inhibidores de colinesterasa de algunos alcaloides aislados del *A. platyceras*, pues se sabe que algunos alcaloides poseen dicha actividad. En el estudio tuvieron resultados positivos respecto a esta actividad. Siendo la munitagina el compuesto con más activo, dentro de los alcaloides aislados.



**Figura 3. *Argemone platyceras* Sweet**

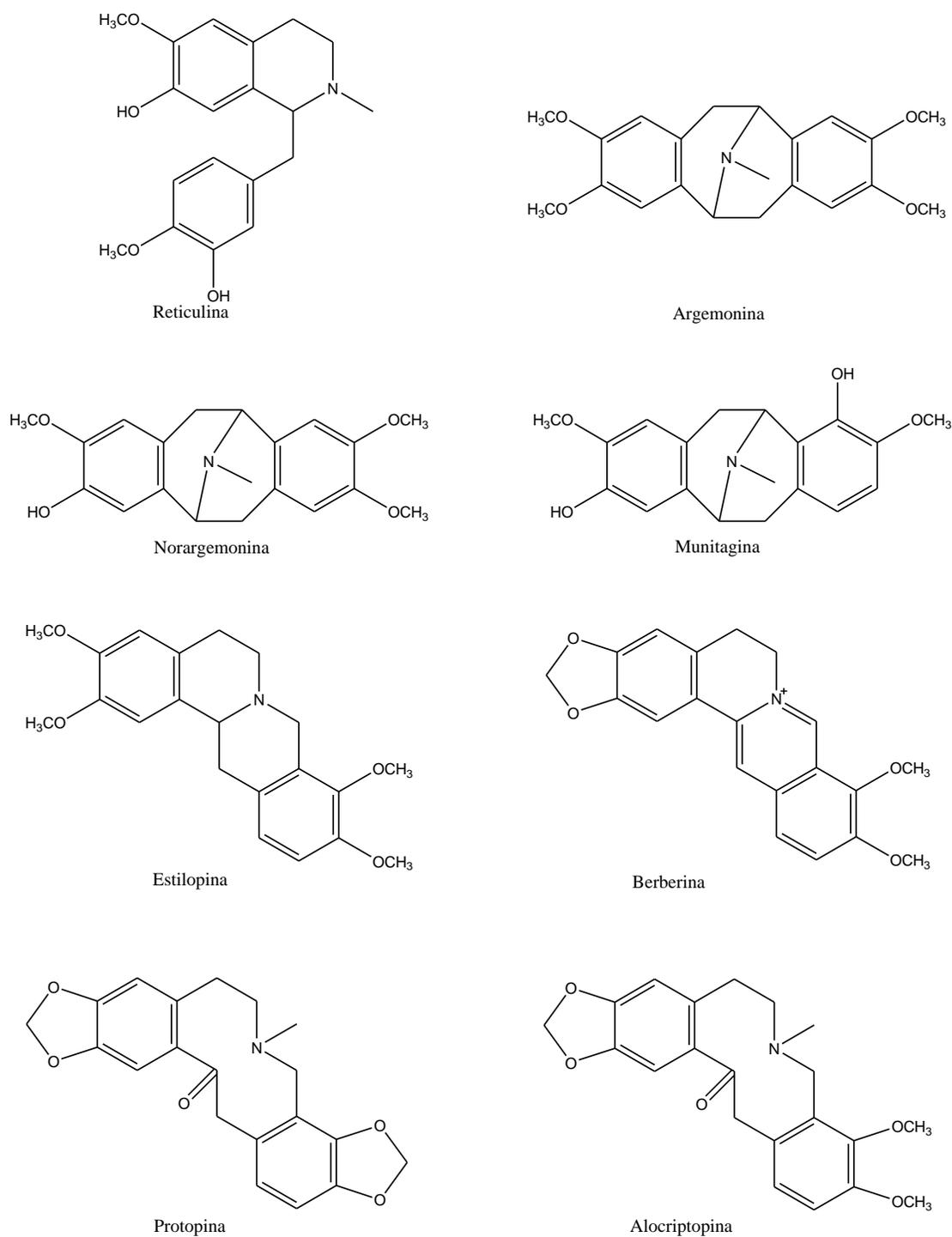


Figura 4. Estructuras de alcaloides reportados presentes en *Argemone platyceras*.

## Colinesterasas

Las colinesterasas son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético, una reacción que permite que las neuronas colinérgicas regresen a su estado basal después de ser activadas. Estas se pueden dividir en dos tipos.

1. Acetilcolinesterasa: (AChE) se encuentra en diversos tipos de tejido conductivo; como nervios, músculos, tejidos centrales y periféricos, fibras motoras y sensoriales, y fibras colinérgicas y no colinérgicas. Aunque su actividad es mucho mayor en neuronas motoras que en sensoriales. Esta también se encuentra en las membranas de los glóbulos rojos, donde se constituye el antígeno Yt. Se encuentra en diferentes formas moleculares, las cuales pueden tener propiedades catalíticas similares, pero varían en el ensamble oligomérico y en el modo al que se adhieren a la superficie de las células.
2. Pseudocolinesterasa: (BuChE) conocida como colinesterasa de plasma, butirilcolinesterasa o acetilcolina acilhidrolasa es encontrada principalmente en el hígado.

Los inhibidores de acetilcolinesterasas o anticolinesterasas, evitan que la colinesterasa lleve a cabo la hidrólisis de la acetilcolina, aumentando los niveles de esta última y la duración de la acción iniciada por el neurotransmisor. Estos también se dividen en dos grupos: reversibles e irreversibles. Los primeros se pueden separar a su vez en competitivos y no competitivos, y suelen tener aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, a los irreversibles se les han atribuido efectos tóxicos.

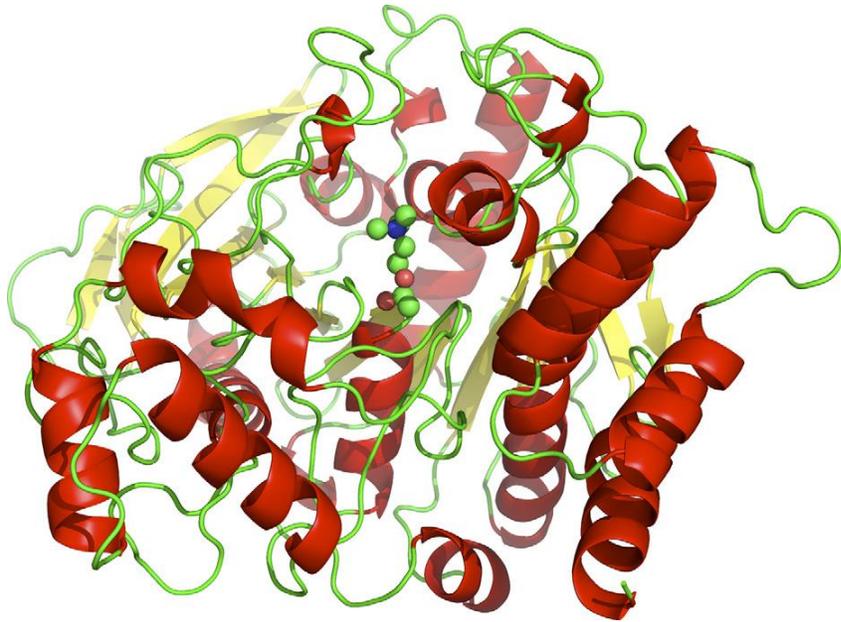


Figura 5. Estructura 3D de la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica* con presencia de un inhibidor del sitio activo (Silman y Sussman, 2008).

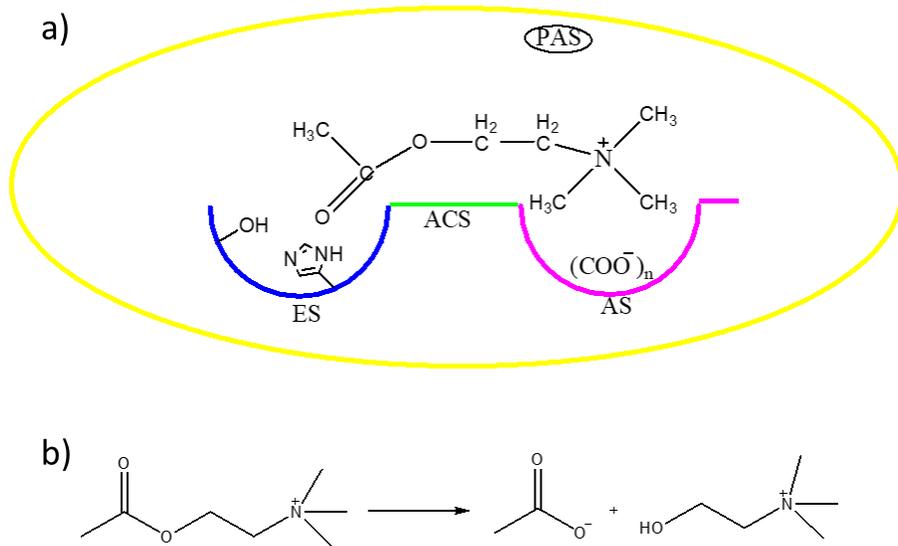


Figura 6. Representación esquemática de la acetilcolinesterasa a) los sitios de unión de AChE basados en estudios bioquímicos posteriores a la determinación de su estructura 3D. ES, sitio esteárico; AS, sitio aniónico; ACS, sitio de unión de cationes aromáticos; PAS, sitio de unión periférico antienico; b) Hidrólisis enzimática de ACh por AChE.

Los inhibidores de acetilcolinesterasa reversibles tienen un papel farmacológico importante en el control de dicha enzima. Estos pueden incluir compuestos que poseen distintos grupos funcionales como carbamatos o aminas terciarias y cuaternarias, actualmente algunos de estos han sido aplicados en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades como: miastenia gravis, Alzheimer, distensión de la vejiga, glaucoma etc. (Colovic *et al.*, 2013).

### **Alcaloides como inhibidores de acetilcolinesterasa**

El sistema colinérgico tiene un papel importante en el proceso de aprendizaje y en la memoria, por lo que la disfunción de éste es consistente con la constante pérdida de memoria observada en el padecimiento de Alzheimer. La hipótesis colinérgica propone que la restauración de la neurotransmisión colinérgica es una estrategia útil que puede aumentar la disponibilidad de la acetilcolina sináptica y aminorar la pérdida de memoria en pacientes con esta enfermedad.

Los tratamientos aprobados para el Alzheimer se centran en el enfoque colinérgico de mejorar la neurotransmisión. Estos medicamentos son: donepezil, rivastigmina y galantamina. Siendo este último un alcaloide que se aisló por primera vez de la *Galanthus nivalis* y algunas otras especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae.

Actualmente hay algunos inhibidores de colinesterasas que han sido aislados de diversas fuentes naturales, sin embargo, la mayoría de estos solo ha mostrado actividad in-vitro, siendo un porcentaje bajo el que ha sido probado en modelos animales, en donde es importante probar su capacidad para atravesar la barrera sangre-cerebro y tener los efectos benéficos en éste.

Dentro de estos inhibidores de colinesterasas, los alcaloides son considerados como los mejores candidatos para su uso en el tratamiento de Alzheimer debido a sus estructuras

que contienen nitrógeno, puesto que en los sitios de unión de la acetilcolinesterasa involucran la interacción con el nitrógeno con carga positiva.

Muchos de los alcaloides que poseen actividad anticolinesterasa han sido descritos en diferentes familias de plantas, como los alcaloides isoquinolínicos de la familia Amaryllidaceae y Papaveraceae; esteroidales en Buxaceae; quinolizidinas en Lycopodiaceae, y alcaloides indólicos de las familias Apocynaceae y Rubiaceae (Konrath *et al.*, 2013).

## ***Quorum sensing***

Una de las más grandes inquietudes en salud pública en la actualidad es el surgimiento y proliferación de cepas microbianas que han desarrollado resistencia múltiple a drogas, debido a esto los investigadores se han dado a la tarea de buscar nuevos microorganismos productores de antibióticos u otras alternativas que sirvan para manipular la virulencia en patógenos.

El *quorum sensing* es un sistema de comunicación célula a célula ampliamente observado en procariontes, en donde no solo se da una interacción entre estos en su proximidad cercana, sino que se toman decisiones colectivas. Este sistema es capaz de controlar la expresión y regulación de procesos más allá de las respuestas celulares normales, como puede ser la bioluminiscencia, la formación de biopelículas, la regulación de genes de virulencia, la producción de antibióticos, la fijación de nitrógeno, la biocorrosión, la formación de esporas, etc. (Kalia y Purohit, 2011)

Debido a la variedad de procesos que regula y los efectos que tiene sobre la agricultura y la salud, los estudios sobre el *quorum sensing* han aumentado notablemente en los últimos años. Uno de los aspectos que más ha llamado la atención es la posibilidad de utilizarlo como una herramienta terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los antibióticos usados en la actualidad se centran en inhibir procesos que son esenciales para la supervivencia de las bacterias, sin embargo, esto ha desembocado en mutaciones selectivas de bacterias resistentes a antibióticos. Asimismo, los sistemas de *quorum sensing* que utilizan algunas bacterias patógenas para regular su virulencia no son primordiales para la supervivencia de estas, por lo que esto podría disminuir la patogenicidad sin llevar a las bacterias a niveles en donde deban realizar mutaciones (Galloway *et al.*, 2011).

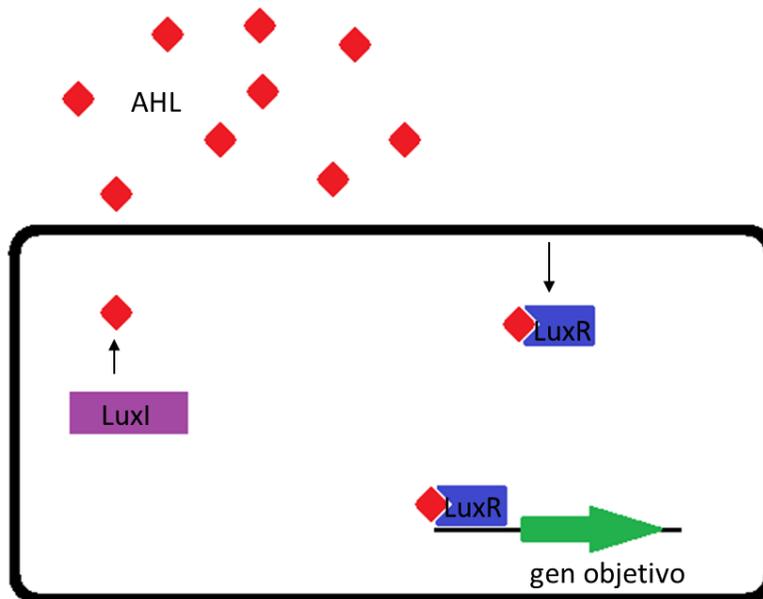


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de comunicación bacteriana conocido como *quorum sensing*.

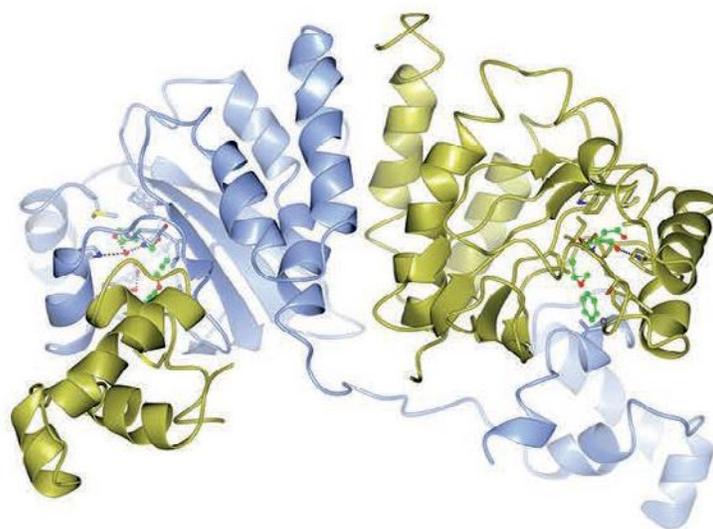


Figura 8. Estructura 3D de CViR de *Chromobacterium violaceum* unida al inhibidor clorolactona (Tomada de Pappenfort y Bassler, 2016).

En la vía regulatoria de genes por *quorum sensing*, las bacterias producen, intercambian, perciben y responden a señales bioquímicas llamadas autoinductores; de forma que cada célula individual dentro de una población de bacterias produce una señal, posteriormente la concentración total de esta señal en el medio será proporcional a la densidad celular de dicha población. Así, una vez alcanzada la concentración umbral de los autoinductores, la señal puede ser percibida y la expresión de los genes blanco es regulada (Grandclément *et al.*, 2015).

Los sistemas Gram-positivos típicamente usan oligopéptidos como señales, estos son secretados al exterior de la célula para posteriormente ser reconocidos por un sistema de dos componentes (Papenfert and Bassler, 2016). Los oligopéptidos son codificados como precursores y son diversos en secuencia y estructura, tienen un tamaño de 5 a 17 aminoácidos; al ser la membrana celular impermeable a péptidos es necesario que estos tengan transportadores especializados para ser secretados fuera de la célula. Estas señales extracelulares son detectadas mediante un sensor de cinasas de dos componentes unido a las membranas, este sensor se autofosforila en histidinas conservadas, y se provoca una cascada de fosforilación que desencadena en la expresión de genes.

Asimismo, los sistemas Gram-negativos utilizan sistemas tipo LuxI/LuxR homólogos al primer sistema descrito de *quorum sensing* de la bacteria simbiótica *Vibrio fischeri*. LuxI es una sintasa de autoinductores, comúnmente N-acilhomoserina lactonas (AHL). Cuando el autoinductor no está unido a la proteína tipo LuxR esta es rápidamente degradada, probablemente para evitar un “corto circuito” en el sistema de *quorum sensing*. La unión de estos estabiliza LuxR, permitiendo un cambio en su plegamiento, permitiendo la interacción con el ADN, y activando la transcripción de los genes objetivo. También se activa la expresión de *luxI*, lo que se describe como un ciclo de autoinducción por retroalimentación. Los homólogos LuxI/LuxR han sido identificado en más de 100 especies de bacterias Gram-negativas (Rutherford y Bassler, 2012).

Existen cuatro características que son encontradas en casi todos los sistemas de *quorum sensing* en bacterias Gram-negativas. En el primero, los autoinductores en estos sistemas son *N*-acilhomoserina lactonas, y otras moléculas sintetizadas a partir de *S*-adenosilmetionina, estas son capaces de difundirse libremente a través de la membrana bacteriana. En el segundo, se unen a receptores específicos que se encuentran en la membrana interna o en el citoplasma. En el tercero, usualmente alteran docenas de cientos de genes que controlan varios procesos biológicos. En el cuarto, tienen un ciclo de retroalimentación que promueve la expresión de genes sincrónica en la población (Papenfort y Bassler, 2016).

