Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS AISLADOS DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA DE LA RAÍZ DE *BONELLIA MACROCARPA*

Tesis que presenta

SARA ELENA VILA LUNA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Sara Elena Vila Luna** titulado **Evaluación citotóxica y antiproliferativa y elucidación estructural de metabolitos aislados de la fracción hexánica de la raíz de *Bonellia macrocarpa*** fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Sergio R. Peraza Sánchez** y en la Unidad de Investigación Médica del IMSS bajo la dirección de la **Dra. Rosa Esther Moo Puc**, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 17 de junio de 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

Nombre: Sara Elena Vila Luna

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado **Estudio químico y determinación del potencial como fuente de fármacos antineoplásicos de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento del cáncer** (Proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica 2010-01-156755) en el que participé bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosa Esther Moo Puc.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), y la Dra. Rosa Esther Moo Puc, de la Unidad de Investigación Médica de Yucatán (UIMY) del Instituto Mexicano del Seguro Social por su orientación y conocimientos transmitidos durante mi maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por las instalaciones e infraestructura proporcionadas para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Investigación Médica de Yucatán (UIMY) del Instituto Mexicano del Seguro Social, y al jefe de la Unidad, Dra. Gloria Molina Salinas, por las instalaciones brindadas para la realización de los ensayos biológicos.

Al M. C. Luis W. Torres Tapia, por su apoyo técnico y orientación en la realización del presente trabajo.

Al comité revisor de tesis integrado por la Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dra. Gloria Molina Salinas y Dra. Virginia Herrera Valencia, por sus aportaciones realizadas en la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (550897/297655) para la realización del presente trabajo.

Al taxónomo Paulino Simá Polanco por la identificación y recolecta del material vegetal.

A mis profesores por todo el conocimiento transmitido durante mi maestría.

Al personal administrativo y académico por su amabilidad y orientación brindada.

DEDICATORIAS

Para los grandes seres humanos que he conocido hasta este momento de mi vida que son mi familia y verdaderos amigos, por su apoyo y sus valiosos consejos.

Para todas aquellas personas que en algún momento les sea útil el presente trabajo.

ÍNDICE

Índice ..... *i*
Lista de Abreviaturas ..... *iv*
Índice de Figuras ..... *vi*
Índice de Tablas ..... *viii*
Resumen ..... *ix*
Abstract ..... *xi*

Capítulo I. Planteamiento del Trabajo

1.1. Introducción 1
1.2. Antecedentes generales 2
1.2.1. Cáncer 2
1.2.2. Factores de riesgo del cáncer 3
1.2.3. Epidemiología del cáncer 4
1.2.4. Tratamientos 5
1.3. Las plantas medicinales como fuentes de nuevos fármacos 6
1.3.1. Metabolitos de origen vegetal con actividad anticancerígena 7
1.4. Descripción botánica de *Bonellia macrocarpa* 8
1.4.1. Actividad biológica de especies del género *Bonellia* 10
1.4.2. Actividad citotóxica de especies del género *Bonellia* 10
1.4.3. Compuestos aislados de plantas del género *Bonellia* 11
1.4.4. Usos medicinales de *Bonellia macrocarpa* 12
Justificación 13
Hipótesis 14
Objetivo general 14
Objetivos particulares 14
Estrategia experimental 15

Capitulo II. Estudio fitoquímico de la raíz de *Bonellia macrocarpa*: fracción hexánica

2.1. Introducción 17
2.2. Material y métodos..... 18
2.2.1. Procedimientos generales..... 18
2.2.2. Material vegetal 22
2.2.3. Obtención de los extractos orgánicos 23
2.2.4. Obtención de las fracciones por partición 23
2.2.5. Fraccionamiento mediante cromatografía líquida al vacío (VLC) de la fracción hexánica (BMR-2a)..... 24
2.2.6. Purificación de las fracciones con mayor actividad citotóxica..... 24
2.3. Aislamiento de los compuestos de las fracciones BMR-3e – BMR-3h..... 25
2.3.1. Aislamiento del compuesto I (BMR-5g1)……26
2.3.2. Aislamiento del compuesto II (BMR-7k1)……...26
2.3.3. Aislamiento del compuesto III (BMR-10d1)……...27
2.3.4. Aislamiento del compuesto IV (BMR-11a1)……...27
2.3.5. Aislamiento del compuesto V (BMR-14f1)……28
2.4. Resultados y discusión……29
2.4.1. Extracción..... 29
2.4.2. Características de la fracción hexánica..... 29
2.4.2.1. Purificación de la fracción hexánica..... 30
2.4.2.2. Purificación de las fracciones activas 30
2.4.3. Identificación del compuesto I (BMR-5g1)..... 32
2.4.4. Identificación del compuesto II (BMR-7k1) 37
2.4.5. Identificación del compuesto III (BMR-10d1) ……40
2.4.6. Identificación del compuesto IV (BMR-11a1)……..43
2.4.7. Identificación del compuesto V (BMR-14f1)……...50

Capitulo III. Evaluación del potencial anticancerígeno de la fracción hexánica y compuestos puros de *Bonellia macrocarpa*

3.1. Introducción 57
3.2. Material y métodos 58
3.2.1. Evaluación anticancerígena 58
3.2.2. Líneas celulares de cáncer 58
3.2.3. Bioensayo de sulforodamina B (SRB) 59
3.2.4. Determinación de las actividades antiproliferativa y citotoxicidad 60
3.2.5. Concentración citotóxica (CC_{50}) y concentración inhibitoria (CI_{50}) 61
3.3. Resultados y discusión 62
3.3.1. Evaluación de la actividad anticancerígena de la raíz de *B. macrocarpa* 62
3.3.2. Actividad citotóxica de las subfracciones 63
3.3.3. Actividad citotóxica de los compuestos aislados 65

Capitulo IV. Discusión y Conclusiones Generales

4.1. Discusión general 71
4.2. Conclusiones generales 74
4.3. Perspectivas 75
Referencias bibliográficas 77

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
CC_{50}	Concentración citotóxica media
CI_{50}	Concentración inhibitoria media
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCG	Columna cromatográfica por gravedad
CCF	Columna cromatográfica tipo flash
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CH_2Cl_2	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
Du-145	Línea celular humana de cáncer de próstata
EM	Espectrometría de masas
EM-CG	Espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases
g	Gramos
h	Horas
HeLa	Línea celular humana de cáncer cervicouterino
H_2O	Agua
Hx	Hexano
HMBC	Correlación Heteronuclear de Enlace Multiple
HSQC	Correlación Heteronuclear Solo Cuántica
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Infrarrojo
MCF-7	Línea celular humana de cáncer de mama
MeOH	Metanol
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
L	Litros
OMS	Organización Mundial de la Salud
R_f	Factor de retención