El sistema de señalización de *quorum sensing* más ampliamente estudiado es el que se da a través de los autoinductores *N*-acilhomoserina lactonas. La biosíntesis de estas involucra a intermediarios de la ruta biosintética de los ácidos grasos: *S*-adenosilmetionina (SAM) y una proteína acarreadora de acilos (Kalia y Purohit, 2011). Dependiendo de la especie de bacteria, estas moléculas difieren en el tamaño de la cadena acilo, de 4 a 18 carbonos. Esta cadena puede ser insaturada y algunas veces contiene en el carbono 3 una sustitución con grupo oxo o hidroxilo. Se cree que estas se unen y activan a un receptor proteínico; éste es un activador o represor transcripcional citoplásmico. LuxR es el prototipo de estas proteínas (Koch *et al.*, 2005).

Los receptores de *N*-acilhomoserina lactonas tipo LuxR son homodímeros que tienen aproximadamente 250 residuos de aminoácidos de longitud en un plegamiento con dos módulos funcionales. El dominio N-terminal (NTD) contiene un sitio de unión a AHL, y el dominio C-terminal (CTD) posee actividad de unión a ADN. Aislados, los dos sitios pueden llevar a cabo sus respectivas funciones independientemente; cuando se encuentran integrados en un polipéptido, los dos dominios están unidos mediante un linker conformacionalmente flexible, y la unión de AHL a NTD modula la función de unión a ADN de CTD. Las proteínas tipo LuxR pueden ser activadores de transcripción: la presencia de

AHL lleva a la unión de proteínas tipo LuxR con los objetivos de ADN en posiciones de promotores de activación transcripcional de genes controlados (Churchill y Chen, 2011).

### **Inhibición de *quorum sensing***

La inhibición del *quorum sensing* es el proceso por el cual es interrumpido o bloqueado. Éstos pueden ser interrumpidos, por:

- i. La inhibición de la síntesis de AHL bloqueando las proteínas sintetas tipo LuxI.
- ii. La degradación enzimática de moléculas de señal, la cual previene la acumulación estas en el medio deteniendo la comunicación por medio del *quorum sensing*.
- iii. La interferencia con los receptores de señal o el bloqueo de la formación del complejo AHL/LuxR. Estas estrategias pueden ser utilizadas para lograr la inhibición del *quorum sensing* mediado por AHLs en bacterias Gram-negativas y del *quorum sensing* mediado por AIPs en bacterias Gram-positivas (Kweon, 2014).

Hay algunos compuestos sintetizados químicamente que inhiben el *quorum sensing*, pero la mayoría de los antagonistas han sido descubiertos en extractos de plantas. Un ejemplo de éstos son las furanonas halogenadas producidas por el alga roja marina *Delisea pulchra* que interfiere al sistema regulatorio de AHL en varias bacterias Gram-negativas. Ciertas partes de plantas como los brotes de chícharo (*Pisum sativum*) también producen exudados que contienen compuestos que pueden interferir con el QS (LaSarre y Federle, 2013).

## II. HIPÓTESIS

Los alcaloides presentes en las especies de *Argemone ochroleuca* y *A. platyceras* son marcadores adecuados en la obtención del perfil fitoquímico por HPTLC.

## III. OBJETIVO GENERAL

Obtener el perfil por HPTLC de diversos extractos de dos especies del género *Argemone*, confirmando su estructura por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EIMS), para conocer la variedad de alcaloides presentes en dichas plantas, así como para realizar ensayos de actividad biológica.

## IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar el método de extracción para alcaloides.
- Obtener el perfil de especies y tejidos por HPTLC.
- Cuantificación de alcaloides por HPTLC.
- Confirmación de alcaloides por GC-EIMS.
- Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa por TLC.
- Ensayo de inhibición de *quorum sensing* por bioautografía.

## **V. MÉTODOLÓGÍA**

### **Material y equipo**

#### **Material biológico**

Los especímenes de *Argemone ochroleuca* se obtuvieron de los alrededores de las instalaciones del CINVESTAV Irapuato, Guanajuato a 101°20'48" longitud oeste, 20°40'18" latitud oeste a 1730 msnm; la muestra de *Argemone platyceras* se obtuvo de la comunidad de Zacatlán, Puebla a 97°57'36" longitud oeste, 19°55'55" latitud norte a 2040 msnm. Para los ensayos de inhibición de quorum sensing se utilizó la bacteria *Chromobacterium violaceum* cepa CV026 obtenida de CINVESTAV Zacatenco.

#### **Reactivos**

Se utilizó ácido sulfúrico de la marca High Purity, hidróxido de amonio de la marca KEM, metanol y etanol absoluto de la marca Karal, cloroformo de la marca J. T. Baker, acetato de etilo de la marca Mellinckrot.

#### **Material y equipo para cromatografía de placa fina**

Para los ensayos cromatográficos en placa, se utilizaron placas TLC de aluminio recubiertas de gel de sílice F<sub>254</sub> de la marca Sigma-Aldrich y placas HPLTC recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de la marca Merk. Para la aplicación de muestras en TLC y HPTLC se utilizó el Automatic TLC Sampler 4 y para la visualización el Visualizer y para el análisis de estas el software visionCATS todos de la marca CAMAG.

#### **Material para los ensayos de inhibición**

Para los ensayos de inhibición de quorum sensing se utilizó la N-hexanoil-homoserina lactona previamente sintetizada en el laboratorio de Fitobioquímica, además del antibiótico Kanamicina de la marca Sigma-Aldrich.

Para los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa se utilizó la enzima Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* de 500 U/mg, además de Tris-HCl, 2-naftilacetato y la sal Fast Blue B todos de obtenidos de Sigma-Aldrich.

### **Equipo para cromatografía de gases y espectrometría de masas**

El análisis de GC-EIMS se realizó con un cromatógrafo de gases modelo 7890 A acoplado un detector selectivo de masas modelo Hewlett Packard 5975 C con ionización por impacto electrónico, un cuadrupolo simple para la separación de iones y electromultiplicador de triple eje, con la columna HP-5 MS (30 x 25 x 0.25) m y una columna J&W DB-1MS (30 x 25x 0.25) con una fase estacionaria de 100% dimetilpolisiloxano y helio como gas acarreador.

## **Métodos**

### **Métodos de extracción de alcaloides**

Se realizaron tres diferentes métodos de extracción para los tejidos de raíz, semillas, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hoja de *A. ochroleuca*, posteriormente se eligió el más adecuado para este estudio. En cada uno de los casos se pesaron y trituraron 144 mg de cada uno de los tejidos-

En el primero de ellos, método A, se agregó un volumen 20:1 p/v de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M y se dejó macerando por 20 h, cumplido el tiempo se filtró la mezcla y la solución resultante se llevó a pH 10 con hidróxido de amonio; para finalizar se hizo una extracción líquido-líquido con cloroformo, se separó la fase orgánica, se evaporó a sequedad para resuspender con 1 mL de metanol y se guardó en un tubo Eppendorf a 4°C hasta su uso.

En el método B, se realizó la maceración agregando un volumen 20:1 p/v de una solución de NH<sub>4</sub>OH 0.1 M y se maceró por 20 h, posteriormente se filtró la mezcla y se realizó una

extracción líquido-líquido con cloroformo, se separó la fase orgánica, se evaporó a sequedad para resuspender con 1 mL de metanol y se guardó en un tubo Eppendorf a 4°C hasta su uso.

Para el método C, únicamente se realizó una maceración con etanol por 24 h, se evaporó a sequedad para resuspender con 1 mL de metanol y se guardó en un tubo Eppendorf a 4°C hasta su uso.

Posteriormente se realizaron los extractos de *A. ochroleuca* y *A. platyceras* para las siguientes pruebas, pesando la misma cantidad de tejido para cada uno.

### **Perfil de alcaloides por TLC/HPTLC**

Para elegir el sistema de solventes más adecuado para desarrollar las placas de TLC se utilizaron dos sistemas de solventes para observar el comportamiento de los compuestos y la mejor separación de estos. El primero fue acetato de etilo: metanol: agua 30:10:4 y el segundo cloroformo: metanol 8:2.

Una vez elegido el solvente adecuado se realizó una placa de HPTLC de 20x10 cm, aplicando 1 µL de clorhidrato berberina como estándar en una concentración de 0.1 mg/mL, además 5 µL de cada uno de los extractos, desarrollando la placa en una cámara previamente saturada. Al término del desarrollo, se retiró la placa de la cámara, se evaporaron los solventes y se hizo un registro con el Visualizer de CAMAG, para posteriormente analizar la imagen con el software VisionCATS.

También se utilizaron placas de HPTLC para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos presentes en los extractos. Para esto se realizó una curva de calibración de 6 concentraciones de berberina y posteriormente se aplicaron 2 µL de cada uno de los extractos, se desarrolló la placa y después se efectuó la cuantificación por medio del programa VisionCATS.

## **Análisis por GC-EIMS**

Para el análisis por GC-EIMS se utilizó el siguiente método con una columna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m), con EI 70 eV, temperatura del inyector de 280°C, con una rampa de temperatura inicial de 100 a 180°C a 15°C/min, manteniéndose a 180°C por 1 min, con la siguiente rampa de 180 a 300°C a 5°C/min, con un flujo de helio de 1 mL/min.

La colección de los datos de los cromatogramas se realizó con el programa MSD ChemStation Data Analysis Application de Agilent, obteniéndose el TIC con los tiempos de retención, estos cromatogramas se analizaron mediante el programa AMDIS, el cual lleva a cabo la deconvolución de los datos obtenidos por GC-EIMS para encontrar todos los compuestos separados, una vez que se obtiene los espectros de masas de los compuestos estos se identificaron mediante comparación con el NIST Mass Spectral System de la biblioteca NIST.

## **Ensayo de inhibición del mecanismo de *quorum sensing* por bioautografía**

La bacteria *Chromobacterium violaceum* cepa CV026 se activó a 37°C por 24 h, posteriormente se procedió a sembrar en medio LB sólido con Kanamicina en una concentración de 25  $\mu$ g/mL incubada a 37°C y repitiendo la siembra cada semana para su conservación, para el ensayo, se inoculó la batería en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB líquido con Kanamicina a 25  $\mu$ g/mL por duplicado, en uno de los matraces se agregó además la molécula señal *N*-hexanoil homoserina lactona para monitorear el crecimiento de la bacteria y verificar que no hubiera perdido la capacidad de producir violaceína, se incubó a 37°C con agitación horizontal durante 24 h.

Para este ensayo se aplicaron diferentes cantidades de extracto sobre placas TLC de aluminio a 1 cm de distancia de la base y se desarrollaron con el sistema de solventes acetato de etilo: metanol: agua (30:10:4) en una cámara previamente saturada, el frente del solvente se dejó a 2 cm del borde de la placa, al término del desarrollo de la placa, se

secó la placa por completo. Posteriormente en un matraz Erlenmeyer se colocaron 150 mL de medio LB con 1% de agar, se fundió hasta eliminar grumos, se llevó a una temperatura de 45°C y se agregaron Kanamicina 25 µg/mL y la *N*-hexanoilhomoserina lactona a 2.5 µM, se mezcló con los 50 mL de medio con la bacteria previamente inoculada y se vertieron sobre la placa de TLC. Se permitió la solidificación del medio y se colocó la placa en una charola con agua suficiente para conservar la humedad y se cubrió con una lámina de aluminio. Se dejó incubar por 24 h a 37°C para observar la producción de violaceína.

### **Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa**

Para realizar los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa, primero se realizó una placa de TLC colocando 50µL de los extractos de los tejidos de ambas especies, se eluyó en el sistema de solventes previamente seleccionado y se dejó secar dentro de la campana hasta la total evaporación de los solventes.

Se preparó una solución con la enzima acetilcolinesterasa 500 U/mg con 1mL de Tris-HCl 0.05 M a un pH de 7.8 y se adicionó el equivalente a 1 mg/mL de albúmina para estabilizar la enzima. De ésta se realizaron alícuotas de 20 µL en una concentración de 20U/mL en tubos Eppendorf de 0.5 mL y se mantuvieron a 20°C hasta su uso. Para realizar el ensayo se realizaron 20 mL de solución de acetilcolinesterasa a 1U/mL de con las alícuotas previamente preparadas. Esta solución se asperjó sobre la placa de TLC previamente realizada, la cual se colocó en una cámara húmeda sin que esta tuviera contacto con el agua y se llevó a incubar a 37°C por 1 h para lograr la estabilización.

Posterior a esto, se preparó una solución de 2-naftilacetato en etanol (1) 2.5 mg/mL y otra de Fast Blue B (2) disolviendo 250 mg en 4 mL de agua para posteriormente agregar 98 mL de etanol y obtener una concentración 2.5 mg/mL, al término de la incubación se asperjó la placa con la solución 1 y se dejó secar la placa durante unos minutos, después se sumergió la placa en la solución 2, se evaporó y se esperaron 15 min para el desarrollo de la coloración.

## **VI. RESULTADOS**

### **Extracción de alcaloides**

Para seleccionar el método de extracción más adecuado para la obtención de alcaloides, se probaron tres distintos procedimientos, y posteriormente se realizaron análisis de TLC y CG-EIMS para cada uno de ellos.

Por medio de TLC, fue posible visualizar los compuestos contenidos en el extracto a través del bandeo que se forma al correr la placa; esto fue posible debido a que se sabe que algunos de los alcaloides contenidos en plantas del género Argemone poseen estructuras con más de un anillo aromático lo que les confiere ciertas características que facilitan su estudio, como lo es la fluorescencia al observarse bajo luz UV 366 nm. Por lo tanto, es posible inferir que las bandas que presentan esta fluorescencia puedan ser compuestos de interés.

Anterior a la comparación de extractos se realizaron tres pruebas para sistemas de solventes, cada una con un sistema diferente, para evaluar el más adecuado para este análisis, siendo seleccionado el conformado por acetato de etilo:metanol:agua en una proporción 30:10:4.

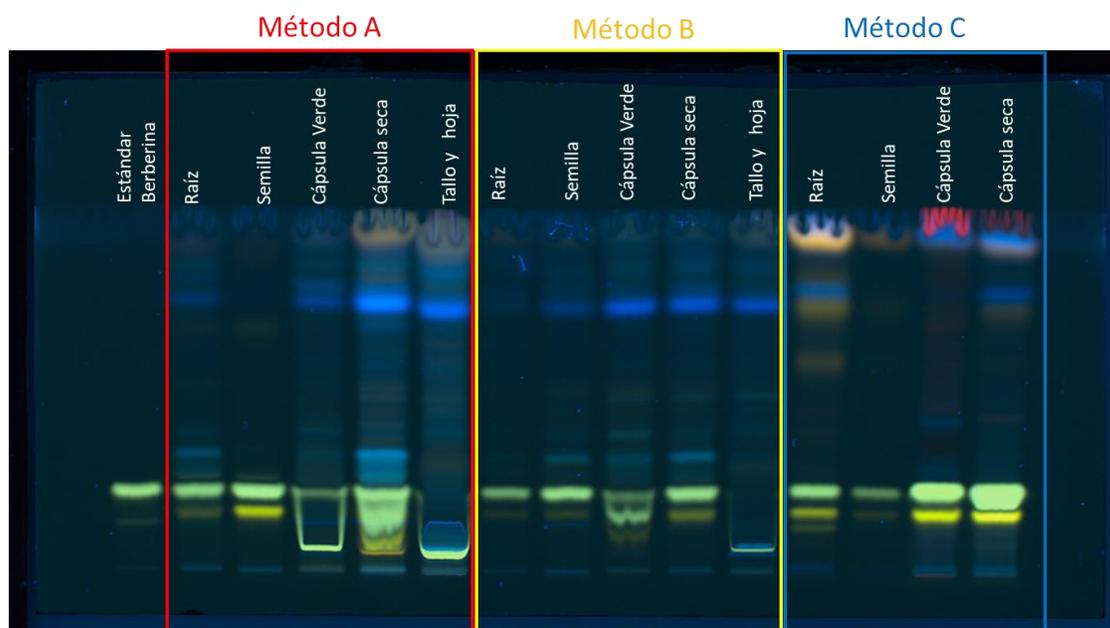
Posteriormente se llevó a cabo la comparación de los extractos, para esto se colocó la misma cantidad de cada uno de ellos en una placa de TLC, además de un estándar de berberina, y se corrió en el sistema de solventes seleccionado, al finalizar se tomó una fotografía con el Visualizer de CAMAG en luz visible, UV 254 nm y UV 366 nm, como se mencionó antes la luz UV 366 nm es la más útil para este análisis, en donde se observó el patrón de bandeo de cada uno de los extractos.

Cabe resaltar que en casi todos los extractos es visible una banda verde que parece corresponder a la berberina en un  $R_f = 0.3$ , además de que debajo de esta, en un  $R_f 0.2$ ,

hay una banda amarilla que también tienen en común la mayoría de los extractos, aunque puede verse que se encuentra en distintas concentraciones.

Asimismo, podemos decir que el método C es el que muestra una menor cantidad de bandas una vez desarrollada la placa, mientras que el método A posee un patrón de bandeado mayor, lo que nos indica que, en este caso, esta opción permite la extracción de más compuestos, aunque hay que estar conscientes de que es probable que no todas las bandas observadas correspondan a alcaloides.

### Comparación de los métodos de extracción



**Figura 9.** Comparación de extractos de *Argemone ochroleuca* obtenidos por diferentes métodos de extracción en TLC. Sistema de solventes para el desarrollo de la placa acetato de etilo:metanol:agua 30:10:4, vista bajo luz UV 366 nm, sin derivatización.

## Perfil de alcaloides por TLC/HPTLC

La elaboración de un perfil por HPTLC es útil para tener un patrón de compuestos presentes en los extractos. Este es el objetivo del proyecto Perfil Fitoquímico de la Flora de Mesoamérica. Se pretende que sea parte de un registro que contenga especies mexicanas utilizadas dentro de la herbolaria tradicional, para conocer y conservar el conocimiento, además conocer y registrar sus perfiles fitoquímicos.

Asimismo, es importante observar la distribución de los alcaloides dentro de la planta para así saber identificar los tejidos que se deban usar si se necesita algún compuesto en particular, donde se encuentra en mayor cantidad y así únicamente trabajar con los extractos necesarios.

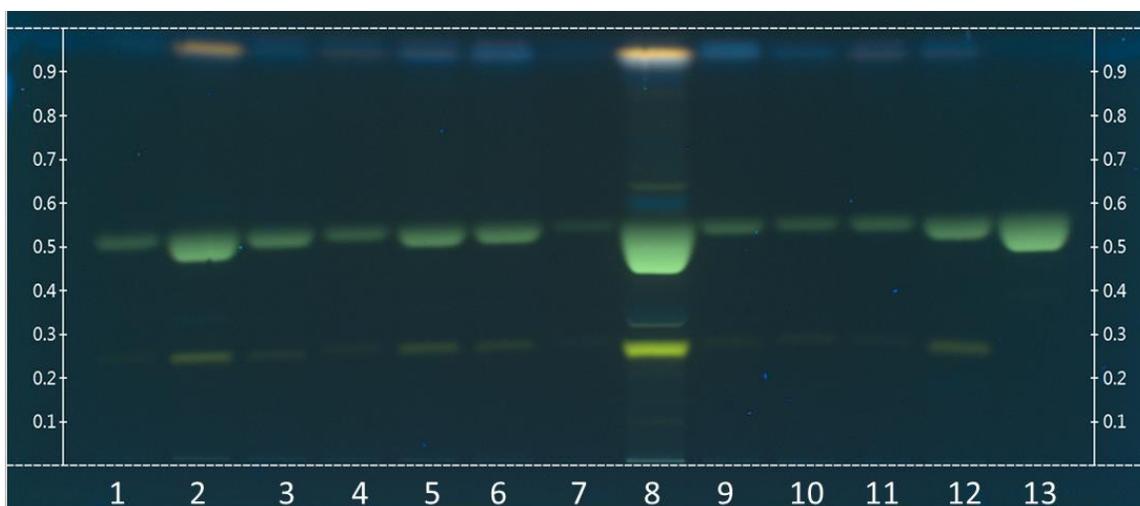
El perfil debe mostrar las diferencias que existen, por una parte, entre los diferentes componentes. Por ejemplo, el perfil bajo luz UV 366 nm y por otra la presencia de los marcadores, en este caso los alcaloides

Por lo que, una vez escogido el método de extracción, se utilizó para la obtención de los extractos de los siguientes tejidos para ambas plantas: tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hojas. Los extractos se realizaron pesando la misma cantidad de muestra para cada extracto.

Una vez obtenidos los extractos y aplicados en la placa de HPTLC junto con el estándar de berberina, se corrieron con el sistema de solventes cloroformo:metanol en una proporción 80:20, posteriormente se tomaron las fotos de la placa con luz visible, UV 254 y UV 366.

Teniendo la berberina un  $R_f = 0.54$  y observándose una banda verde claro que todos los extractos poseen dentro de este  $R_f$ . Asimismo, se observa otra banda en común para todos, de color amarillo en el  $R_f = 0.26$ . Sin embargo, en el caso de los extractos de corteza de raíz y cápsula seca de *A. ochroleuca*, y corteza de raíz de *A. platyceras*, se puede

observar en el Rf 0.94, una banda naranja que no poseen los demás extractos. Podemos observar que cada uno de los carriles tienen ligeras variaciones dependiendo del extracto que se esté observando.



**Figura 10.** Placa de HPTLC de los extractos de *Argemone ochroleuca* los carriles 1 al 6; *Argemone platyceras* en carriles 7 al 12; y estándar de berberina en el carril 13. En ambos casos los extractos son tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hoja mostrados en ese orden. Sistema de solventes CH<sub>3</sub>Cl:CH<sub>3</sub>OH 80:20, visto bajo luz UV 366 nm sin derivatización.

Si prestamos atención a los perfiles más variados entre las dos especies, notamos extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca* es el que tiene un mayor número de bandas, mientras que, para *A. platyceras* es el extracto de corteza de raíz.

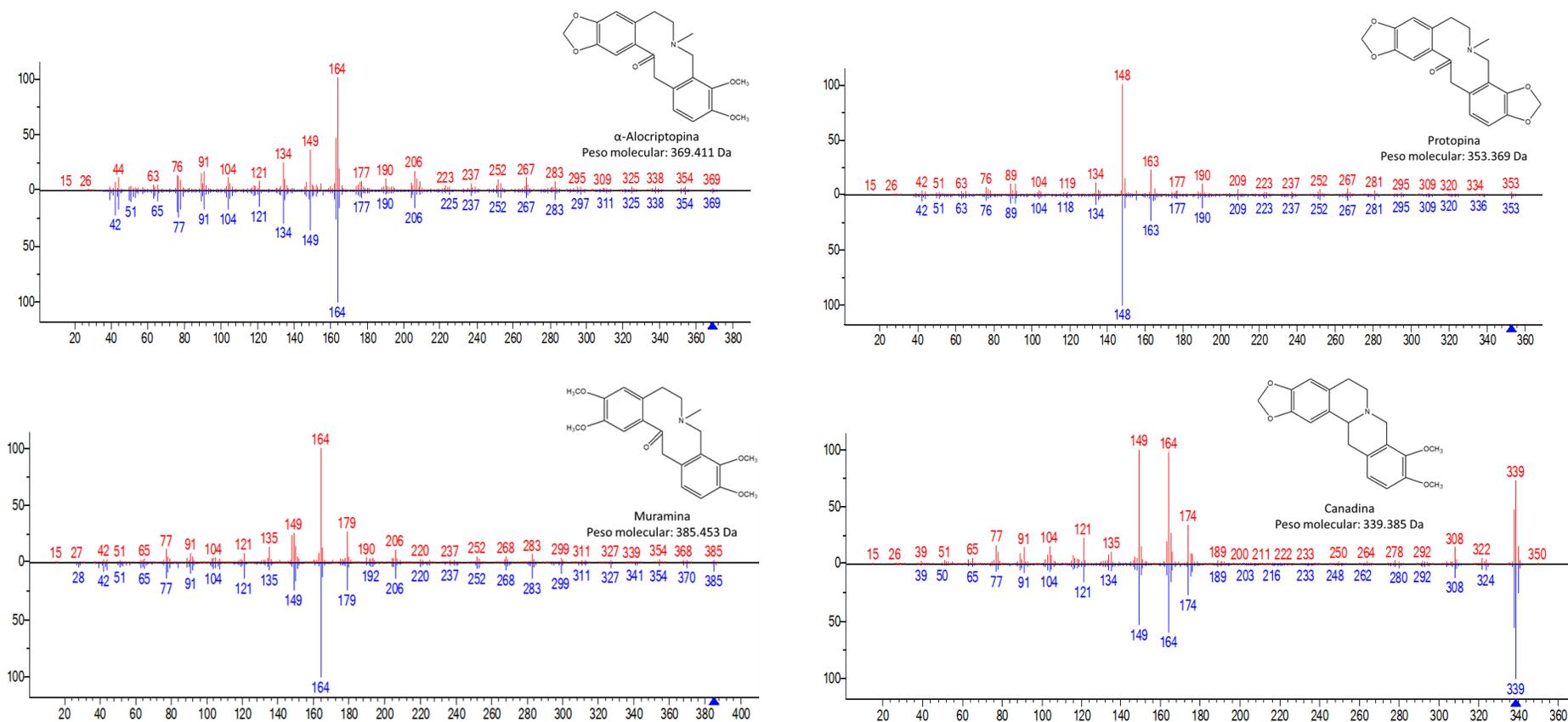
A simple vista podemos ver que los extractos poseen tienen perfiles diferentes, sin embargo, es necesaria la confirmación de los compuestos presentes mediante algún otro análisis que nos ayude a tener más información sobre la identidad de estos; por lo que en este caso utilizamos GC-EIMS. Así, se analizaron cada uno de los extractos bajo las mismas condiciones. En los extractos de *Argemone ochroleuca* únicamente se observan cuatro compuestos, siendo la  $\alpha$ -alocriptopina y la protopina los alcaloides que se encuentran en todas las muestras, los otros dos encontrados son la canadina y la muramina ambos presentes en el extracto de cápsula seca; la canadina es un alcaloide tipo protoberberina, mientras que, los tres restantes son tipo protopina; uno de los indicadores que tenemos de que efectivamente son alcaloides, es el ion molecular con número impar, lo cual es propio de estructuras que contienen átomos de nitrógeno en número impar.

La identificación se dio por medio de la comparación de los espectros obtenidos experimentalmente y los contenidos en la biblioteca NIST, para estos compuestos, todos los espectros coincidían con lo mostrado por la biblioteca.

Cabe mencionar que sabemos por HPTLC que hay presencia de berberina en los extractos, sin embargo, este compuesto no se identificó en GC-EIMS. Esto es debido a que tanto la berberina como algunos otros alcaloides tipo benzofenantridina o protoberberina no se logran volatilizar por este método, por lo que es necesario utilizar otros métodos de espectrometría de masas, como inyección directa por electrospray, en donde efectivamente vemos la presencia de dicho alcaloide y de algunos otros que tienen el mismo problema.

Extracto	Tiempo de retención Tr	Pureza	Ion molecular m/z	Fragmentos principales m/z	Match AMDIS	Compuesto
<b>Raíz (tejido vascular)</b>	28.097	100	369	164, 163, 149, 134, 206, 165, 91, 77, 89, 44	890	$\alpha$ -Alocriptopina
<b>Raíz (tejido corteza)</b>	28.097	68	353	148, 163, 149, 134, 91, 89, 190, 76, 165, 267	921	Protopina
<b>Cápsula verde</b>	28.096	93	369	164, 163, 149, 134, 165, 91, 206, 89, 77, 76	885	$\alpha$ -Alocriptopina
<b>Cápsula verde</b>	28.126	69	353	148, 163, 149, 134, 165, 91, 77, 76, 89, 104	841	Protopina
<b>Cápsula seca</b>	27.806	83	339	149, 164, 339, 338, 174, 165, 121, 163, 77, 150	900	Canadina
<b>Cápsula seca</b>	28.310	92	369	164, 163, 149, 206, 134, 165, 283, 267, 77, 104	841	$\alpha$ -Alocriptopina
<b>Cápsula seca</b>	28.642	59	385	164, 172, 149, 148, 150, 165, 135, 206, 77, 91	847	Muramina
<b>Tallo</b>	28.096	92	369	164, 163, 149, 134, 91, 165, 206, 89, 76, 77	880	$\alpha$ -Alocriptopina
<b>Tallo</b>	28.129	70	353	148, 163, 149, 134, 165, 91, 77, 76, 104, 89	837	Protopina
<b>Hoja</b>	28.116	87	369	164, 163, 149, 134, 91, 165, 89, 206, 76, 77	886	$\alpha$ -Alocriptopina
<b>Hoja</b>	28.148	72	353	148, 163, 149, 134, 91, 165, 76, 89, 77, 190	855	Protopina

Tabla 3. Análisis de GC-EIMS de los diferentes extractos de *Argemone ochroleuca*, se presentan los tiempos de retención observados en GC, además de los fragmentos de masas de los compuestos identificados (Para más detalle los cromatogramas se muestran en el apéndice 1).



**Figura 11.** Espectros de masas de los compuestos encontrados en los extractos de *Argemone ochroleuca*. Se muestran los espectros experimentales (rojo) en comparación con los espectros de la biblioteca NIST (azul). Se muestran las estructuras de cada uno de los compuestos.

Si bien en los extractos de *Argemone platyceras* también se tiene presencia de  $\alpha$ -alocriptopina y protopina, estos alcaloides solo se observan en dos de los extractos, tejido de corteza de raíz y cápsula verde; en tales extractos tenemos la presencia de alcaloides tipo pavinas, aunque estos no se encuentran registrados dentro de la biblioteca NIST, por lo que fue necesario buscar en la literatura información acerca de su patrón de fragmentación para realizar la confirmación de dichos alcaloides.

Cabe mencionar que hay ciertos fragmentos que se encuentran presentes en los espectros de los distintos compuestos que hemos analizado, estos son 204, 190, 164 y 149  $m/z$ , con base en esto podemos asumir que son compuestos que poseen estructuras químicas similares, lo cual es consistente con lo que sabemos.

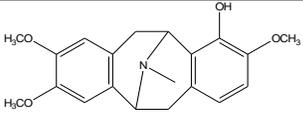
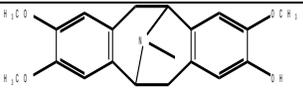
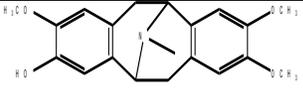
El compuesto con ion molecular 327  $m/z$ , el cual podemos suponer que es un alcaloide debido a que es un número impar (lo cual indica presencia de nitrógeno dentro de la estructura), corresponde a lo que el grupo de Siatka et al. reportó en 2017, en donde mencionan que los fragmentos para este ion molecular fueron 327, 326, 190  $m/z$ , siendo 190  $m/z$  el ion padre. En el espectro de masas que se obtuvo experimentalmente podemos observar el ion molecular 327  $[C_{19}H_{21}NO_4]^+$  y 326, los cuales representan el ion molecular con la correspondiente contribución isotópica; el ion principal 190 el cual corresponde al fragmento  $[C_{11}H_{12}NO_2]^+$  con pérdida de 137 Da, otro de los fragmentos principales encontrados que no se encuentra reportado de 175  $[C_{10}H_9NO_2]^+$ , representando una pérdida de 15 Da con respecto al fragmento antes mencionado, lo cual equivale a un ion metilo  $[CH_3]^+$ . Al realizar la fragmentación de la molécula y la comparación con los fragmentos reportados con los obtenidos experimentalmente, podemos proponer que el compuesto presente en este extracto es la munitagina, la cual es un alcaloide tipo pavina, previamente reportado en diferentes especies del género *Argemone* incluida *A. platyceras*.

Para el compuesto con ion molecular 341  $m/z$  también fue necesaria la búsqueda de información que nos pudiera ayudar a identificar esta molécula, el artículo mencionado

anteriormente fue el mismo utilizado para obtener información de fragmentos observados en espectrometría de masas de algunos alcaloides presentes en *A. platyceras*. Hay reportados tres compuestos que poseen un ion molecular de 341, los cuales son isómeros estructurales en donde solo cambia la posición de un grupo hidroxilo, estos son isonorargemonina, norargemonina y platycerina.

Así para el ion molecular 341 se tiene la fórmula  $[C_{20}H_{23}NO_4]^+$ , el artículo de Siatka menciona únicamente la fragmentación de la platycerina y la norargemonina, en la primera se tienen 341, 340, 204 y 190  $m/z$ , en donde 204  $m/z$ , es el ion padre; siendo los mismos fragmentos que los reportados para norargemonina, aunque el ion padre es 190  $m/z$ . Al realizar la comparación de estos fragmentos con los obtenidos experimentalmente, podemos observar que corresponden a los reportados para platycerina, al revisar el patrón de fragmentación de la molécula tenemos que el ion principal 204 es un fragmento  $[C_{12}H_{14}NO_2]^+$  que se da después de la pérdida de un ion de 137 Da. A continuación, se presenta el fragmento 190  $[C_{11}H_{12}NO_2]^+$  al perderse un ion de 14 Da. Por último está el fragmento 175  $[C_{10}H_9NO_2]^+$  tras la pérdida de un metilo de 15 Da. Por lo tanto, podemos suponer que este compuesto es la platycerina, la cual también es un alcaloide tipo pavina, y su nombre proviene de la especie con la cual se trabajó.

**Tabla 4. Principales fragmentos reportados en la literatura para los compuestos platycerina, isonorargemonina y norargemonina.**

Estructura	Nombre	Ion molecular $m/z$	Principales fragmentos reportados $m/z$
	Platycerina	341	341, 340, <b>204</b> , 190
	Isonorargemonina	341	-
	Norargemonina	341	341, 340, 204, <b>190</b>

Sin embargo, para el compuesto con ion molecular 399, que se presenta en los extractos de tejido vascular de raíz y de cápsula seca, la situación es diferente, puesto que no se encuentra dentro de la biblioteca NIST y no hay información en la literatura al respecto de algún alcaloide dentro de las familias antes mencionadas que posea un peso molecular que corresponda con lo observado. Se buscó en diferentes bases de datos, pero se encontró registro de un compuesto con ese peso molecular y que mostrara el patrón de fragmentación que se obtuvo.

Si bien, sabemos que por el ion molecular impar el compuesto tiene dentro de su estructura un átomo de nitrógeno, además los fragmentos principales corresponden a los anteriormente observados en compuestos como la munitagina y la platycerina, además el fragmento  $341\ m/z [C_{20}H_{23}NO_4]^+$ , corresponde al peso molecular de tres compuestos tipo pavina. Con estos datos podemos suponer este compuesto puede tener relación con este tipo de alcaloides, aunque no hay información en la literatura que soporte este hecho, además como ya se mencionó antes, los fragmentos 204, 190 y 175  $m/z$ , también se encuentran presentes en este tipo de alcaloides.

Del ion molecular 399 a 341  $m/z$ , se tiene una pérdida de 58 Da, esta es común y esta reportada como una acetona de estructura  $CH_3C(=O)CH_2 + H$ , esta se da por un rearrreglo a partir de intercambio de hidrógeno. Esto podría ser de ayuda para determinar la estructura, sin embargo, para poder confirmar la identidad de este compuesto, sería necesario realizar una serie de análisis más profundos, incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN).

Tabla 5. Datos de los compuestos observados por GC-EIMS de los extractos de *Argemone platyceras*.

Extracto	Tiempo de retención	Pureza	Ion molecular	principales Fragmentos	Match AMDIS	Compuesto
			<i>m/z</i>	<i>m/z</i>		
Raíz (tejido vascular)	26.436	81	399	204, 190, 341, 340, 205, 262, 191, 175, 342, 163	-	No identificado
Raíz (tejido vascular)	26.436	78	341	204, 190, 341, 340, 205, 191, 175, 342, 163, 326	-	Platycerina
Raíz (tejido corteza)	26.449	89	341	204, 190, 341, 340, 205, 191, 175, 342, 163, 326	-	Platycerina
Raíz (tejido corteza)	26.700	78	327	190, 327, 326, 191, 175, 328, 156, 312, 147, 42	-	Munitagina
Raíz (tejido corteza)	28.145	91	369	164, 163, 149, 134, 165, 91, 206, 89, 76, 190	886	$\alpha$ -Alocriptopina
Raíz (tejido corteza)	28.164	81	353	148, 163, 149, 190, 134, 91, 165, 89, 190, 76, 77	891	Protopina
Cápsula verde	26.437	74	399	204, 190, 341, 340, 205, 191, 175, 342, 163, 399	-	No identificado
Cápsula verde	26.678	81	327	190, 327, 326, 191, 175, 328, 156, 312, 147, 42	-	Munitagina
Cápsula verde	26.751	71	341	190, 327, 326, 191, 175, 328, 156, 312, 147, 42	-	Norargemonina
Cápsula verde	28.096	67	369	164, 163, 149, 134, 165, 206, 91, 77, 76, 135	878	$\alpha$ -Alocriptopina
Cápsula verde	28.115	64	353	148, 163, 149, 134, 165, 91, 190, 89, 77, 76	822	Protopina
Tallo	26.432	50	341	204, 190, 341, 340, 205, 191, 175, 342, 163, 326	-	Platycerina
Hoja	26.431	82	341	204, 190, 341, 340, 205, 191, 175, 342, 163, 326	-	Platycerina

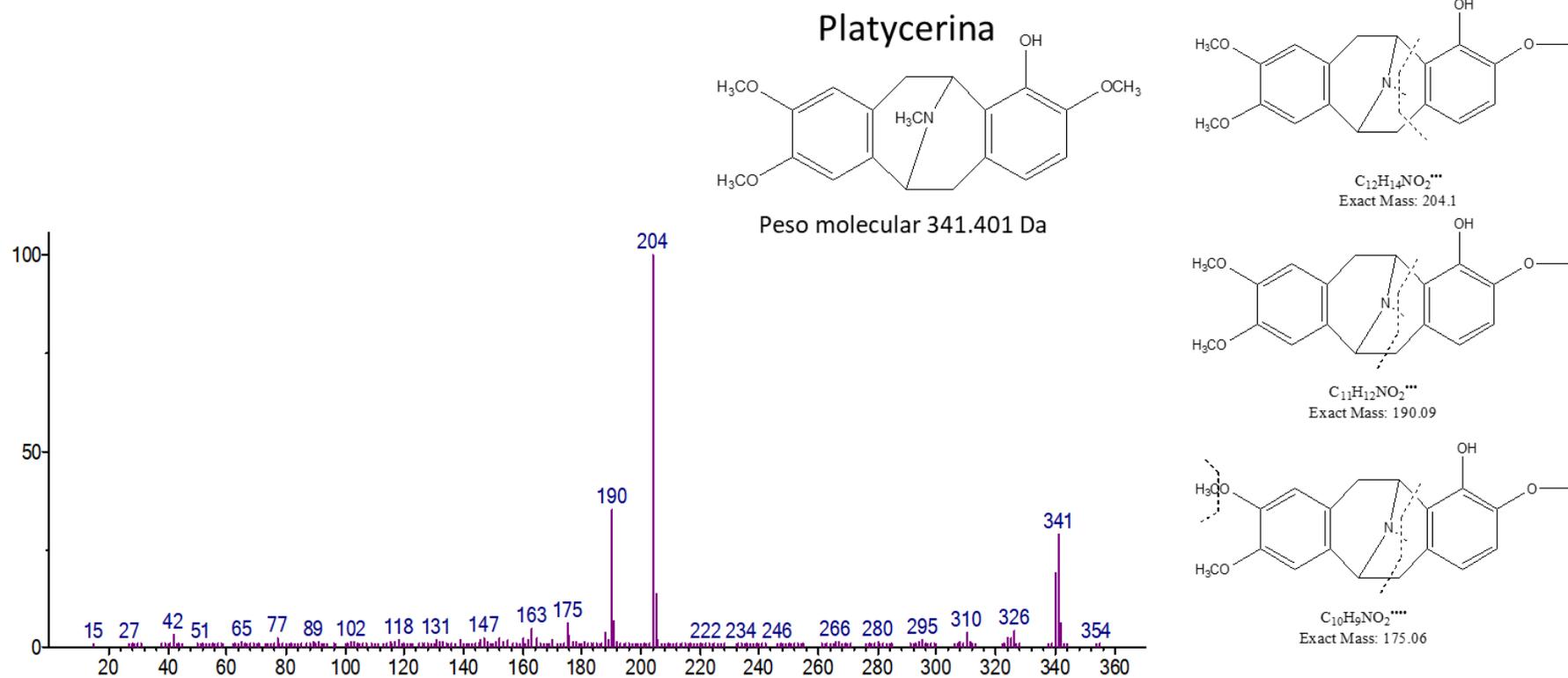


Figura 12. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención de 26.449 min del extracto de tejido de corteza de raíz de *Argemone platyceras*, señalando el posible patrón de fragmentación del alcaloide propuesto.