RMN	Resonancia magnética nuclear
SiHa	Línea humana de células escamosas de cáncer cervicouterino
SRB	Sulforodamina B
SFB	Suero fetal bovino
Sp.	Especie
Subsp.	Subespecie
UV	Ultravioleta
VLC	Cromatografía líquida al vacío
Vero	Línea celular de riñón de mono verde africano

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Ilustración del proceso en el que células normales se transforman en células cancerígenas	3
Figura 1.2	Arbusto de *Bonellia macrocarpa* con sus hojas y frutos	9
Figura 1.3	Flores de *Bonellia macrocarpa*	13
Figura 1.4	Diagrama de la estrategia experimental	15
Figura 2.1	Raíz de *Bonellia macrocarpa*	23
Figura 2.2	Diagrama para la obtención de los compuestos puros	25
Figura 2.3	Comparación en CCD corrida en el sistema Hx/An (7:3) de la fracción hexánica con el bonediol	29
Figura 2.4	CCD de las fracciones con alta actividad comparadas con la fracción hexánica	31
Figura 2.5	Subfracciones en donde se observa el bonediol	32
Figura 2.6	Compuesto 3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol (BMR-5g1)	33
Figura 2.7	Espectro de masas (CG-EM) y CCD del compuesto BMR-5g1	34
Figura 2.8	Espectro de IR del compuesto BMR-5g1	34
Figura 2.9	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-5g1	35
Figura 2.10	Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-5g1	35
Figura 2.11	Espectro de masas (CG-EM) y CCD del compuesto BMR-7k1	38
Figura 2.12	Espectro de IR del compuesto BMR-7k1	38
Figura 2.13	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-7k1	39
Figura 2.14	Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-7k1	39
Figura 2.15	Compuesto 3-(5',5'-dimetilhexil)-5-metoxi-fenol (BMR-10d1)	40
Figura 2.16	Espectro de IR del compuesto BMR-10d1	41
Figura 2.17	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-10d1	42
Figura 2.18	Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-10d1	42
Figura 2.19	Compuesto 1,3,5,6-tetrametoxi-8-metilnaftaleno (BMR-11a1)	44
Figura 2.20	Comparación en CCD del compuesto BMR-11a1 y el *epi*-lupeol	44
Figura 2.21	Espectro de masas (CG-EM) del compuesto BMR-11a1	45
Figura 2.22	Espectro de IR del compuesto BMR-11a1	46

Figura 2.23	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-11a1	46
Figura 2.24	Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-11a1	47
Figura 2.25	Ampliación del espectro de HMBC del compuesto BMR-11a1	48
Figura 2.26	Comparación de los compuestos A y B con BMR-11a1	50
Figura 2.27	Estructura de protoprimulagenina A (BMR-14f1)	51
Figura 2.28	Espectro de masas (CG-EM) del compuesto BMR-14f1	51
Figura 2.29	Espectro de IR del compuesto BMR-14f1	52
Figura 2.30	Espectro de RMN-^{1}H y estructura del compuesto BMR-14f1	52
Figura 2.31	Espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-14f1	53
Figura 2.32	Comparación de los compuestos semejantes al bonediol	55
Figura 3.1	Porcentaje de confluencia en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa)	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.1	Número de defunciones de acuerdo al tipo de cáncer	5
Tabla 1.2	Compuestos aislados del género *Bonellia*	12
Tabla 2.1	Fracciones obtenidas mediante la técnica de VLC de la fracción hexánica de *B. macrocarpa*.	30
Tabla 2.2	Cantidad obtenida de las 44 subfracciones de las cuatro fracciones originales con mayor actividad citotóxica	31
Tabla 2.3	Comparación de las señales obtenidas del compuesto BMR-5g1 y el 3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol	36
Tabla 2.4	Datos espectroscópicos de RMN del compuesto BMR-10d1	43
Tabla 2.5	Datos espectroscópicos de HMBC del compuesto BMR-11a1	47
Tabla 2.6	Comparación de los datos de RMN del compuesto BMR-11a1	49
Tabla 2.7	Comparación de las señales obtenidas de BMR-14f1 y el 3β-6α-dihidroxi-protoprimulagenina A	54
Tabla 3.1	Concentración citotóxica de las fracciones primarias activas en la línea celular HeLa con su desviación estándar (DE).	63
Tabla 3.2	Concentración citotóxica media de las subfracciones activas	64
Tabla 3.3	Concentración citotóxica media para cada compuesto	65
Tabla 3.4	Concentración inhibitoria media para cada compuesto	65

RESUMEN

Una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el cáncer; el último registro realizado en el año 2012 indicó que un total de 8.2 millones de personas han muerto por causa del cáncer. Los tratamientos que se emplean para el cáncer tienen diversos efectos secundarios, uno de ellos es que se genera resistencia hacia los diversos fármacos empleados, por lo que es importante realizar más estudios con el fin de encontrar compuestos con mejor eficacia y menos efectos adversos. Las plantas son una de las principales fuentes de productos naturales para la obtención de compuestos con actividad anticancerígena. El género *Bonellia* ha mostrado un potencial efecto citotóxico sobre diversas líneas celulares cancerígenas y *Bonellia macrocarpa* es una especie con pocos estudios fitoquímicos. En el presente trabajo 14 metabolitos fueron aislados de la fracción hexánica de la raíz de *B. macrocarpa*. Sin embargo, solamente cinco compuestos (> 5 mg) se eligieron para estudios espectroscópicos y espectrométricos, además de evaluar el efecto citotóxico y antiproliferativo de cada uno en cuatro líneas celulares cancerígenas y una normal. Tres de los compuestos aislados presentaron actividad citotóxica, mostrando un mejor efecto el compuesto BMR-5g1 sobre tres de las líneas celulares cancerígenas evaluadas, la línea celular de cáncer cervicouterino escamoso (SiHa), de mama (MCF-7) y de próstata (DU-145); el efecto del compuesto BMR-10d1 fue sobresaliente sobre la línea celular SiHa; y, por último, BMR-14f1 mostró poseer un mejor efecto contra HeLa, SiHa y MCF-7. Sin embargo, el efecto biológico observado fue bajo, asimismo, el índice de selectividad resultó moderado para estas líneas cancerígenas.