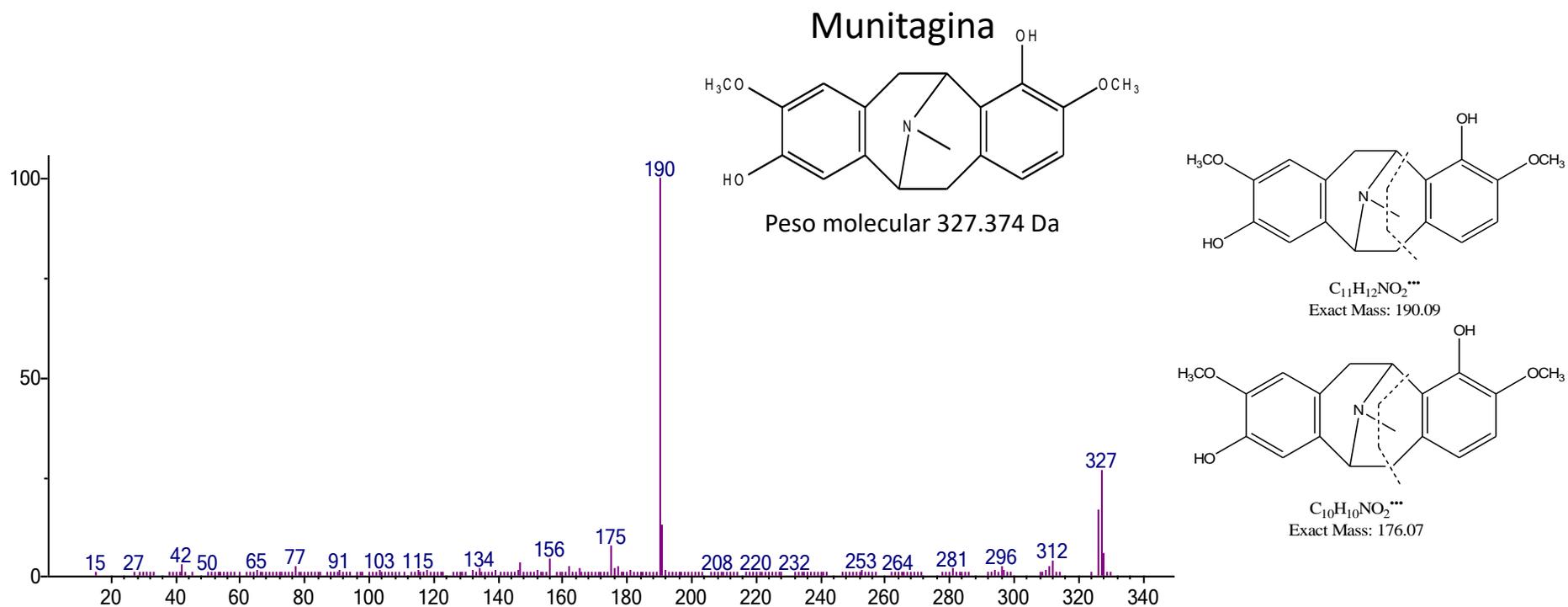


Figura 13. Espectro de masas experimental del pico en el tiempo de retención 26.7003 min del extracto de tejido de corteza de raíz de *Argemone platyceras*, con el patrón de fragmentación del alcaloide propuesto.

## Cuantificación de alcaloides por TLC

Un elemento que también se debe tener en cuenta al momento de analizar la distribución de metabolitos dentro de una planta es la concentración en la que estos se encuentran en las diferentes partes de esta, lo cual nos ayuda al momento de elegir el mejor tejido para obtener ciertos metabolitos.

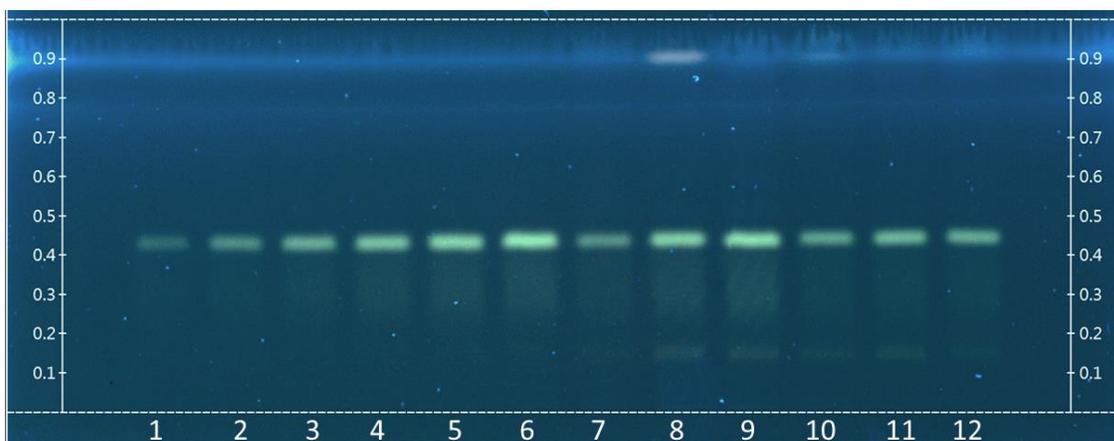
En relación con los alcaloides que estudiamos en este trabajo, podemos observar en las TLC y HPTLC realizadas anteriormente que poseen una banda común, que se relaciona con la banda correspondiente al estándar de berberina que se ha utilizado como comparación. Por lo que, el estándar de berberina pudo ser utilizado para llevar a cabo la cuantificación. Esta se realizó por medio de HPTLC utilizando densitometría, aprovechando la fluorescencia que posee en la berberina al observarse bajo luz UV a 366nm la cual presenta un color verde fácilmente identificable.

Para *A. ochroleuca*, se realizó una curva de calibración con un rango de 0.2 a 1.2 ng de berberina, con una desviación estándar de 3.9471%, con un coeficiente de relación de 0.9984; los extractos se realizaron pesando 144 mg de tejido en todos los casos, aplicando 5µL en la placa de HPTLC excepto para el caso del tejido de corteza de raíz en donde se aplicó 1µL de muestra.

Tabla 6. Cuantificación de berberina en extractos de tejidos de *Argemone ochroleuca*.

Extracto	Concentración de berberina en la muestra (µg)	Cantidad de berberina en el tejido (µg/mg)
<b>Raíz, tejido vascular</b>	1.155	8.082
<b>Raíz, tejido de corteza</b>	11.380	79.804
<b>Cápsula verde</b>	2.531	17.724
<b>Nervadura de hoja</b>	1.465	10.174
<b>Tejido verde de hoja</b>	1.805	12.534
<b>Tallo</b>	1.590	10.671

Podemos observar que el porcentaje de berberina en los extractos de *A. ochroleuca* va de 0.08 a 0.79 %, siendo el extracto de tejido de corteza de raíz el que presenta una mayor concentración de este alcaloide, esto concuerda con lo visto en la placa de HPTLC.



**Figura 14.** Cuantificación de berberina por HPTLC, curva de calibración de berberina en los carriles 1 a 6, extractos de diferentes tejidos de *Argemone ochroleuca* en los carriles 7 a 12 correspondientes a tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, nervadura de hoja, tejido verde hoja y tallo. Sistema de solventes CH<sub>3</sub>Cl:CH<sub>3</sub>OH 80:20

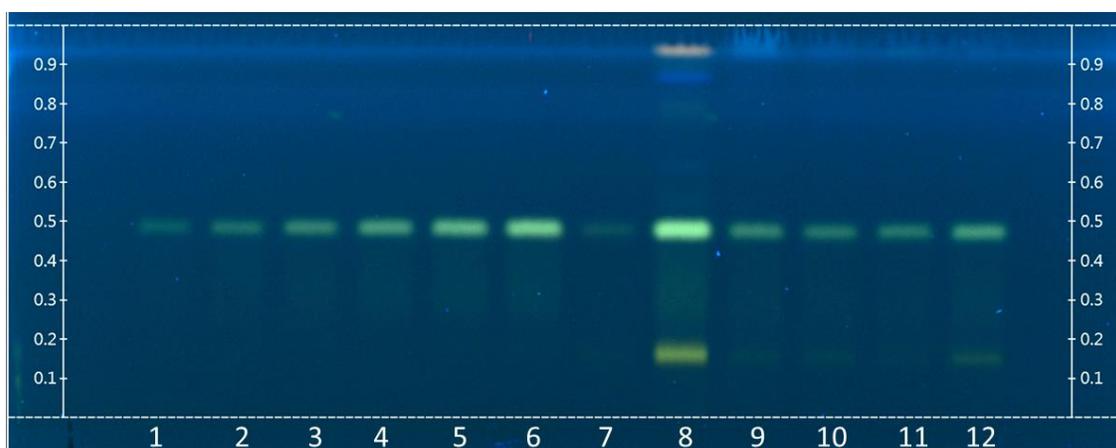
Asimismo, para *A. platyceras* se realizó una curva de calibración de 0.1 a 1.1 ng de berberina, con una desviación estándar de 9.0995%, con coeficiente de correlación 0.9846, los extractos se realizaron con 146 mg de tejido en todos los casos, aplicando 5  $\mu$ L de muestra excepto en los casos del extracto de tejido de corteza de raíz en donde se aplicó 1  $\mu$ L y el extracto de tallo del cual se aplicaron 3  $\mu$ L de muestra, sin embargo, a pesar de haber aplicado una menor cantidad de extracto la muestra de tejido de corteza de raíz no se ajustó a la curva de calibración realizada por lo que se tuvo que realizar una extrapolación para conocer su concentración.

En los extractos de *A. platyceras* el porcentaje de berberina va de 0.05 a 1.72 %, un rango más amplio que en el caso de *A. ochroleuca*; además de que el extracto de tejido de

corteza de raíz es el que posee una mayor cantidad de berberina entre los extractos de ambas especies.

**Tabla 7. Cuantificación de berberina en extractos de diferentes tejidos de *Argemone platyceras*.**

Extracto	Concentración de berberina en la muestra ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad de berberina en el tejido ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
Raíz, tejido vascular	0.782	5.37
Raíz, tejido de corteza	25.853	172.353
Cápsula verde	1.519	10.773
Nervadura de hoja	1.320	9.283
Tejido verde de hoja	1.334	9.124
Tallo	3.171	20.301



**Figura 15. Cuantificación de berberina por HPTLC, curva de calibración de berberina en los carriles 1 a 6, extractos de diferentes tejidos de *Argemone platyceras* en los carriles 7 a 12 correspondientes a tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, nervadura de hoja, tejido verde hoja y tallo.**

## Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

Para el análisis de la inhibición de acetilcolinesterasa se realizó un ensayo de utilizando TLC, en este se utilizan naftilacetato, acetilcolinesterasa y sal Fast Blue B. La acetilcolinesterasa hidroliza el naftilacetato produciendo ácido acético y  $\alpha$ -naftol, este último reacciona con la sal Fast Blue B, teniendo como producto un compuesto azo de color violeta; al existir inhibición de la acetilcolinesterasa, se impediría la reacción de hidrólisis por lo que no se obtendría el color violeta, por lo que se observaron áreas de color blanco a amarillo.

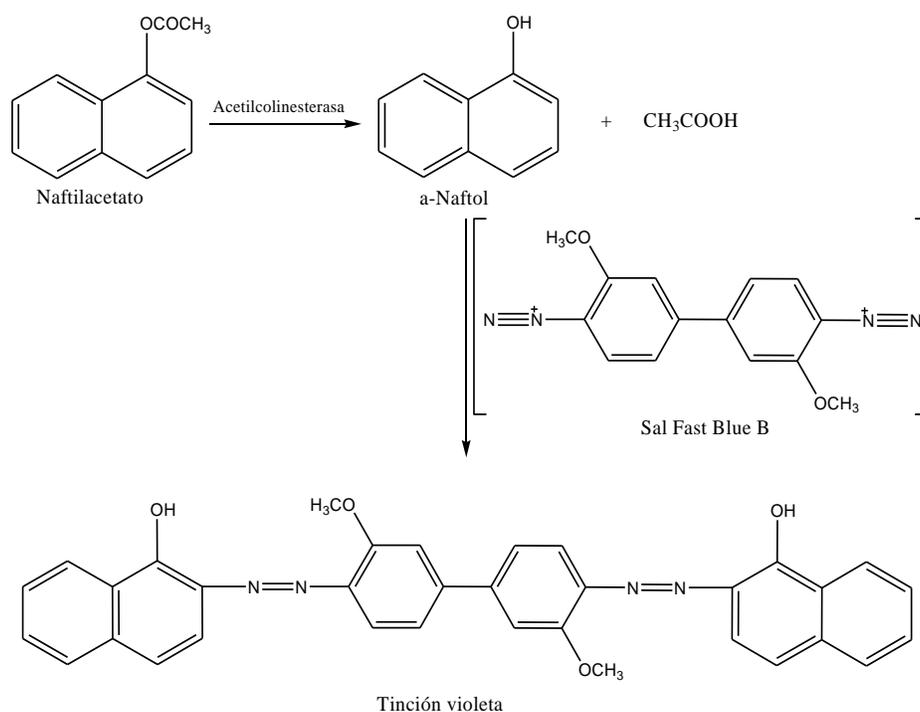


Figura 16. Reacción de la acetilcolinesterasa con naftilacetato.

En esta prueba, se encontraron tres extractos con actividad, los cuales provenían de la especie *A. platyceras*, correspondiendo a tejido vascular de raíz, corteza de raíz y cápsula verde. Las bandas que poseen la actividad se encuentran en el  $R_f$  0.8, sobre la banda de

berberina, la cual podría tratarse de un alcaloide o de algún otro compuesto presente en el extracto.

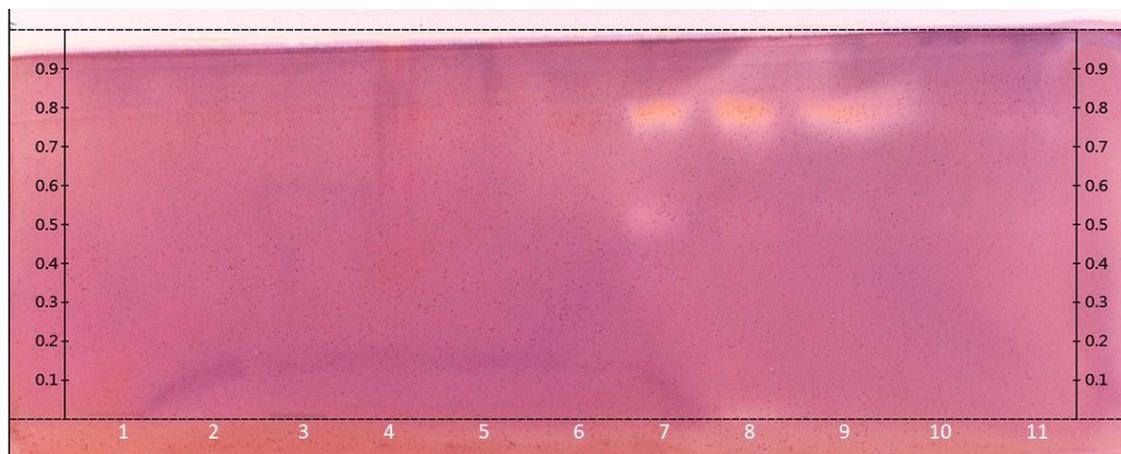


Figura 17. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa sobre TLC. Extractos de *A. ochroleuca* tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hoja (carril 1-6); y extractos de *A. platyceras* tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, tallo y hoja (carril 7-11).