Los estudios espectroscópicos realizados para determinar la estructura molecular de los cinco compuestos confirmaron que dos moléculas son lípidos fenólicos semejantes al compuesto bonediol anteriormente aislado, un triterpeno de tipo oleanano, un benzociclobuteno y un tetrametoxi naftaleno. Así, el presente trabajo contribuyó fitoquímicamente con cinco compuestos nuevos en la especie, tres de ellos sin antecedentes en la literatura y, por otro lado, remarcó el potencial biológico de *B. macrocarpa*.

ABSTRACT

One of the leading causes of death worldwide according to the World Health Organization (WHO) is cancer; the last record made in 2012 indicated that a total of 8.2 million people have died from cancer. Treatments used to alleviate cancer have too many side effects, one of them being resistance to various drugs used, so it is important to conduct more studies to find compounds with improved efficacy and less side effects. Plants are a major source of natural products to obtain compounds with anticancer activity. The genus *Bonellia* has shown to have a cytotoxic potential effect on various cancer cell lines, and *Bonellia macrocarpa* is a species with few phytochemical studies reported. In this paper, 14 metabolites were isolated from the hexane fraction of the root of *B. macrocarpa*. However, only five compounds (> 5 mg) were chosen for spectroscopic and spectrometric studies and their cytotoxic and antiproliferative effects were evaluated on four cancer cell lines and one normal cell line. Three of the compounds isolated from the hexane fraction of the roots of *B. macrocarpa* demonstrated activity on various cancer cell lines, presenting compound BMR-5g1 the best cytotoxic effect on cervical squamous (SiHa), breast (MCF-7), and prostate (DU-145) cancer cell lines, while compound BMR-10d1 exhibited a better effect on SiHa cell line, and, finally, compound BMR-14f1 showed a better effect against HeLa, SiHa, and MCF-7 cell lines. However, the biological effect observed was low; likewise, the selectivity index was moderate to these cancer cell lines.

Spectroscopic studies to determine the molecular structure of the five compounds confirmed two molecules to be phenolic lipids similar to bonediol, a compound previously isolated from this species, a oleanane-type triterpene, a benzocyclobutene, and a tetramethoxy naphthalene. Thus, this work contributed phytochemically with five new compounds to this species, three of them without reports in the literature, and, on the other hand, highlighted the biological potential of *B. macrocarpa*.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

1.1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado los productos naturales para curar o aliviar ciertas dolencias: por ejemplo, la cultura babilónica empleaba sustancias principalmente de origen vegetal y la medicina china ha mejorado la medicina actual gracias a su contribución con muchas plantas y remedios (Jaramillo *et al*., 2008). El reino vegetal es una fuente importante para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer; más del 50% de los agentes antineoplásicos han sido aislados de productos naturales y un ejemplo claro son la vinblastina y vincristina, medicamentos que se utilizan contra esta enfermedad (Gordaliza, 2007; Gerson *et al*., 2006; Agosta, 1997).

El género *Bonellia* engloba un grupo de plantas con flores que pertenece a la familia Theophrastaceae, incluyendo arbustos o árboles pequeños, generalmente muy ramificados; este género se distribuye en Mesoamérica, al noroeste de Sudamérica y las Grandes Antillas (Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al*., 1998). Los estudios realizados sobre este género son escasos, sin embargo, contribuyen para demostrar su potencial efecto anticancerígeno; además, se ha visto que también algunas de sus especies poseen actividad antifúngica y tripanocida (Buitimea-Cantúa *et al*., 2013; García-Sosa *et al*., 2011; Peña Rodríguez *et al*., 2010). El género *Bonellia* ha demostrado un potencial efecto citotóxico sobre distintas líneas celulares de cáncer; diversos trabajos demuestran que las hojas, tallo y raíz de plantas de este género son capaces de producir un efecto citotóxico (Moo-Puc *et al*., 2013; Caamal-Fuentes *et al.,* 2011a, 2011b; Sánchez-Medina *et al*., 2009; Calderón *et al*., 2006). La raíz de *Bonellia macrocarpa* fue responsable de producir un daño citotóxico sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino (SiHa), nasofaríngeo (KB) y laríngeo (Hep-2). El compuesto bonediol, aislado de la raíz de la fracción hexánica de la especie *B. macrocarpa*, mostró tener una CI_{50} entre 8.3-11.1 μg/mL en un bioensayo de actividad citotóxica contra varias células neoplásicas (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011a).

Bonellia macrocarpa, especie conocida comúnmente como lengua de gallo o naranjillo, se caracteriza por tener flores en general anaranjadas, las cuales se utilizan para curar la tos, asma y trastornos bucales como llagas (Méndez-González *et al*., 2012; Carnevali *et al*., 2010).

Más estudios son necesarios sobre el género, en especial, sobre la especie *B. macrocarpa*, la cual es de interés por su notable actividad anticancerígena, es por ello que en el presente trabajo se estudió la fracción hexánica de la raíz de *B. macrocarpa* con el propósito de ahondar un poco más sobre esta especie, determinando su efecto citotóxico sobre células cancerígenas, aislar los compuestos y elucidar sus estructuras químicas, así como determinar si los compuestos aislados son los responsables de la actividad citotóxica observada además del bonediol.

1.2. ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1. CÁNCER

En condiciones normales nuestros tejidos se encuentran en un equilibrio entre las nuevas células que proliferan y las que mueren. En los tejidos cancerosos este equilibrio se altera, ocasionando una pérdida del control celular, entonces las células malignas proliferan e invaden otros tejidos, en un proceso conocido como metástasis (OMS, 2013; González *et al*., 2010).

El cáncer se origina a partir de la alteración del material genético de una célula y ésta sufre nuevos episodios de mutación junto con sus descendientes, evadiendo la muerte celular programada (apoptosis). El cáncer se caracteriza por la proliferación descontrolada de células transformadas con la extensión de sus clones, originando una masa amorfa de células que recibe el nombre de tumor (Figura 1.1). El crecimiento está determinado por la capacidad proliferativa de estas células tumorales y la capacidad de invadir los tejidos del huésped, provocando la metástasis en sitios distantes (González *et al*., 2010; NCI, 2011; Abbas *et al*., 2002).