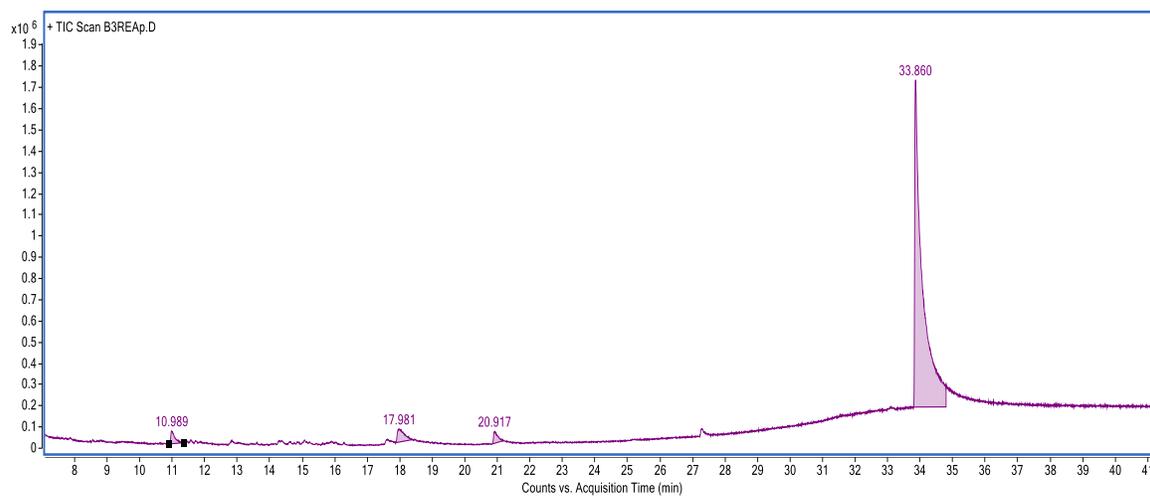
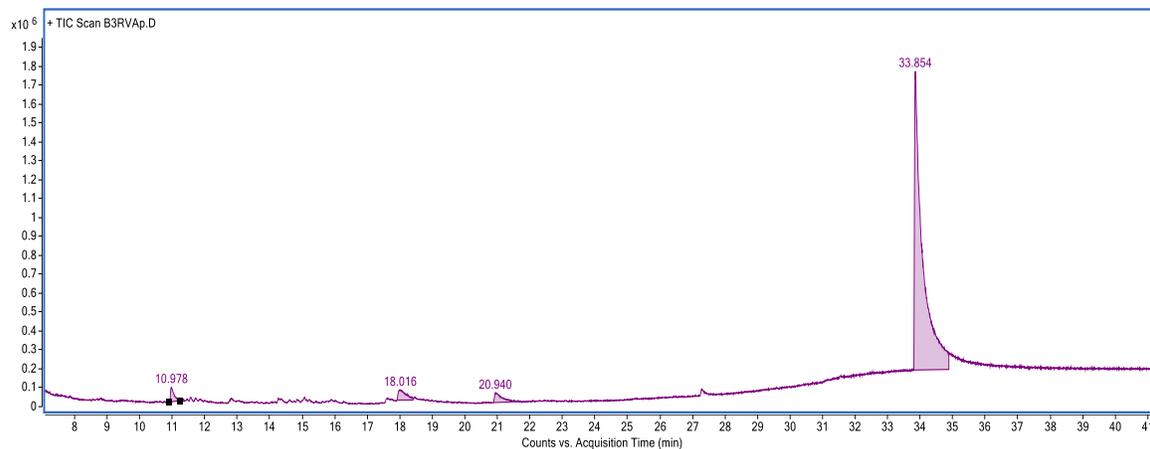
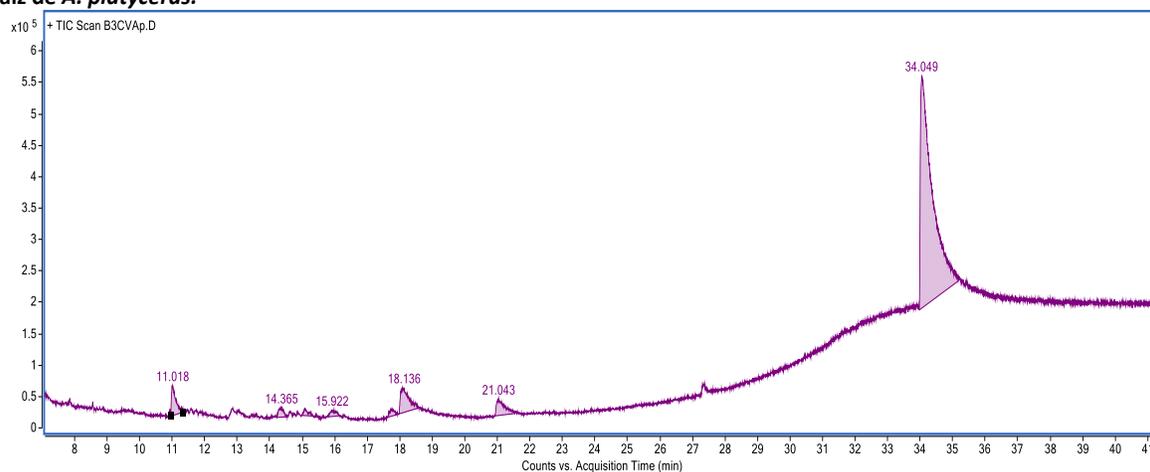


Figura 18. Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa preparativa del extracto de tejido vascular de raíz de *A. platyceras*.



**Figura 19.** Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa preparativa del extracto de tejido de corteza de raíz de *A. platyceras*.



**Figura 20.** Cromatograma de la banda en el Rf 0.8 aislada por placa de preparativa del extracto de cápsula verde de *A. platyceras*.

Para determinar qué tipo de compuestos que mostraron actividad se realizó una placa preparativa y se realizó el aislamiento de la banda previamente identificada, para realizar análisis por GC-EIMS para obtener la identificación de los compuestos presentes. En los tres extractos se observó un solo pico predominante con un tiempo de retención de aproximado de 33.8, para la identificación del compuesto se realizó la comparación del espectro de masas con la base de datos NIST, en los tres casos se trató del mismo compuesto, protopina, el cual tiene una masa molecular promedio de 353.359 Da.



## **Ensayo de inhibición sobre quorum sensing**

Para realizar el análisis de inhibición sobre el quorum sensing, se llevó a cabo la técnica de bioautografía, en la cual se hizo una placa de TLC con 75  $\mu$ L de cada uno de los extractos y se eluyó como previamente ya se ha explicado en este trabajo, y sobre esta se vertió el medio que contenía las bacterias y el autoinductor. La prueba positiva se observó al ver un halo incoloro, o blanco sobre la placa lo que indica que no pudo llevarse a cabo la comunicación entre las bacterias.

Al observar la placa podemos precisar que en el carril del extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca* se encuentra un halo de color blanco de tamaño significativo, indicador de que en ese lugar existe inhibición, además de que en Rf cercanos en otros extractos se ven ligeras líneas de inhibición, aunque no tan significativas como la otra.

Se realizó la comparación con la foto de luz UV 366 nm realizada al terminar la corrida para observar cuál era la banda que poseía actividad, se pudo determinar que era sección sobre la banda de berberina, por lo que se puede deducir que esa banda contiene otros alcaloides o compuestos que pueden derivar en la actividad.

Para determinar qué tipo de alcaloides son los que se encuentran ahí se realizó una placa preparativa y se realizó el aislamiento del área previamente identificada, para realizar análisis por GC-EIMS para obtener la identificación de los compuestos presentes.

En el cromatograma se presenta únicamente un pico predominante con un tiempo de retención de 33.837 min, al obtener el espectro de masas en este tiempo de retención después de analizarlo con el programa de deconvolución AMDIS, y realizando una comparación con el espectro depositado en la biblioteca NIST, se identificó como protopina, el mismo compuesto que mostró actividad en el caso de la inhibición de acetilcolinesterasa, sin embargo, en este caso solo un extracto tuvo actividad por lo que esto se discutirá más adelante.

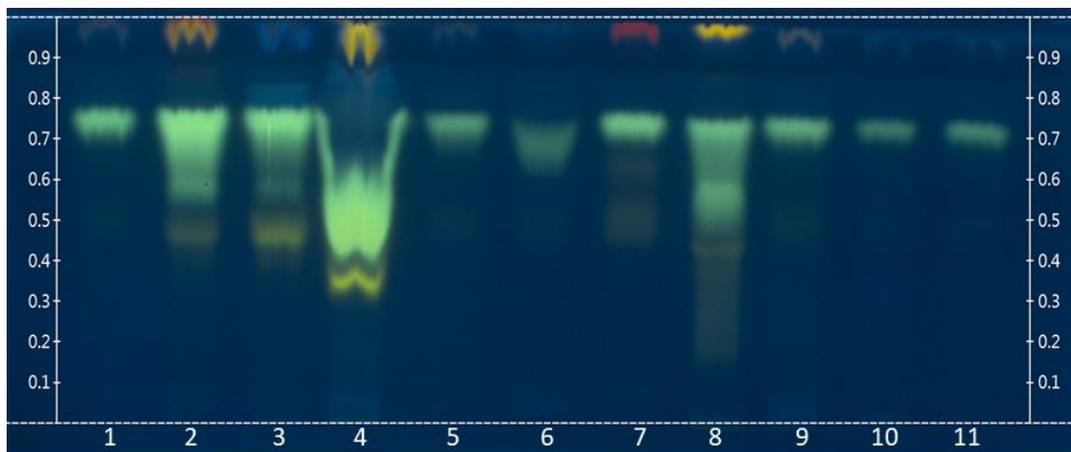


Figura 21. Placa de TLC para el ensayo de bioautografía bajo luz UV 366 nm. Extractos de *A. ochroleuca* de tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hoja (carril 1-6); y extractos de tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, tallo y hoja.

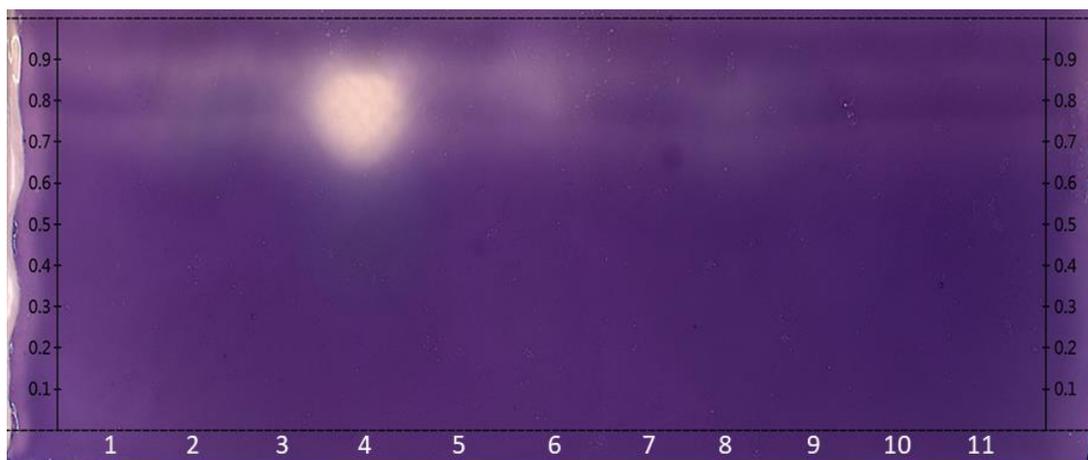


Figura 22. Placa de TLC del ensayo de bioautografía bajo luz visible. Extractos de *A. ochroleuca* de tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, cápsula seca, tallo y hoja (carril 1-6); y extractos de tejido vascular de raíz, tejido de corteza de raíz, cápsula verde, tallo y hoja.

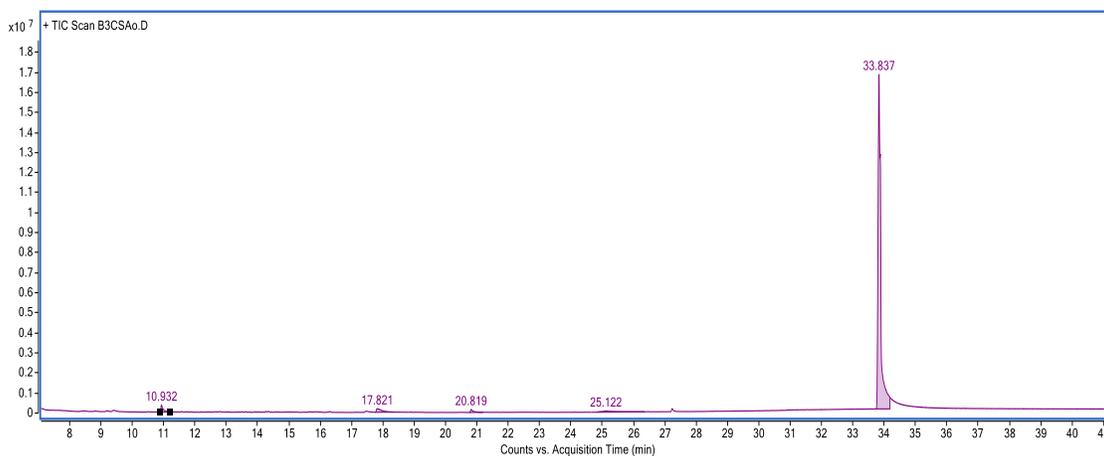
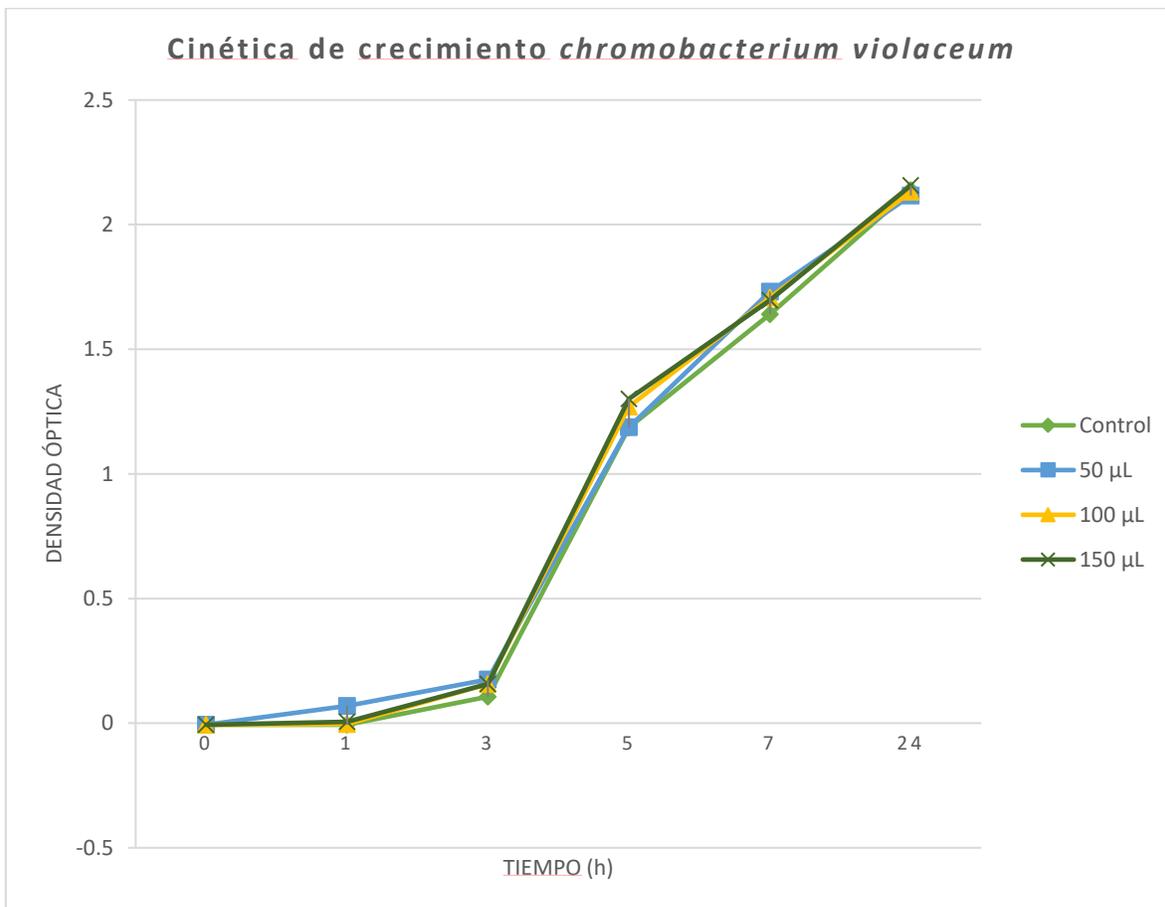


Figura 23. Cromatograma de la zona aislada en el Rf 0.7 del extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca*.

Otro de los aspectos importantes que se deben considerar al realizar las pruebas de inhibición es confirmar que la actividad que estamos observando efectivamente sea inhibición y no un efecto bactericida del extracto sobre la bacteria, ya que como se mencionó antes, el objetivo de esta inhibición es que la bacteria siga viva únicamente evitando la comunicación entre estas para evitar la patogenicidad.

Por lo que para asegurar ese aspecto se llevó a cabo una cinética de crecimiento de la bacteria, agregando volúmenes diferentes del extracto para verificar si el crecimiento de la bacteria se veía afectado. Se midió la densidad óptica para cada una de las muestras, y con estos datos se realizó la gráfica de la cinética.

Al observarla podemos notar que tanto el control como las muestras que contenían extracto presentaron una cinética de crecimiento casi idéntica, sin mencionar que en las mediciones realizadas no existen diferencias significativas entre las muestras con distintos volúmenes de extracto, con lo que podemos asegurar que los extractos no tienen efecto bactericida sobre *Chromobacterium violaceum*.



**Figura 24.** Cinética de crecimiento de *Chromobacterium violaceum* con diferentes cantidades del extracto de cápsula seca de *Argemone ochroleuca*.

## VII. DISCUSIÓN

Hay una gran variedad de plantas en la herbolaria mexicana existen entre tres mil y cinco mil especies dentro de la flora medicinal mexicana que poseen algún potencial terapéutico. En un atlas realizado por diversos grupos étnicos fueron compiladas alrededor de tres mil especies. Aunque solamente el 1% de plantas medicinales han sido estudiadas profundamente para conocer sus propiedades y la composición química de estas (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012). A pesar de esto no hay un documento que integre y aumente la información que se tiene.

Sin embargo, hay ejemplos como la Farmacopea China, en donde se recopilan las plantas utilizadas en la medicina tradicional de este país, sus usos y los principios activos de éstas. Un instrumento de este tipo sería de suma utilidad para recopilar la información sobre las plantas mexicanas y así ampliar el conocimiento sobre éstas, sus usos y los compuestos que los integran. Para lograr esto, es necesario conjuntar los datos necesarios sobre estas plantas, desde su localización y usos medicinales tradicionales, hasta su perfil fitoquímico.

Una herramienta sumamente útil para el análisis del perfil fitoquímico de una planta es el análisis por HPTLC, ya que es una manera sencilla y efectiva de realizar análisis cualitativos y cuantitativos, relativamente sencilla y de bajo costo que permite el estudio de diversas muestras simultáneamente, facilitando la comparación entre estas. Además, con la ayuda de diferentes métodos de derivatización es posible realizar la identificación de grupos funcionales o diversos tipos de compuestos como metabolitos secundarios.

El primer paso para llevar a cabo el análisis por HPTLC fue obtener los extractos de las especies a trabajar, *Argemone ochroleuca* y *Argemone platyceras*; debido a que se sabe que los principales metabolitos secundarios presentes en estas plantas son alcaloides, se decidió realizar una extracción dirigida a la obtención de estos compuestos, para lo cual se probaron tres métodos diferentes. Después de llevarlos a cabo se realizó una placa de TLC, con esto se hizo la selección del método más apropiado según el bandeo observado.

El método seleccionado fue el A, en donde se realizó como primer paso la maceración en una solución ácida. Esto permitió que los alcaloides encontrados en la muestra formaran sales miscibles en el medio acuoso, permitiendo la liberación de éstos en el medio. Esta se realizó por un tiempo prolongado para asegurar su óptima obtención. Posteriormente se llevó a cabo la alcalinización de la solución con el objetivo de devolver los alcaloides a su forma básica, de esta manera, los alcaloides son más afines a solventes inmiscibles con el agua como lo es el cloroformo, por lo que se procedió a hacer una extracción líquido-líquido. Por lo que, al final, únicamente se realizó la concentración de este extracto para poder trabajar.

Si bien, es común que estas extracciones se realicen solo con solventes como metanol, etanol, etc., un proceso dirigido a la extracción de metabolitos específicos a veces es necesaria para tener más control sobre el análisis que se desea hacer, en este estudio, los alcaloides son la base para el perfil fitoquímico que se hará de estas especies, debido a que son los metabolitos representativos de este género.

Al haber seleccionado el método de extracción que mejor se adaptó a las necesidades de este estudio se procedió a obtener los extractos de los tejidos de ambas especies para poder comenzar con el análisis de HPTLC. Para esto, se pesaron cantidades iguales de los tejidos, a manera de tener una comparación visual de la cantidad y concentración de los compuestos presentes en estos; así, a pesar de ser un análisis simple, nos da las bases para conocer su distribución en la planta además de observar cambios entre éstas.

Asimismo, en el laboratorio se cuenta con el estándar de berberina, alcaloide ampliamente reportado como presente en estas especies. Con éste fue posible hacer una comparación con los compuestos encontrados en los extractos. Al realizar la placa de HPTLC, Figura 9, observamos que en el Rf 0.5 se encuentra la banda de berberina, la cual emite fluorescencia al ser vista bajo luz UV 366 nm, esta banda de color verde fue observada en todos los extractos, sin embargo, la concentración tiene una amplia variación entre tejidos, aunque no tanto entre especies, siendo el extracto de tejido de

corteza de raíz de *A. platyceras* el que muestra una mayor concentración de berberina, esto basándonos únicamente en la fuerte fluorescencia que se observa en comparación a las bandas en el mismo Rf de otros extractos.

Otra banda que es fácilmente visible es la presente en los extractos de tejido de corteza de raíz de ambas especies, que se encuentra sobre el frente del solvente y es de color anaranjado. Según algunos reportes (Monforte-González *et al.*, 2012; Xool-Tamayo *et al.*, 2017), la sanguinarina se observa como una banda anaranjada bajo la luz UV 366 nm, además de que aparece en un Rf más alto que el de la berberina, sin embargo, no es posible realizar una comparación entre los Rf ya que no se utilizó el mismo sistema de solventes.

Con el análisis por GC-EIMS pudimos corroborar la presencia de los alcaloides en los extractos, además de definir su identidad, encontrando que para la especie *A. ochroleuca* los alcaloides presentes son del tipo protoberberina y protopina (Tabla 3), siendo estos compuestos polares con presencia de aminas terciarias, además de poseer estructuras muy similares. Estas características concuerdan con lo visto en los cromatogramas, en donde los picos obtenidos se encuentran muy cercanos o en algunos casos, no se encuentran bien resueltos; razón por la que se usó el programa AMDIS para su correcto análisis. De igual forma estas características pueden ser la causa de que algunos compuestos como la berberina no se hayan podido identificar. Cabe mencionar que existen estrategias para cambiar la polaridad de los compuestos o hacerlos más volátiles, dentro de estas se encuentra la derivatización, método que se ha utilizado previamente en el laboratorio al intercambiar un hidrógeno disponible por un grupo trimetilsilano, sin embargo, estas moléculas no tienen en su estructura ningún hidrógeno que pueda ser derivatizado; por lo que no se pudo ocupar esta técnica.

Como se mencionó anteriormente, en los extractos de *A. ochroleuca* se observaron cuatro compuestos, protopina,  $\alpha$ -alocriptopina, canadina y muramina, los dos primeros compuestos se encontraron en todos los extractos. Asimismo, en esta especie no había

sido reportada la presencia del alcaloide muramina; éste es un alcaloide tipo protopina el cual tiene como característica la presencia de cuatro sustituyentes metoxilo dentro de su estructura. La muramina ha sido poco estudiada, aunque este año se publicó un artículo en donde se muestra que este alcaloide posee actividad inhibitoria de la excitabilidad de neuronas (Huang *et al.*, 2018).

Al observar los extractos de *A. platyceras* también podemos ver la presencia de berberina (Rf 0.5) en todos los extractos, para el extracto de tejido de corteza de raíz de *A. platyceras* la concentración de berberina, basándonos en la fluorescencia, es mucho más elevada que para los demás extractos incluidos los de *A. ochroleuca*.

Además, este extracto muestra una mayor cantidad de bandas visibles bajo luz UV 366 nm. Esta característica se atribuye a que es probable que las estructuras de los compuestos observados posean varios anillos aromáticos, aunque estos compuestos pueden ser o no alcaloides. También, la banda observada en el Rf 0.3 muestra una concentración mayor. Podemos observar que la banda por encima del Rf 0.3 no es visible en otros extractos, así como las bandas cerca del Rf 0.6.

Igualmente, los extractos de *A. platyceras* fueron analizados por GC-EIMS para identificar los compuestos presentes. De manera similar a lo ya visto en la placa de HPTLC, estos extractos tuvieron una mayor diversidad de compuestos. En cuatro de los extractos se tuvo la presencia del alcaloide platycerina, llamado así en referencia a esta especie. Este alcaloide no fue identificado por la biblioteca NIST, sino a través de su patrón de fragmentación. La platycerina es un alcaloide tipo pavina que posee una amina terciaria, tres grupos metoxilo y un hidroxilo.

Asimismo, se encontraron otros alcaloides del mismo tipo como la munitagina en el tejido de corteza de raíz y cápsula verde. Este alcaloide solo se diferencia de la platycerina en un grupo metoxilo que es cambiado por un hidroxilo. En el extracto de cápsula verde también se encontró la norargemonina, un isómero de la platycerina. Además de los alcaloides que

$\alpha$ -alocriptopina y protopina que también fueron encontrados en los extractos de *A. ochroleuca*.

No es posible descartar la presencia de algún otro alcaloide, ya que nuevamente no observamos la berberina que sabemos que está presente por HPTLC. Por lo que no podemos tener la certidumbre de que los compuestos identificados sean los únicos presentes en el extracto.

Es posible que el estudio por inyección directa mediante alguna otra técnica de espectrometría de masas sea posible la identificación de los compuestos no volátiles y altamente polares que estén presentes en los extractos y que no pudieron observarse mediante el método que se utilizó para este estudio.

Como se mencionó en los resultados, se encontró un compuesto con peso molecular de 399  $m/z$  que posee algunos de los fragmentos característicos que tienen los alcaloides que hemos visto hasta ahora. Pero, no fue posible su identificación. Con base en los fragmentos observados podríamos decir que este compuesto tiene una estructura tipo pavina, sin embargo, no podemos confirmar con seguridad su estructura. Además de que no hay reportes de este tipo de alcaloides con ese peso molecular.

Otro análisis que se realizó utilizando HPTLC fue la cuantificación de berberina mediante densitometría, en donde se corroboró lo observado anteriormente, que los extractos de los tejidos de corteza de raíz de ambas especies son los que tienen un mayor contenido de berberina; sin embargo, el de *A. platyceras* es el que supera en concentración a los demás extractos. En contraste, los extractos de tejido vascular de ambas especies también son los que contienen la menor cantidad de este alcaloide, mientras que para los demás tejidos la concentración no sufre variaciones significativas.

Uno de los aspectos importantes de los resultados de los análisis por HPTLC, GC-EIMS y la cuantificación de berberina, es la concentración y variedad de compuestos en los extractos de tejidos como la corteza de raíz y la cápsula seca. Es sabido que algunos

alcaloides son producidos en la raíz de las plantas que los contienen, por lo que esto concordaría con lo que hemos observado. Sin embargo, el transporte de dichos alcaloides a otros tejidos de la planta debería de ser a través del tejido vascular (xilema o conductos laticíferos), lo que no corresponde a lo que observamos pues dicho extracto posee una concentración baja de berberina. Una de las causas de la presencia de alcaloides en la corteza de raíz, es que probablemente la planta use éstos como defensa de organismos que se encuentren en el suelo, debido a esto los alcaloides pueden acumularse en la corteza de la raíz.

Para los extractos de cápsula seca la situación es diferente, si bien, la cápsula tiene alcaloides desde que es verde y cuando las semillas están en desarrollo, el hecho de que la variedad de alcaloides aumente cuando esta se seca una vez que expulsó las semillas es interesante. Este hecho marca el inicio de la senescencia de las plantas de *Argemone*, ya que éstas en general son plantas anuales. Por lo que la presencia de alcaloides en este tejido es más difícil de explicar que en el caso de los alcaloides de la raíz. Sin embargo, en los últimos años se ha planteado la teoría de que los alcaloides están involucrados algunos procesos biológicos como la activación o represión de genes. Esta teoría podría ser la que explique la variación de alcaloides entre la cápsula verde y la cápsula seca, teniendo éstos algún papel en la desecación de la cápsula o en la liberación de las semillas. Si bien, no podemos hacer afirmaciones sobre este hecho, es probable que realizando análisis de biología molecular sobre las cápsulas y los cambios que sufren podríamos estar más cerca de conocer que ocurre con los alcaloides en este tejido.

Ya que conocemos cuales son los alcaloides que se encuentran en los extractos de los diferentes tejidos de *A. ochroleuca* y *A. platyceras*, se decidió llevar a cabo algunas pruebas biológicas con ayuda de técnicas realizadas en TLC, como lo son ensayos de inhibición. En este caso debido a los antecedentes de *A. platyceras*, se hicieron ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa. Además, debido al auge en el interés de nuevas formas de atacar infecciones bacterianas, se incluyó el análisis de inhibición sobre *quorum sensing*.

En los últimos años el despunte en investigación sobre drogas que traten los síntomas del Alzheimer ha abierto la posibilidad de estudiar diversas plantas consideradas como medicinales u otras que se ha encontrado que contienen una variedad de compuestos interesantes.

En el 2017, el grupo de Siatka, llevó a cabo un estudio respecto a los alcaloides contenidos en extractos de *A. platyceras*, encontrando que la munitagina es un potencial inhibidor de acetilcolinesterasa, con este antecedente, se decidió realizar un estudio de inhibición de acetilcolinesterasa con los extractos de las dos especies con las que se trabajó.

Los alcaloides son fuertes candidatos como inhibidores de acetilcolinesterasa, pues se sabe que tienen actividades biológicas muy variadas y estas están ampliamente comprobadas. Un ejemplo de esto es la Galantamina, un alcaloide que inhibe a la acetilcolinesterasa proveniente de la especie *Galanthus nivalis* L., el cual se usa en el tratamiento del Alzheimer y que ha sido aprobado por la FDA.

Previo al uso de la galantamina y otros actuales medicamentos, existían algunos otros utilizados para este padecimiento, sin embargo, algunos de estos fueron retirados debido a los efectos secundarios que presentaban, como la tacrina, que afectaba al sistema gastrointestinal y que también presentaba efectos de hepatotoxicidad (Colovic *et al.*, 2013), lo que hace que cada día se busquen nuevas alternativas, ya sea en nuevos compuestos o en la modificación de los existentes, para mejorar su acción sobre la enzima de interés y disminuir los daños colaterales que afecten otros órganos.

Como ya se mencionó en el apartado de resultados, únicamente los extractos de tejido de corteza de raíz, tejido vascular y raíz y cápsula verde de *Argemone platyceras* mostraron actividad como posibles inhibidores de acetilcolinesterasa; por lo que además se realizó un análisis de GC-EIMS de las bandas que mostraron actividad para así identificar el compuesto que poseía la actividad, en donde se encontró que era la protopina, sin embargo, como se vio anteriormente este alcaloide está presente en todos los extractos de ambas especies, por lo que, teóricamente todos los extractos deberían poseer esta

actividad, sin embargo, no es así. Una de las formas de explicar esto es que el compuesto que la causa (alcaloide o no) no se haya detectado GC-EIMS por diversas razones como las que ya se explicaron en el caso de la berberina.

La forma en que los alcaloides inhiben a la enzima acetilcolinesterasa es relativamente sencilla. La acetilcolinesterasa tiene una tríada catalítica en la cual está presente el sitio de unión del grupo amonio de la acetilcolina, en este el residuo Trp841 es clave para la interacción entre la enzima y la molécula de interés, por lo que es posible que sea en este sitio en donde se une el alcaloide a la enzima produciendo la inhibición.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay otros sitios en donde se puede llevar a cabo la unión de los inhibidores. Se ha observado, por ejemplo, en el caso de inhibidores de acetilcolinesterasa tales como agentes nerviosos, estos inhibidores permanentes de acetilcolinesterasa se unen al sitio esteárico dentro de la tríada catalítica. Otro ejemplo puede ser la tacrina, un inhibidor que se retiró del mercado por sus efectos secundarios, este se une al residuo Ser200 en el locus aniónico. Además, algunos otros no se limitan a la interacción con la tríada si no que se unen a secciones del sitio aniónico periferal.

Otro de los temas de mayor interés en este momento es la problemática que se tiene con las bacterias que han adquirido resistencia a una gran variedad de antibióticos, por lo que cada vez se desarrollan más mutantes a estos, conocidas como súper bacterias.

Esta circunstancia ha hecho que la comunidad científica dirija sus investigaciones a encontrar una nueva manera de atacar las patologías bacterianas evitando el desarrollo de resistencia, uno de estos enfoques es realizando la inhibición del desarrollo de los agentes patógenos, dentro de este enfoque encontramos la inhibición de quorum sensing.

El quorum sensing es un sistema de comunicación bacteriana a través de autoinductores que deriva en la activación de diferentes genes enfocados ya sea a formación de biopelículas, antibióticos, etc. Este sistema es de gran interés ya que, al no afectar la

supervivencia de la bacteria, esta no se ve en la necesidad de desarrollar algún tipo de mutación que desencadene resistencia a las sustancias utilizadas.

Como es sabido, los alcaloides son moléculas capaces de modificar su estructura cuando se encuentran en diferentes condiciones ambientales dentro y fuera de la célula, siendo moléculas que pueden atravesar de manera sencilla la membrana celular, por lo que, es probable que al igual que los autoinductores, estos puedan transportarse de manera simple desde el medio hacia dentro de la célula.

Asimismo, se sabe que el mecanismo de comunicación de las bacterias gram negativas involucra dos o más proteínas encargadas tanto de la síntesis de los autoinductores como del reconocimiento y unión a estos, además de la interacción con el ADN, función que permitirá la activación de los genes necesarios para la respuesta a dicha comunicación.

Se sabe que en *Chromobacterium violaceum*, las proteínas involucradas en este proceso son LuxI y LuxR, en donde LuxI es la encargada de la síntesis del autoinductor *N*-hexanoilhomoserina lactona, molécula identificada como la señal de este sistema de comunicación en esta bacteria. Mientras que LuxR es un factor de transcripción que se une al ADN para la activación de genes específicos.

El sistema que permite que LuxR se una al ADN es un cambio en la conformación de esta proteína, alterándose su plegamiento, al unirse con la homoserina lactona. Cuando no se encuentra en asociación con el inductor, los sitios de unión a ADN del homodímero se encuentran separados a una distancia aproximada de 60 Å, al unirse con la señal esta conformación cambia y los sitios quedan juntos a 30 Å permitiendo la correcta unión al ADN.

La bacteria utilizada para realizar el ensayo de bioautografía, *C. violaceum* cepa CV026, no tiene la capacidad de producir la señal *N*-acilhomoserina lactona, por lo que no es posible que la inhibición se haya dado a través de la interacción con la enzima LuxI, sino con LuxR.

La hipótesis más probable de lo que ocurre al interaccionar los alcaloides con la enzima LuxR es que ocupan el lugar de la homoserina lactona, uniéndose por medio del fragmento acilo, al no ocupar el espacio correcto, la proteína es incapaz de cambiar de configuración evitando la transcripción de genes para la producción de violaceína.

Por medio de una placa preparativa, se aisló la zona en donde se observó la actividad y posteriormente se llevó a cabo el análisis por GC-EIMS, para determinar la identidad del compuesto que presentó la actividad inhibitoria. Como en el caso del ensayo de acetilcolinesterasa, el compuesto identificado fue la protopina.

Sin embargo, como ya se explicó antes, es probable que este no sea el compuesto responsable de dicha actividad, ya que este alcaloide se presenta casi en todos los extractos y no en todos se tuvo actividad inhibitoria. Puede ser probable que el compuesto que posee la actividad no se observe por GC-EIMS, o que la presencia de algún otro compuesto en la banda y sus interacciones sean lo que causa la inhibición que se observa en el ensayo de bioautografía.

Asimismo, se realizó un análisis sobre el crecimiento bacteriano de *C. violaceum*, debido a que se espera que los extractos y sus componentes no afecten la supervivencia de la bacteria, sino que únicamente inhiba la comunicación por *quorum sensing*. Vimos que, efectivamente, a pesar de la presencia de los extractos en el medio, las bacterias crecieron a un ritmo normal. Esto es un buen indicador, ya que como se ha mencionado, el interés en encontrar inhibidores de *quorum sensing* radica en que este elimine o disminuya la resistencia bacteriana.

En resumen, podemos decir que se obtuvo un perfil de alcaloides por HPTLC y por GC-EIMS de las especies estudiadas, *Argemone ochroleuca* y *Argemone platyceras*. Sin embargo, no podemos asegurar que todos los alcaloides se presenten siempre en la misma forma en diferentes muestras ya que hay diversos factores que afectan su variedad y concentración dentro de la planta. No obstante, podemos distinguir que, según la

especie, los tipos de alcaloides que encontramos van cambiando, lo cual permite que exista diversidad respecto a la actividad biológica que estos poseen.

## VIII. CONCLUSIONES

- El perfil de alcaloides por HPTLC muestra diferencias entre los extractos de los tejidos de *Argemone ochroleuca* y *Argemone platyceras*.
- Los extractos de ambas especies contienen alcaloides tipo protopina (alocriptopina y protopina), mientras que en extractos *A. ochroleuca* se observan alcaloides de tipo protoberberinas y en *A. platyceras* se encuentran en mayor proporción alcaloides tipo pavininas.
- El alcaloide muramina presente en el extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca* no había sido reportado antes dentro de los alcaloides de esta especie.
- Un compuesto con peso molecular de 399 Da fue observado en los extractos de *A. platyceras*, sin que haya podido ser identificado, puesto que no hay reportes de algún alcaloide de tipo pavina con ese peso molecular.
- El extracto de tejido de corteza de raíz de *A. platyceras* es el que posee mayor concentración de berberina en relación con los otros extractos de ambas especies, además de que tiene una mayor diversidad de alcaloides.
- Los extractos de tejido vascular y corteza de raíz, y cápsula verde de *A. platyceras* poseen actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa.
- La protopina fue identificada como el compuesto responsable de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.
- El extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca* tiene actividad inhibitoria sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum* CV026.
- La protopina presente en el extracto de cápsula seca de *A. ochroleuca* posee la actividad de inhibir el *quorum sensing*.



## X. REFERENCIAS

Al-Hayyan, A. M. (2006) 'Study of the Alkaloids of Argemone ochroleuca Growing in Saudi Arabia', pp. 3–78. Available at:

<http://repository.ksu.edu.sa/jspui/handle/123456789/8844>.

Aniszewski, T. (2015) *Definition, typology, and occurrence of alkaloids*. 2nd edn, *Alkaloids*. 2nd edn. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-59433-4.00001-8.

Carvajal, P. S. (2007) 'Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes', *Flora del bajío y de regiones adyacentes*, 3(94), pp. 66–93.

Churchill, M. E. A. and Chen, L. (2011) 'Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling', *Chemical Reviews*, 111(1), pp. 68–85. doi: 10.1021/cr1000817.

Colovic, M. B. *et al.* (2013) 'Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology', *Current Neuropharmacology*, 11(3), pp. 315–335. doi: 10.2174/1570159X11311030006.