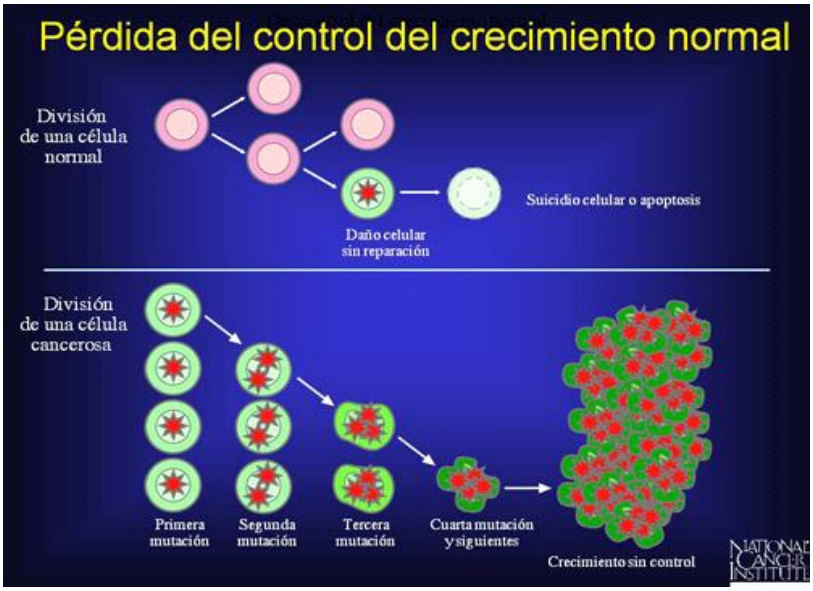


Figura 1.1 Ilustración del proceso en el que células normales se transforman en células cancerígenas (NCI, 2011).

Los tumores se pueden clasificar en dos tipos, tumores benignos y tumores malignos (cáncer). El cáncer es considerado no como una enfermedad aislada, sino el término se adjudica a un conjunto de enfermedades; dependiendo del órgano en el cual se origina es el nombre que recibe, es decir, si se produce en las células del pulmón recibe el nombre de cáncer de pulmón, etc. (González *et al*., 2010).

1.2.2. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER

La herencia, dieta, hormonas y factores externos, tales como sustancias químicas, radiación, algunos virus y bacterias pueden influir en el riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (OMS, 2013; NCI, 2011; González *et al*., 2010).

La incidencia del cáncer depende de diferentes parámetros, tales como la edad, sexo, raza y condición geográfica, en conjunto con diversos factores internos y externos que pueden influir en el riesgo de padecer esta enfermedad. El cáncer se puede presentar en cualquier edad, incluyendo la infancia, muchas veces originándose en menores de 15 años (Sierra *et al*., 1992). La probabilidad de padecer cáncer va en aumento con la edad,

y tal vez una explicación para esto sería la acumulación de los factores de riesgo (OMS, 2013).

La alteración de las células normales para transformarse a células tumorales depende de la respuesta de las células a diferentes factores entre los que se encuentran:

I) Tabaco: implicado en el 80-90% de las neoplasias en varones, mientras que representa el 55-80% para las mujeres.
II) Alcohol: su consumo se encuentra asociado a diferentes tipos de cáncer, estudios reportan que la ingesta de concentraciones elevadas de alcohol aumentan el riesgo de cáncer de mama (Boyle y Boffetta, 2009).
III) Asbesto y metales: la exposición a ciertos agentes como níquel, cobalto, aumentan el riesgo de padecer cierto tipo de cáncer (Florea y Büsselberg, 2011; González *et al*., 2010).
IV) Alimentación: juega también un papel crucial, una alimentación rica en grasas y carnes rojas aumenta el riesgo de cáncer colorrectal (OMS, 2013; González *et al*., 2010; Genkinger y Koushik, 2007). Trabajos recientes revelaron una asociación entre una dieta rica en carne y el riesgo de contraer cáncer de vejiga (Wu *et al*., 2012), así como también en el aumento del consumo de grasas (Azrad *et al*., 2013).
V) Radiaciones: los rayos X, rayos gamma, son factores predisponentes. La radiación ultravioleta (proveniente del sol) está relacionada con los carcinomas cutáneos (OMS, 2013; NCI, 2011; González *et al*., 2010).

1.2.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

En México el cáncer representa la tercera causa de muerte. Reportes del INEGI indican que en el año 2011 de cada 100 ingresos hospitalarios por tumores en el país, 56 son de tipo maligno (INEGI, 2014; Secretaría de Salud, 2013). En nuestro país los tipos de cáncer más comunes son el de próstata, mama, cervicouterino, pulmón y estómago (Secretaría de Salud, 2013).
En Yucatán el cáncer causó la muerte de 1,221 personas en el año 2010, ocupando el segundo lugar de las defunciones entre los que destacan el cáncer de estómago, hígado y

próstata (Unión Yucatán, 2012), Entre los principales tipos de cáncer que causan más defunciones en el mundo de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) se señalan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Número de defunciones de acuerdo al tipo de cáncer.

Tipo de cáncer	Defunciones
Pulmonar	1,370,000
Gástrico	736,000
Hepático	695,000
Colorrectal	608,000
Mamario	458,000
Cervicouterino	275,000

El cáncer pulmonar es el más frecuente hablando en número de defunciones, ocupando el primer lugar con 1.3 millones de personas muertas (OMS, 2013; National Geographic Society, 1996-2013).

1.2.4. TRATAMIENTOS

Existen distintas terapias para tratar de curar o controlar el cáncer, entre las que destaca la quimioterapia o uso de fármacos, los cuales destruyen las células cancerígenas, sin embargo, este tipo de tratamiento no distingue las células normales de las células tumorales, por lo cual presenta diversos efectos secundarios como son fatiga, vómitos, pérdida de cabello, etc.; la radioterapia, en la cual se utiliza un tipo de energía llamada radiación ionizante, la cual daña el material genético de las células e imposibilita de esta manera su división. La radiación depende del tipo de cáncer o de su localización, se aplica de manera externa o interna, y puede producir un cáncer secundario como resultado de la radiación; la cirugía, que consiste en la extirpación del tumor, pero podrá realizarse la intervención quirúrgica dependiendo del órgano afectado. Todos estos tratamientos son costosos, además de tener muchos efectos adversos (NCI, 2011).

1.3. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE NUEVOS FÁRMACOS

Para evitar el desarrollo del cáncer y su diseminación entre los tratamientos mencionados se encuentra la terapia farmacológica, y las plantas son fuente importante para la búsqueda de nuevos fármacos, las cuales contienen metabolitos con diferentes propiedades medicinales.

Las plantas, a diferencia de los demás seres vivos poseen un metabolismo denominado secundario, el cual se deriva del metabolismo primario. Los metabolitos primarios (aminoácidos, azúcares, etc.) intervienen en el desarrollo y crecimiento de la planta y se encuentran presentes en todo el reino vegetal. Los productos originados a partir del metabolismo secundario reciben el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales, son compuestos orgánicos que tienen funciones básicas desde dar color a las flores y frutos, o intervenir en los mecanismos de defensa y función protectora frente a depredadores. Ejemplos de este tipo de compuestos son la lignina, metabolito secundario que le confiere soporte estructural a las plantas o las antocianinas encargadas de proporcionar el color; a diferencia de los metabolitos primarios los metabolitos secundarios se expresan solamente en una especie vegetal o un grupo de especies relacionadas (Ávalos y Pérez, 2009; Zeiger y Taiz, 2006). Trabajos recientes han descubierto propiedades importantes de estos compuestos; estudios realizados alrededor del mundo demuestran que todo o diferentes partes de las plantas pueden poseer diversos efectos biológicos, como por ejemplo: actividad antifúngica, antirretroviral, antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antidiabética, anticancerígena, sugiriendo que los responsables de estas actividades son los metabolitos secundarios que contienen, con base en la evaluación de los extractos o los compuestos aislados en distintas especies vegetales (Ramírez *et al*., 2012; Caamal-Fuentes *et al*., 2011b; Panghal *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2011; Anyaehie, 2009; Damián *et al*, 2008; Calderón *et al*., 2006).

Más del 50% de los agentes anticancerígenos son derivados de productos naturales; existe un gran número de especies vegetales con propiedades medicinales y que no han sido investigadas, representando una fuente principal para el descubrimiento de un nuevo

fármaco con potencial anticancerígeno. El Taxol® (paclitaxel), es ejemplo de un fármaco que fue aislado de *Taxus brevifolia* y es utilizado en quimioterapia para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón; la vincristina y vinblastina son otros ejemplos de fármacos que fueron aislados de plantas (*Catharanthus roseus*) y también son utilizados en la terapia contra el cáncer (Cragg y Newman, 2005). Sin embargo, desafortunadamente, aunque estos compuestos provienen de fuentes naturales, estos tratamientos no son selectivos, dañando de igual manera las células cancerígenas y células normales en constante proliferación, como son las células epidérmicas, células de la medula ósea, entre otras, provocando la pérdida de cabello, anemias o susceptibilidad a infecciones (Alison, 2001); debido a lo anterior, surge el interés en la búsqueda de un nuevo compuesto selectivo, que sea capaz de disminuir los efectos secundarios. El valor medicinal de las plantas para el desarrollo de nuevos fármacos es sin duda de vital importancia para científicos e investigadores a nivel mundial.

1.3.1. METABOLITOS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Existen cuatro grupos principales de compuestos que son utilizados actualmente como fármacos anticancerígenos. Los alcaloides vinca, como la vinblastina y vincristina, aislados de la especie *Catharantus roseus*, así como sus derivados semisintéticos, son utilizados para el tratamiento de cáncer de mama, pulmón, testicular, leucemias, entre otros. Este tipo de fármacos ejercen un efecto antiproliferativo y actúan evitando la polimerización de la tubulina, la cual es una proteína esencial de los microtúbulos que intervienen en diversos procesos celulares como la división celular. Los derivados semisintéticos de las epipodofilotoxinas (lignanos), aisladas de *Podophillum peltatum*, tales como el etopósido y tenipósido, son usados contra el cáncer de piel, bronquial, testicular y linfomas. Estos compuestos producen un efecto antiproliferativo y citotóxico. El mecanismo de acción descrito es que se enlazan a la tubulina, impidiendo la polimerización e inhiben la topoisomerasa II, causando el rompimiento de las hebras del ADN. Otro grupo de fármacos anticancerígenos son los taxanos (diterpenos), entre los que se encuentran el Taxol® (paclitaxel) y el docetaxel. El paclitaxel fue inicialmente aislado de *T*. *brevifolia* y está siendo utilizado contra el cáncer de mama, pero es también útil en el cáncer de ovario y de pulmón. Estos taxanos poseen un efecto antiproliferativo,

en el cual el fármaco se une a la tubulina agrupando a los microtúbulos y causando su estabilización contra la despolimerización. Por último las camptotecinas (alcaloides), un tipo de metabolitos que fueron aislados de *Camptotheca acuminata*, siendo más eficaz el topotecan para el tratamiento de cáncer de pulmón y ovario, mientras que el irinotecan es usado contra el cáncer colorrectal. El mecanismo de estos fármacos es un efecto citotóxico, inhibiendo la topoisomerasa I, complejo de enzimas involucradas en el enrollamiento y desenrollamiento del ADN (Cragg y Newman, 2005).

México posee una gran diversidad de especies de plantas registradas en la medicina tradicional empleadas para el tratamiento de cáncer. Alonso *et al*. (2011) reportaron que de un total de 300 especies, menos de la tercera parte ha mostrado efectos citotóxicos en estudios experimentales realizados *in vitro*, y sólo una pequeña parte se ha estudiado *in vivo*; además, existen pocos experimentos realizados en modelos animales de los compuestos aislados con actividad citotóxica y en los escasos estudios que se han realizado no siempre se observa este efecto. El número de trabajos realizados es muy limitado, haciendo necesario incrementar estudios sobre las especies vegetales existentes en nuestro país. La evaluación de extractos vegetales de 21 especies de la península de Yucatán empleadas en la medicina tradicional Maya reveló su efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer; entre las especies estudiadas, *B*. *macrocarpa* mostró una pronunciada actividad citotóxica (Caamal-Fuentes *et al*., 2011b).

1.4. DESCRIPCIÓN BOTANICA DEL GÉNERO *BONELLIA*

La familia Theophrastaceae se encuentra formada por siete géneros (*Clavija, Theophrasta, Neomezia, Deherainia, Votschia, Jacquinia* y *Bonellia*). Esta familia se caracteriza por contener árboles o arbustos con hojas alternas u opuestas e incluye cerca de 100 especies. Antiguamente el género *Bonellia* se conocía con el nombre de *Jacquinia*; sin embargo, fue dividido en dos géneros distintos. *Bonellia* se distingue por sus flores en su mayoría anaranjadas, en ocasiones blancas o blanquecinas con hojas alternas y semillas aplanadas y consiste de 22 especies (Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al*., 1998).

La especie *Bonellia macrocarpa* (Cav.) B. Ståhl & Källersjö (Figura 1.2) es conocida como lengua de gallo, limoncillo, naranjillo o pico de gallo. Se encuentra generalmente en forma de arbusto pequeño, pero puede llegar a medir hasta 6 m.; con hojas alternas, opuestas o subverticiladas; se distingue por sus flores en su mayoría anaranjadas o tendiendo a rojas brillantes, aromáticas, de 8 a 10 mm de largo en racimos de 4 a 14 flores; fruto abayado de color amarillo, anaranjado o pardo, corrugado, ligeramente cónico y con semillas aplanadas.