Cooper, R. and Nicola, G. (2015) *Natural products chemistry*, CRC Press. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88992-X.

Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. (2000) 'Secondary Metabolites', *Biochemistry Molecular Biology of Plants*, 7(7), pp. 1250–1318. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.10.011.

Esquivel-Gutiérrez, E. R. *et al.* (2012) 'Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas', *Biológicas*, 14(1), pp. 45–52.

Evans, W. C. (2009) 'Part 5: Pharmacopeial and related drugs of biological origin, Ch. 26: Alkaloids', in *Pharmacognosy*. 16th edn. Saunders Ltd., pp. 353–415.

Galloway, W. R. J. D. *et al.* (2011) 'Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways', *Chemical Reviews*, 111(1), pp. 28–67. doi: 10.1021/cr100109t.

- Grandclément, C. *et al.* (2015) 'Quorum quenching: Role in nature and applied developments', *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), pp. 86–116. doi: 10.1093/femsre/fuv038.
- Hakim, S. A. E. (1954) 'Distribution of Certain Poppy-Fumaria Alkaloids and a Possible Link with the Incidence of Glaucoma', *Epidemiology*, pp. 193–216.
- Huang, Q. *et al.* (2018) 'Alkaloids from *Corydalis decumbens* suppress neuronal excitability in primary cultures of mouse neocortical neurons', *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 150, pp. 85–92. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.03.006.
- Israílov, I. A., Chelombit'ko, V. A. and Nazaroza, L. E. (1987) 'Argemone Alkaloids', (6), pp. 798–799.
- Kabera, J. N. *et al.* (2014) 'Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, pp. 377–392. doi: 10.1016/0300-9084(96)82199-7.
- Kalia, V. C. and Purohit, H. J. (2011) 'Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets', *Critical Reviews in Microbiology*, 37(2), pp. 121–140. doi: 10.3109/1040841X.2010.532479.
- Koch, B. *et al.* (2005) 'The LuxR receptor: The sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors', *Microbiology*, 151(11), pp. 3589–3602. doi: 10.1099/mic.0.27954-0.
- Konrath, E. L. *et al.* (2013) 'Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12), pp. 1701–1725. doi: 10.1111/jphp.12090.
- Kukula-Koch, W. A. and Widelski, J. (2016) *Alkaloids, Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3.
- Kweon, J. H. yan. (2014) 'Quorum quenching mediated approaches for control of

membrane biofouling', *International journal of biological sciences*, 10(5), pp. 550–565. doi: 10.7150/ijbs.9028.

LaSarre, B. and Federle, M. J. (2013) 'Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), pp. 73–111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12.

Martínez, J. L. and Castillo, G. (2008) 'Flora de Veracruz', *Resedaceae*, 48, pp. 2–8. doi: ISSN 0187-425X.

Monforte-González, M. *et al.* (2012) 'Berberine and Sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) tissues by TLC- *in situ* fluorography', *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 25(4), pp. 358–360. doi: 10.1556/JPC.25.2012.4.14.

Papenfort, K. and Bassler, B. L. (2016) 'Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 14(9), pp. 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.

Rutherford, S. T. and Bassler, B. L. (2012) 'Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), pp. 1–26. doi: 10.1101/cshperspect.a012427.

S. Agostini-Costa, T. da *et al.* (2012) 'Secondary Metabolites', *Chromatography and Its Applications*, (March). doi: 10.5772/35705.

Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C. and Navarrete, A. (2008) 'Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(2), pp. 229–236. doi: 10.1211/jpp.60.2.0012.

Siatka, T. *et al.* (2017) 'Cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibitory activities of alkaloids from argemone platyceras (Papaveraceae)', *Molecules*, 22(7), pp. 1–14. doi:

10.3390/molecules22071181.

Silman, I. and Sussman, J. L. (2008) 'Acetylcholinesterase: How is structure related to function?', *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), pp. 3–10. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.035.

Takken, G., Fletcher, M. T. and Blaney, B. J. (1993) 'Isoquinoline Alkaloids and Keto-Fatty Acids of *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* ( Mexican Poppy ) Seed . II \* . Concentrations Tolerated by Pigs'.

*The Plant List* (2010) *Papaveraceae*. Available at:

<http://www.theplantlist.org/browse/A/Papaveraceae/> (Accessed: 10 June 2018).

Verpoorte, R. *et al.* (1983) 'SCREENING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME PLANTS BELONGING TO THE APOCYNACEAE AND LOGANIACEAE Summary A review is given of the literature on the antimicrobial activity of various indole alkaloids . The data are briefly discussed . A screening was performed', 8, pp. 287–302.

Wansi, J. D. *et al.* (2013) *Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa, Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-405927-6.00014-X.

Xool-Tamayo, J. *et al.* (2017) 'Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy', *Biotechnology Letters*, 39(2), pp. 323–330. doi: 10.1007/s10529-016-2250-9.

## APÉNDICE I

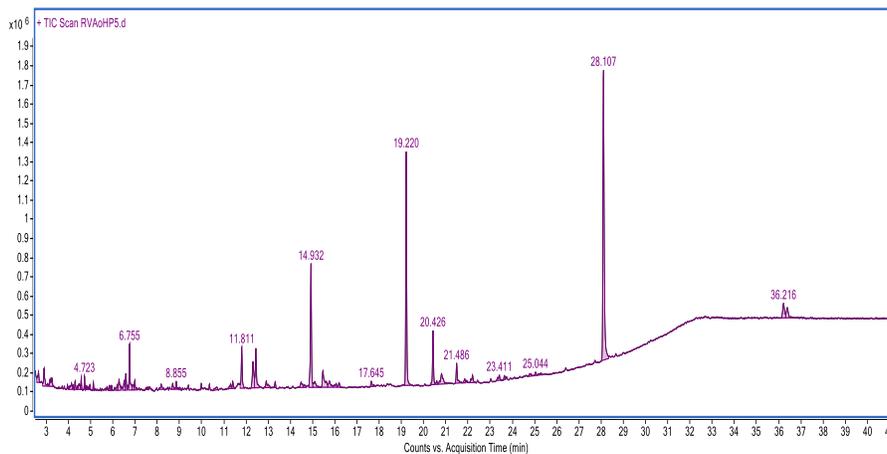


Figura 25. Cromatograma de gases del extracto de tejido vascular de raíz de *Argemone ochroleuca*.

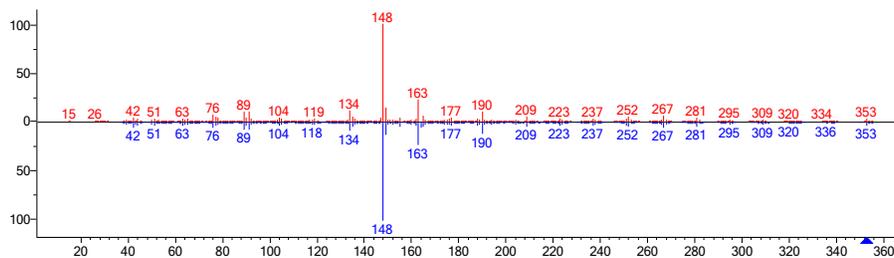


Figura 26. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.097 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la protopina en azul.

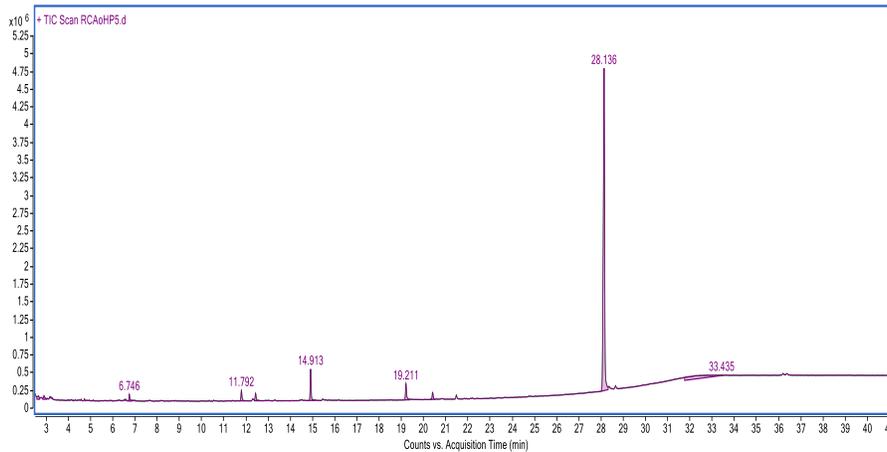


Figura 27. Cromatograma del extracto de tejido de corteza de raíz de *Argemone ochroleuca*.

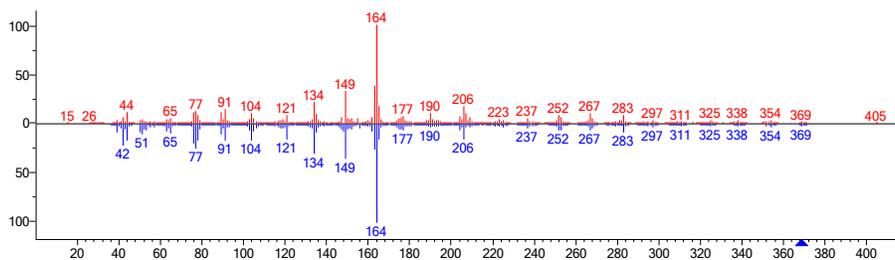


Figura 28 Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.097 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul.

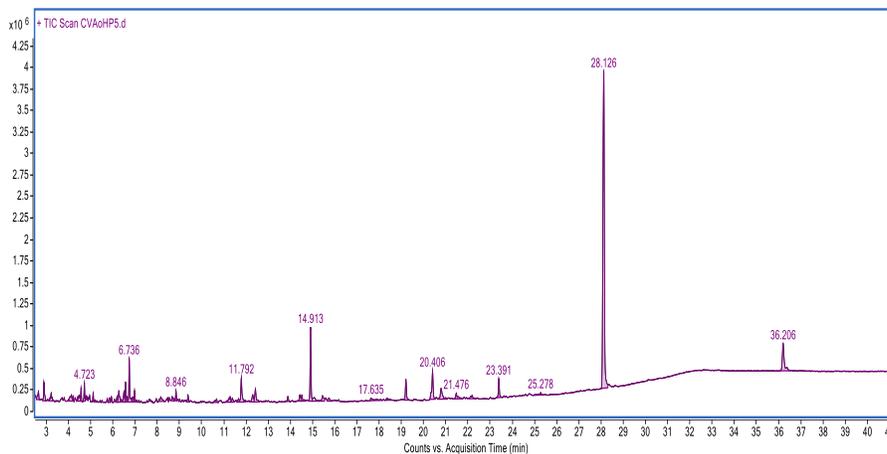


Figura 29. Cromatograma de gases del extracto de cápsula verde de raíz de *Argemone ochroleuca*.

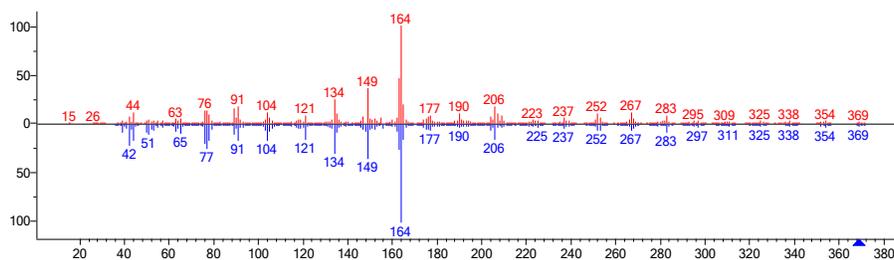


Figura 30. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul.

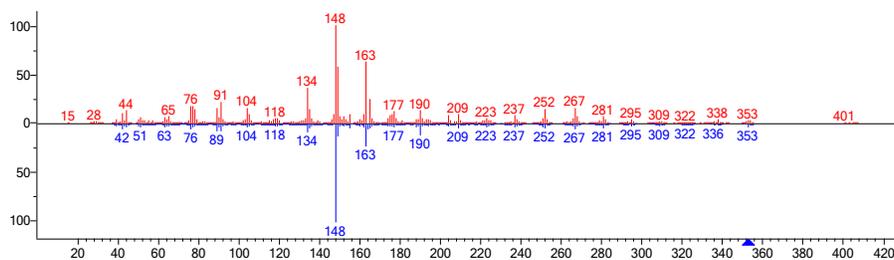


Figura 31. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.126 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la protopina en azul.

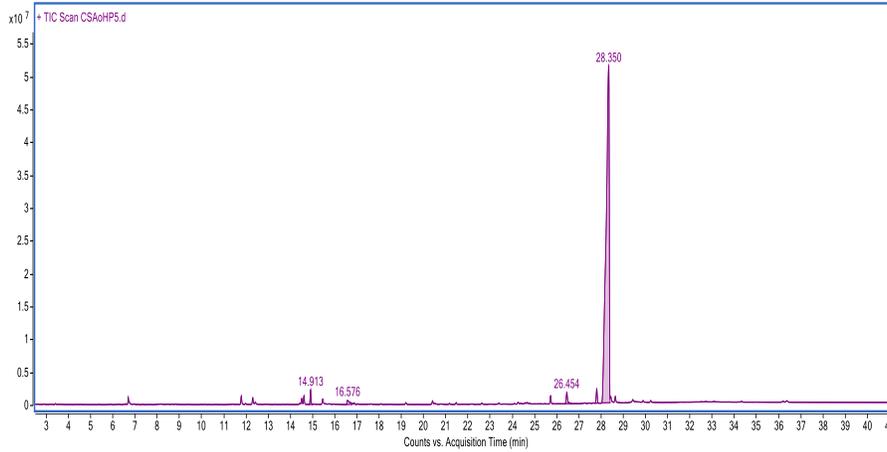


Figura 32. Cromatograma de gases del extracto de cápsula seca de raíz de *Argemone ochroleuca*.

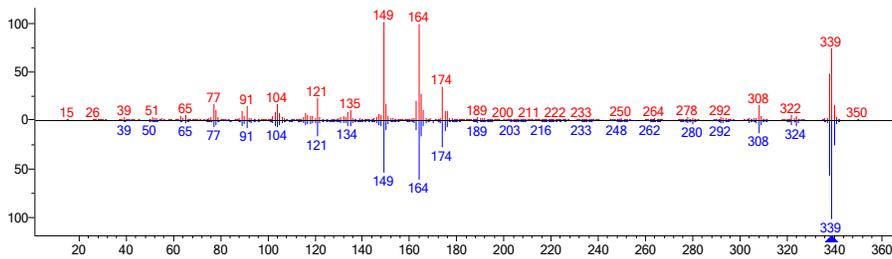


Figura 33. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 27.806 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la canadina en azul.

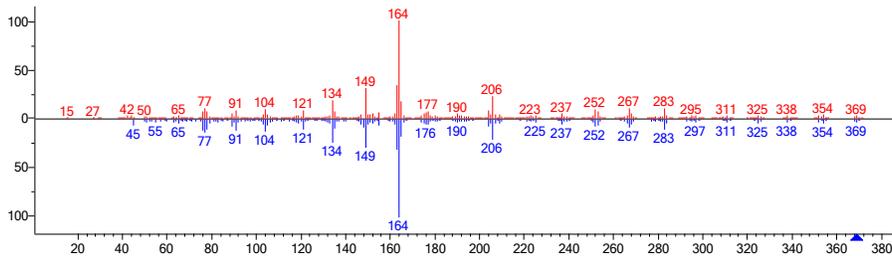


Figura 34. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.310 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul.

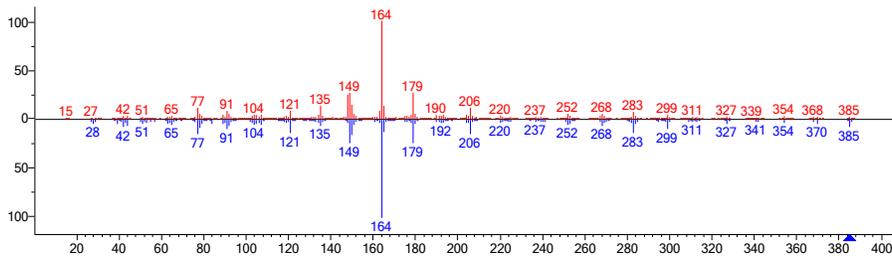


Figura 35. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.642 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la muramina en azul.

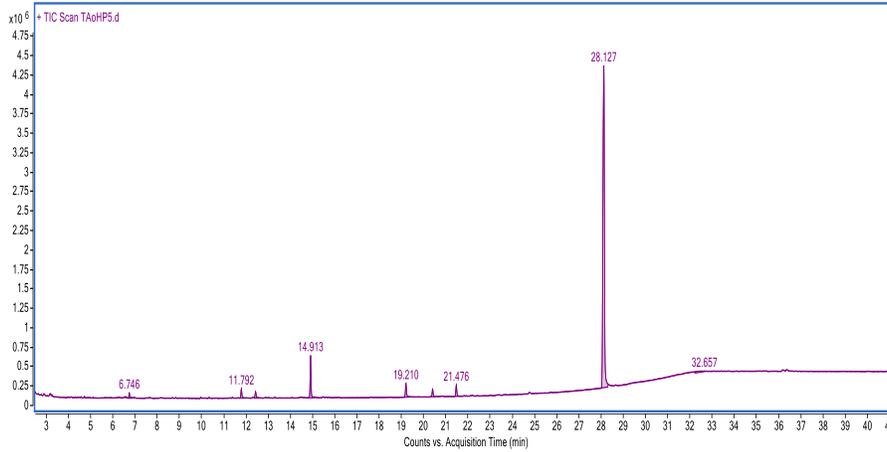


Figura 36. Cromatograma de gases del extracto de tallo de raíz de *Argemone ochroleuca*.

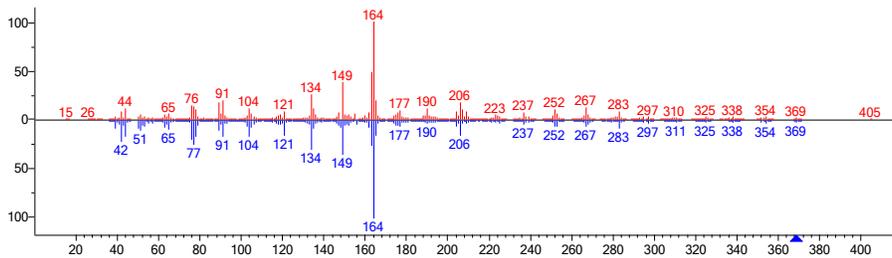


Figura 37. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul.

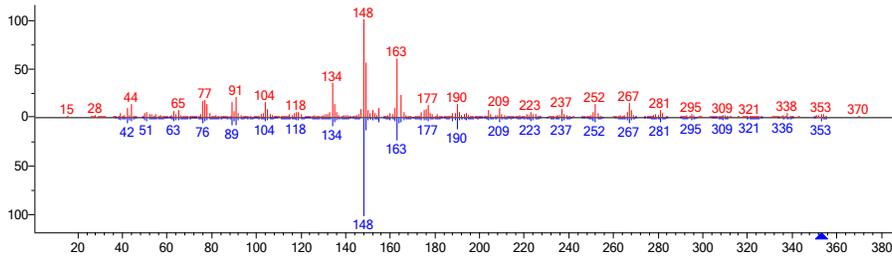


Figura 38. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.129 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la protopina en azul.