Figura 1.2 Arbusto de *Bonellia macrocarpa* con sus hojas y frutos.

Se distribuye en el suroeste de México, Centroamérica, Guatemala, Honduras y Panamá; Habita en su mayoría en regiones húmedas, como son duna costera, manglar, selva baja inundable, selva baja caducifolia y vegetación acuática, como cenotes y lagunas. *B. macrocarpa* se subdivide en tres subespecies: *macrocarpa*, *pungens* y *panamensis*. La subespecie *macrocarpa* se localiza en el sur de México, la segunda subespecie se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Sonora hasta Colima, y por último, la subsp. *panamensis* se encuentra sólo en Panamá (Méndez-González *et al*., 2012; Carnevali *et al*., 2010; Källersjö y Ståhl, 2004; Castillo-Campos *et al*., 1998).

1.4.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESPECIES DEL GÉNERO *BONELLIA*

En la literatura existen escasos estudios sobre especies del género *Bonellia*; sin embargo, por el uso que tienen estas plantas en la medicina tradicional se han llevado a cabo algunos trabajos para evaluar su efecto en diversas áreas, los cuales han demostrado la eficacia de sus extractos con actividad antifúngica, tripanocida y anticancerígena (Buitimea-Cantúa *et al*., 2013; Moo-Puc *et al*., 2013; Caamal-Fuentes *et al.,* 2011b; García-Sosa *et al*., 2011; Peña Rodríguez *et al*., 2010; Sánchez-Medina *et al*., 2009).

1.4.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE ESPECIES DEL GÉNERO *BONELLIA*

Entre las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento del cáncer se encuentran las del género *Bonellia*. Diversos trabajos revelan su gran efecto citotóxico contra diferentes líneas celulares de cáncer (Calderón *et al*., 2006). Sánchez-Medina *et al*. (2009) evaluaron la actividad citotóxica contra dos líneas celulares de mamíferos, HeLa y RAW 264.7, utilizando distintas partes de la especie *B. flammea*, demostrando que el extracto de la raíz de esta planta tiene elevada actividad citotóxica seguida por el tallo, mientras que las hojas no mostraron actividad significativa. Moo-Puc *et al*. (2013) realizaron un trabajo similar con la especie *B. albiflora*, el cual reveló que al utilizar la raíz de esta planta tiene una notable actividad (CC_{50} = 12.64 μg/mL) sobre la línea de cáncer nasofaríngeo (KB) evaluada, seguida por las hojas (CC_{50} = 23.85 μg/mL) y en menor proporción el tallo (CC_{50} = 62.30 μg/mL). Para las líneas HeLa, Hep-2 y SiHa la raíz demostró tener una citotoxicidad moderada (CC_{50} entre 31 y 35 μg/mL) mientras que para las otras partes empleadas de la planta se observó menor efecto citotóxico o incluso nula actividad.

Estudios previos en los que se analizó el efecto citotóxico de los extractos de la raíz y tallo de *B. macrocarpa* contra distintas líneas celulares de cáncer, se observó que la raíz de esta planta presentó notable actividad citotóxica contra KB y Hep-2 (CC_{50} de 15.3 y 20 μg/mL, respectivamente), moderada actividad en las líneas de cáncer PC-3, SiHa, MCF-7 y HeLa (CC_{50} 30-39 μg/mL), mientras que el tallo presentó notable actividad (18.6 μg/mL) solamente sobre la línea KB (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011b); en otro estudio cuando se

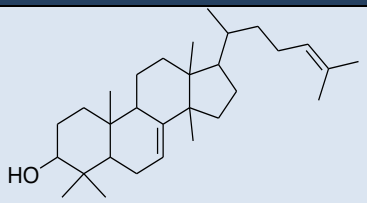
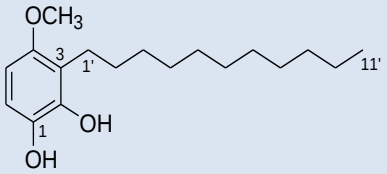
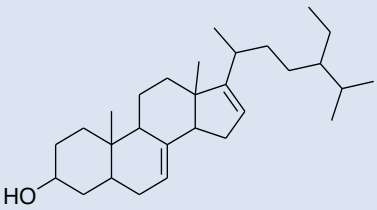
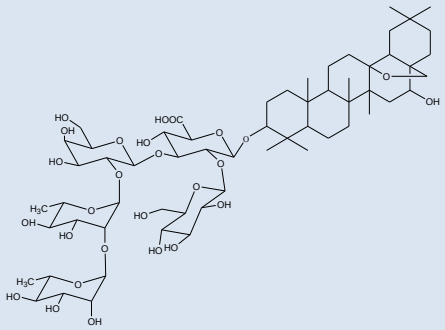
empleó la raíz de la fracción hexánica de *B. macrocarpa*, ésta fue responsable de la actividad citotóxica contra tres líneas celulares de cáncer evaluadas, cáncer cervicouterino (SiHa), nasofaríngeo (KB) y laríngeo (Hep-2) y el compuesto responsable de esta actividad fue el bonediol (Caamal-Fuentes *et al*., 2011a).

1.4.3. COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *BONELLIA*

Entre los compuestos aislados en especies de este género se han encontrado ácidos grasos, como el ácido dodecanoico, el ácido tridecanoico, ácido malónico, además de saponinas como responsables de actividad antifúngica y citotóxica (Moo-Puc *et al*., 2013; García-Sosa *et al*., 2011; Sánchez-Medina *et al*., 2009).

En particular, de la especie *B. macrocarpa* se pudo aislar un nuevo compuesto, llamado bonediol (una catecolamina), obtenido de la raíz de la fracción hexánica, que fue la que mostró actividad citotóxica sobre KB, Hep-2 y SiHa (Caamal-Fuentes *et al*., 2011a); también se encontraron triterpenos, ácidos grasos y esteroles en esta fracción estudiada (Caamal-Fuentes, 2012); algunos de los compuestos aislados se muestran a continuación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Compuestos aislados del género *Bonellia*.

Nombre	Estructura
Compuesto: tirucalan-7,24-dien-3β-ol Sin actividad citotóxica	
Compuesto: bonediol Con actividad citotóxica	
Compuesto: estigmaste-7,16-dien-3-ol Sin actividad citotóxica	
Compuesto: sakurasosaponina Con actividad citotóxica y antifúngica	

1.4.4. USOS MEDICINALES DE *BONELLIA MACROCARPA*

Las flores de esta planta (Figura 1.3) son utilizadas para curar el catarro, el asma y la tos constante con vómitos y diarrea; en la literatura se ha reportado que el cocimiento de hojas y flores se emplea para el tratamiento de trastornos bucales como llagas; la raíz y las semillas se utiliza para el dolor de muelas; otros usos reportados son contra enfermedades del aparato respiratorio, para tratar la tosferina, problemas gastrointestinales, como cólicos intestinales y parásitos (Méndez-González *et al*., 2012).