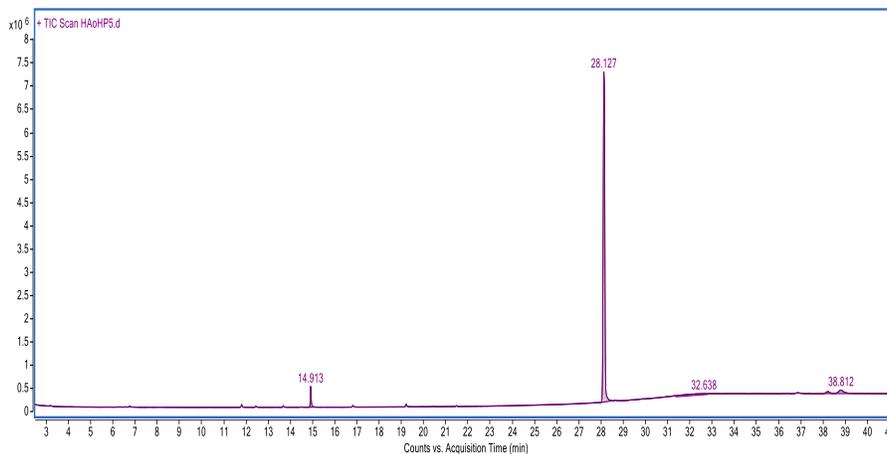


Figura 39. Cromatograma de gases del extracto de hoja de *Argemone ochroleuca*.

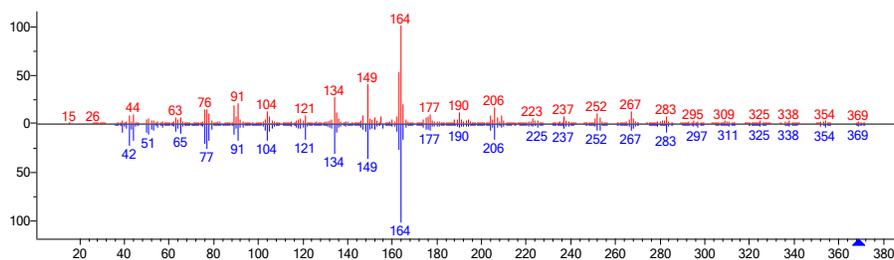


Figura 40. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.116 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alicriptopina en azul.

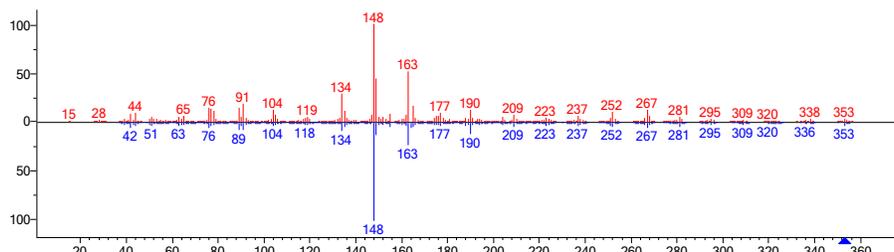


Figura 41. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.148 min en rojo, en comparación con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la protopina en azul.

## APÉNDICE II

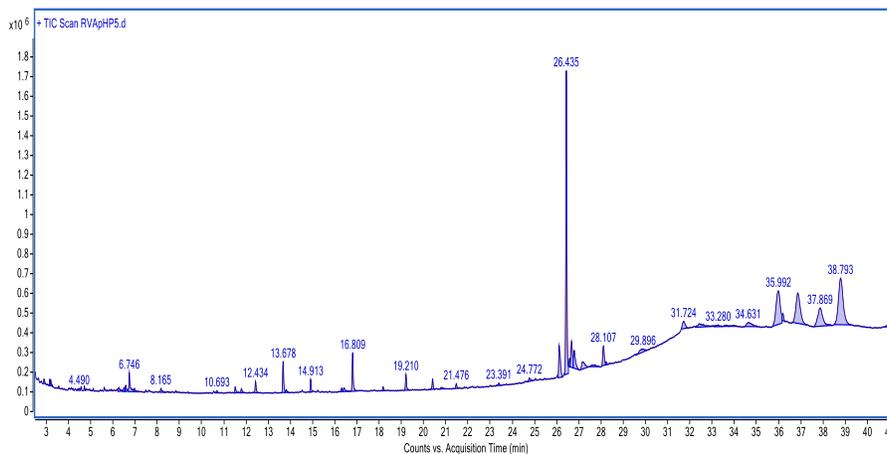


Figura 42. Cromatograma de gases del extracto de tejido vascular de raíz de *Argemone platyceras*.

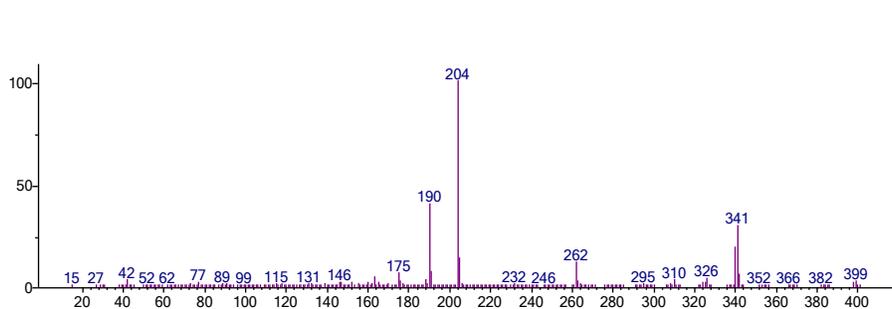


Figura 43. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.435 min.

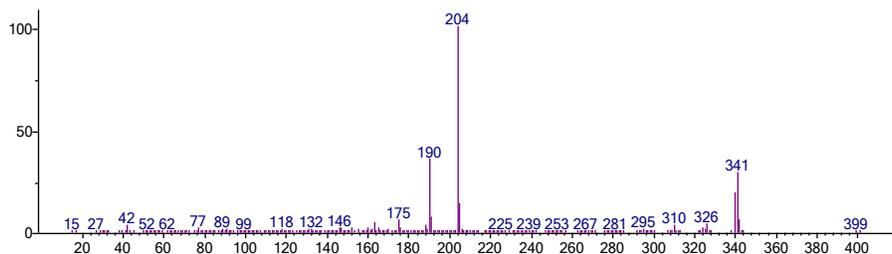


Figura 44. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.435 min.

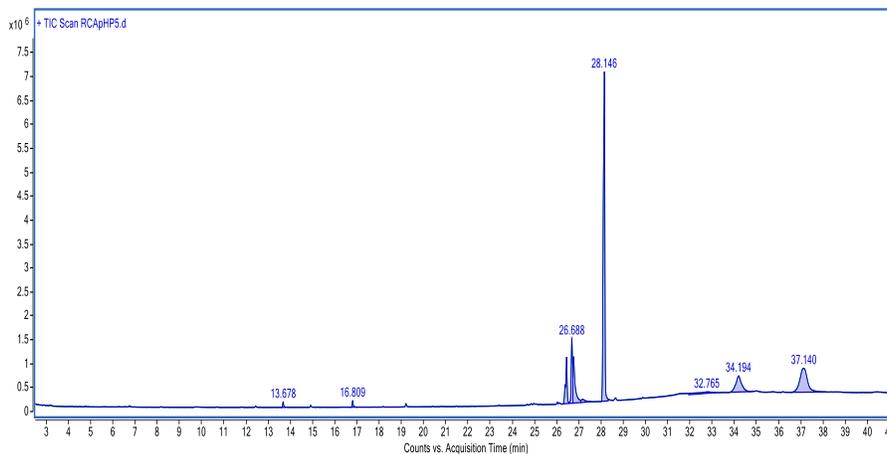


Figura 45. Cromatograma de gases del extracto de tejido de corteza de raíz de *Argemone platyceras*.

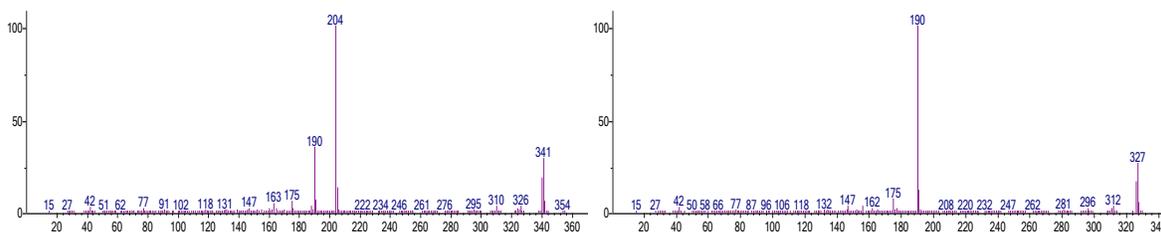


Figura 46. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.449 min (izq.) y 26.7003 min (der.)

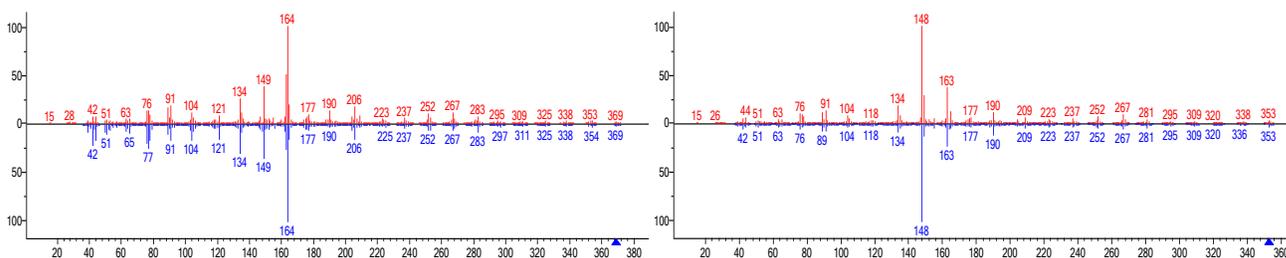


Figura 47. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.145 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul (izq.). Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.1636 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul (der.)

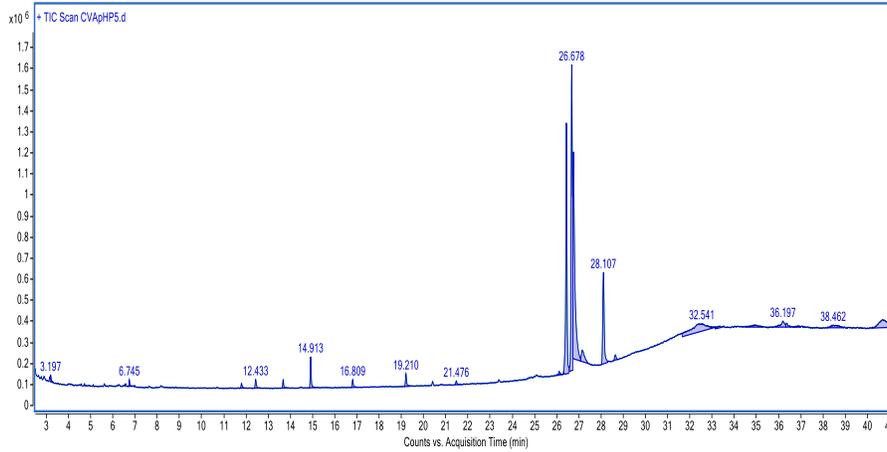


Figura 48. Cromatograma de gases del extracto de cápsula verde de raíz de *Argemone platyceras*.

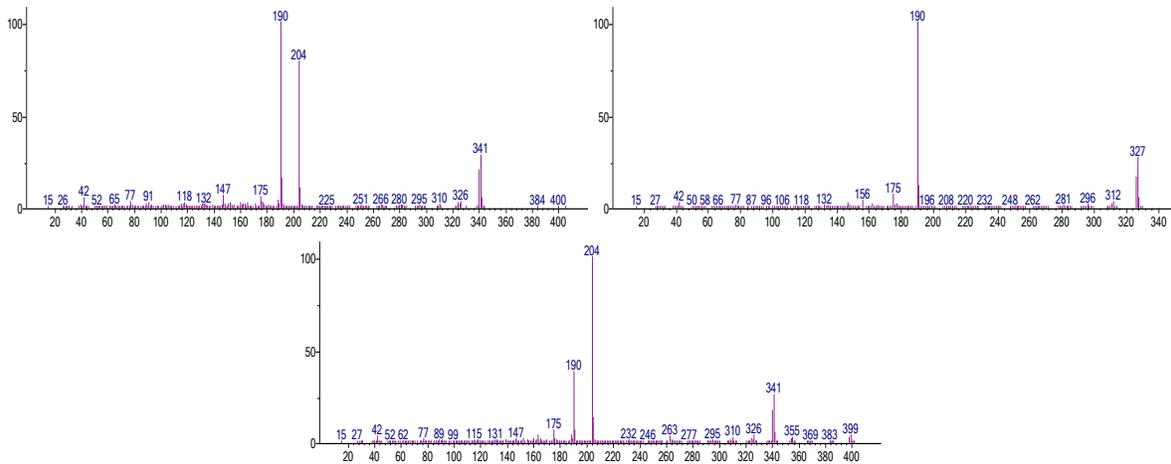


Figura 49. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.436 min (izq.) y 26.677 min (der.) arriba y tiempo de retención 26.7506 min abajo.

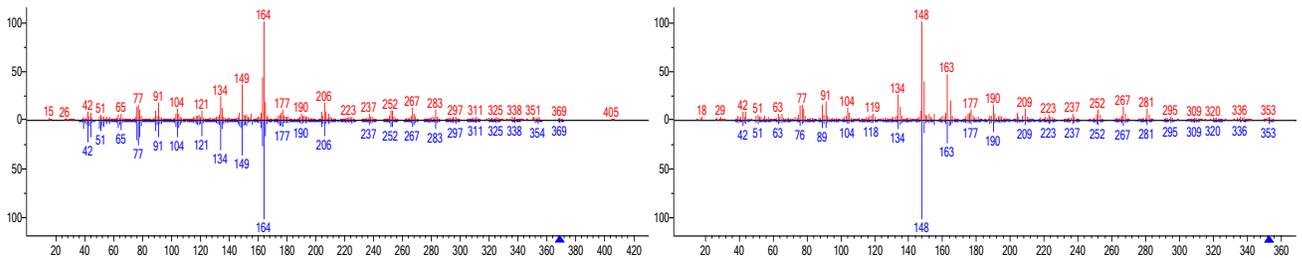


Figura 50. Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.096 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul (izq.). Espectro de masas experimental del pico con tiempo de retención 28.115 min en rojo, comparado con el espectro de masas de la biblioteca NIST de la alocriptopina en azul (der.)

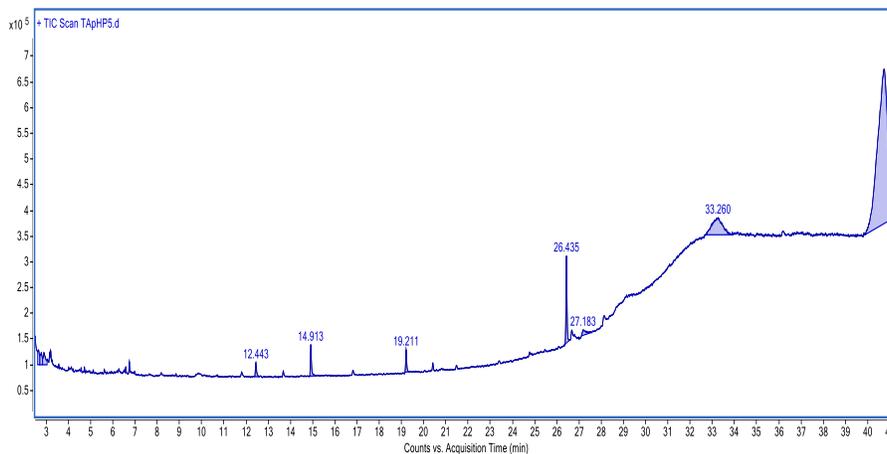


Figura 51. Cromatograma de gases del extracto de tallo de raíz de *Argemone plactyceras*.

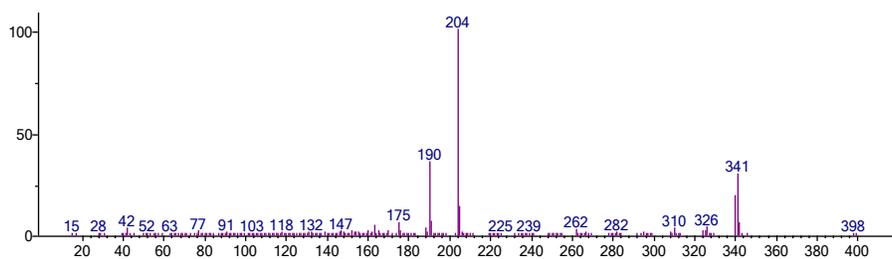


Figura 52. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.431 min

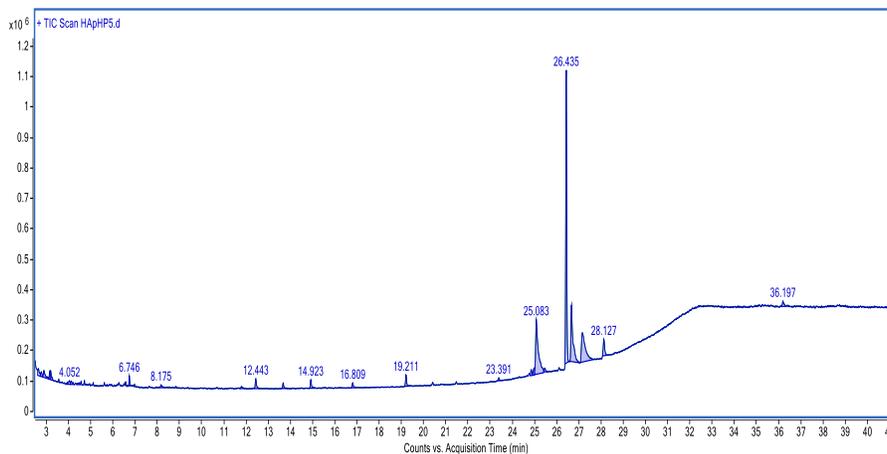


Figura 53.. Cromatograma de gases del extracto de hoja de raíz de *Argemone platyceras*.

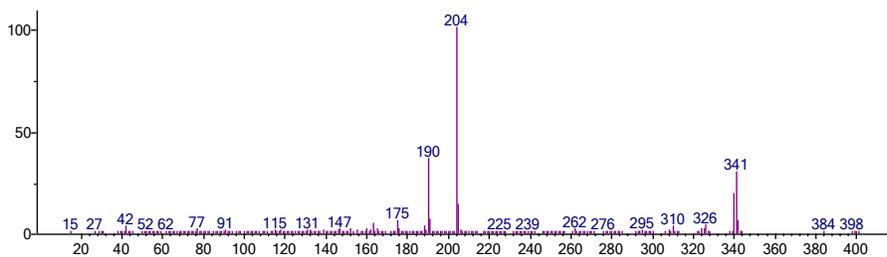


Figura 54. Espectro de masas experimental tiempo de retención 26.430 min