Figura 1.3 Flores de *Bonellia macrocarpa*.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer es un problema mundial y que afecta a millones de personas, desde niños hasta personas mayores, que los diversos tratamientos utilizados contra esta enfermedad (incluyendo a los fármacos provenientes de especies vegetales) generan distintos efectos adversos, además de ser costosos, y que la mayoría de los fármacos utilizados no son selectivos y las células cancerígenas generan resistencia, ocasionando la ineficacia terapéutica, es importante buscar nuevos compuestos que en un futuro den origen a tratamientos que no sólo prolonguen la vida del paciente sino que puedan ayudar a recuperar la salud con pocos o nulos efectos secundarios.

Diferentes especies vegetales en distintas partes del mundo están siendo estudiadas con el propósito de encontrar algún compuesto que sea capaz de tener un efecto benéfico potencial y a la vez que carezca de efectos perjudiciales. Las plantas usadas en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades son un blanco importante para ampliar los estudios de más especies vegetales para la obtención de metabolitos con actividad antineoplásica.

En Yucatán existen especies que se utilizan contra síntomas sugerentes a cáncer. *B. macrocarpa* ha sido poco estudiada; los trabajos realizados sobre la fracción hexánica proveniente del extracto metanólico de la raíz de esta planta han demostrado su potencial efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares de cáncer. En el presente trabajo se pretende profundizar sobre esta fracción que ha mostrado un visible efecto citotóxico y de

esta manera enriquecer el trabajo anterior realizado por Caamal-Fuentes *et al*. (2012) sobre esta especie; determinar su actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer (SiHa, HeLa, MCF-7 y DU-145), así como aislar, purificar y elucidar los metabolitos activos con potencial anticancerígeno, que en un futuro podrían convertirse en nuevos fármacos para la cura del cáncer.

HIPÓTESIS

La fracción hexánica de la raíz de *Bonellia macrocarpa* contiene diversos metabolitos secundarios que poseen actividad citotóxica y/o antiproliferativa.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa y elucidar la estructura de los metabolitos secundarios aislados de la fracción hexánica obtenida del extracto metanólico de la raíz de *Bonellia macrocarpa.*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad citotóxica de los extractos y las distintas fracciones de *B. macrocarpa* contra diferentes líneas de cáncer.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mediante métodos cromatográficos de las fracciones que resulten activas en el bioensayo de citotoxicidad.
- Elucidar las estructuras de los compuestos aislados utilizando métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar la actividad citotóxica y antiproliferativa de los metabolitos puros.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Procedimiento general para la realización del estudio biodirigido en el presente trabajo

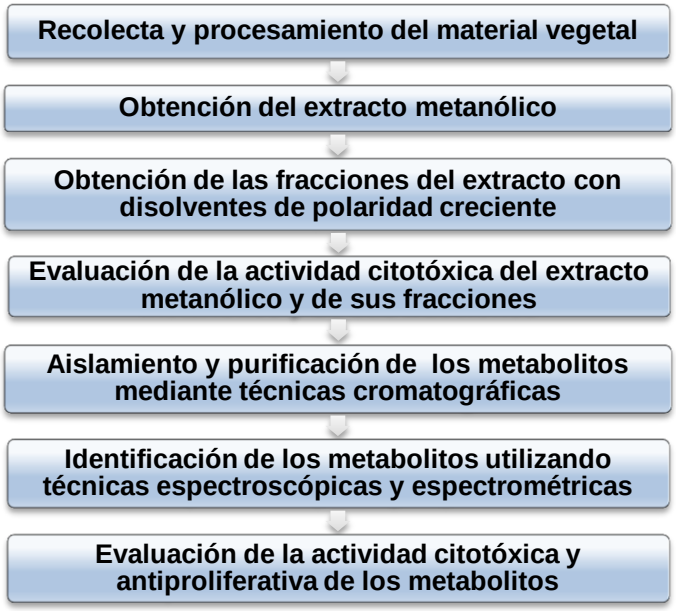


Figura 1.4 Diagrama de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE *BONELLIA MACROCARPA*: FRACCIÓN HEXÁNICA

2.1. INTRODUCCIÓN

El reino vegetal posee un grupo de compuestos químicos denominados metabolitos secundarios; son moléculas orgánicas que intervienen en funciones básicas de la planta, en la defensa contra microorganismos patógenos o como atrayentes de polinizadores con el objetivo de reproducirse y de esta manera preservar su especie (Zeiger y Taiz, 2006). Actualmente se sabe que los metabolitos secundarios presentan diversas propiedades, ejerciendo distintos efectos biológicos como se ha mencionado en el capítulo anterior. Varios compuestos son conocidos y son responsables de distintos efectos biológicos; sin embargo, una de las expectativas de este trabajo es aislar compuestos nuevos, capaces de producir un mejor efecto citotóxico y/o antiproliferativo, que en un futuro puedan servir como precursores de nuevos fármacos, además de aportar más sobre la fitoquímica de la especie en estudio.

Para el aislamiento y purificación de los compuestos es necesario el uso de diversas técnicas de extracción sólido-líquido, extracción líquido-líquido, cromatografía en columna, etc. y se requiere de la aplicación de métodos espectrométricos así como espectroscópicos, los cuales son fundamentales para su elucidación estructural (Silvertein, 2005; Braithwaite y Smith, 1999; Domínguez, 1973).

La especie *B. macrocarpa* es usada en la medicina tradicional para aliviar ciertas dolencias, como el asma, tos, vómitos; además, estudios han demostrado un efecto dañino contra distintas líneas celulares cancerígenas (Caamal-Fuentes *et al*., 2012; Méndez-González *et al*., 2012). Algunos metabolitos se han aislado de la fracción hexánica de la raíz de *B. macrocarpa*, sin embargo, sólo uno de ellos (bonediol) ha sido el responsable de una actividad biológica interesante, pues logró ejercer un efecto antiproliferativo contra tres líneas celulares cancerígenas (SiHa, KB y Hep-2) de cuatro

líneas celulares evaluadas (Caamal-Fuentes *et al*., 2012; Caamal-Fuentes *et al*., 2011a), marcando la necesidad de realizar más estudios sobre esta especie.

En el presente trabajo se determinó la estructura molecular de cinco metabolitos que proporcionan información fitoquímica importante de esta especie, pues hasta el momento eran desconocidos de esta planta y tres compuestos son nuevos, pues no se ha encontrado reportes en la literatura de estos metabolitos en otros géneros.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

En este trabajo se utilizaron disolventes de grado reactivo e industrial y de diferentes polaridades, estos últimos se destilaron en el laboratorio. El proceso de secado de los extractos y fracciones se realizó en un evaporador rotatorio marca Büchi 461 con un baño de agua y una bomba de alto vacío (40 °C, 70 mm de presión).

CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD)

El análisis cualitativo de los compuestos, presentes se realizó en placas de cromatografía en capa delgada con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 (GF_{254}, tamaño de partículas 0.015-0.040 mm, Merck). La separación de los compuestos por cromatografía en capa delgada se observó bajo luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm), además se emplearon reveladores químicos, como el ácido fosfomolíbdico (disolución de 4% de ácido fosfomolíbdico con trazas de sulfato cérico en H_2SO_4 al 5%) y óleum [disolución de ácido sulfúrico, ácido acético glacial y agua, (8:32:160)], las placas fueron impregnadas con alguna de las disoluciones y posteriormente calentadas para su revelado.

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA (BMR-2a)

Los compuestos de la fracción hexánica se analizaron en CCD, las cuales se eluyeron con los sistemas hexano/acetona (Hx/An) 7:3 y 8:2, sistemas previamente reportados en la literatura (Caamal-Fuentes, 2012) para corroborar la presencia del compuesto bonediol. Además, se realizaron diferentes placas de esta fracción para encontrar el sistema de

disolventes más adecuado en el que se observa una mejor separación de los compuestos.

Las fracciones se purificaron por medio de la técnica de cromatografía en columna por exclusión molecular, por gravedad, columna flash y placa preparativa.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Cuando se realizó la técnica de cromatografía en columna por gravedad (CCG) se utilizó gel de sílice 60 Å de 70-230 mallas (Sigma-Aldrich).

En la cromatografía en columna por exclusión molecular se utilizó el polímero de Sephadex LH-20. Esta técnica permite la separación de los compuestos por medio de su tamaño molecular, siendo útil para separar péptidos, lípidos, terpenos entre otros compuestos (Braithwaite y Smith, 1999). Se empleó una columna de 75 cm de longitud con 43 cm de altura y 2.5-3 cm de diámetro para la fracción BMR-3e (0.390 g de muestra) y para las demás fracciones se utilizaron columnas de 3-3.5 cm de diámetro (1 g de muestra).

Para la cromatografía en columna tipo flash (CCF) se requirió gel de sílice de 60 Å con un tamaño de partícula de 40-63 μm (230-400 mallas, Sigma-Aldrich). Esta técnica hace posible la separación de mezclas mediante presión con un flujo de elución de 2 pulgadas por min. El compuesto que se desea separar debe tener un R_f de al menos 0.35 (Majors y Enzweiler, 1988). La distancia que recorre la muestra es conocido como factor de retención o retardo (R_f) y se define como la distancia recorrida de la muestra desde la línea de origen (línea base donde se aplicó la muestra) entre la distancia que recorrió el disolvente, nombrado como frente del disolvente; se desea un R_f entre 0.30-0.50 (Smith y Feinberg, 1979; Abbott y Andrews, 1977). La técnica de placa preparativa es ideal para la purificación de un compuesto si se dispone de poca cantidad de muestra, el principio es el mismo que la CCD. Se utilizaron placas con gel de sílice 60 F_{254}, espesor de 250 µm, tamaño de partícula de 10 a12 µm, 20 × 20 cm, Merck.

CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

La pureza de cada compuesto se determinó mediante un análisis de CG que permite la separación y análisis cuantitativo de compuestos orgánicos volátiles. Los cromatogramas

fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con un detector de ionización de flama (flame ionization detector, FID), equipado con una columna HP-5, con las condiciones de corrida: 180 °C durante 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C por 25 min, velocidad de flujo 1 mL/min, y como gas acarreador se empleó nitrógeno.

Las estructuras de los compuestos se determinaron con el apoyo de técnicas espectroscópicas de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-^{1}H) y carbono (RMN-^{13}C), incluyendo experimentos de una dimensión (DEPT) y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), así como espectrometría de masas de baja resolución (CG-EM). El peso molecular exacto y la formula molecular se determinó mediante espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-EM o EM-FAB).

ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO (IR)

Técnica espectroscópica en la cual se aplica un tipo de radiación electromagnética, siendo en este caso la radiación infrarroja (Silverstein *et al*., 2005). Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrofotómetro Nicolet 8700 (FT-IR), de la marca Thermo Scientific, y las muestras se analizaron en pastillas de bromuro de potasio (KBr).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (CG-EM)

La espectrometría de masas (EM) proporciona información del peso molecular del compuesto de interés y los diferentes fragmentos separados en relación a su masa/carga (*m/z*) (Watson y Sparkman, 2007). Para el análisis de cada compuesto en EM de baja resolución se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector másico 5975B, ambos de la marca Agilent Technologies, usando una columna de (5% fenil) metilpolisiloxano como fase estacionaria, de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.5 µm de grosor de la película estacionaria, inyección tipo split, temperatura del inyector 290 °C, temperatura del auxiliar 280 °C, condiciones de corrida: 180 °C × 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C por 30 min, velocidad de flujo 1 mL/min, y como gas portador se empleó helio.

TÉCNICA DE SILILACIÓN

Existen determinados compuestos que por su naturaleza no se logran detectar en CG, porque no son volátiles, son térmicamente inestables o por estar presentes ciertos grupos en la molécula (OH, COOH, NH), quedando retenidos en la columna e imposibilitando de esta manera ser detectados por el equipo. La derivatización es necesaria para facilitar la detección de la molécula. La técnica de sililación es la más usada, consiste en hacer reaccionar los grupos –OH presentes en el compuesto con trimetilsilil (TMS) o *t*-butilsililo (TBDS). El compuesto BMR-10d1 se hizo reaccionar (0.5 mg) con una mezcla en proporción 1:1 durante 10 min con 50 µL de piridina anhídra (C_5H_5N, 99.8%) de la marca sigma Aldrich y 50 µL de BSTFA+TMCS, 99:1 (Sylon BFT) para después inyectarlo al CG-EM.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (EM)

Las muestras BMR-5g1, BMR-7k1 y BMR-14f1 se enviaron a la Fundación Medina en Granada, España para el análisis en HPLC-EM, con un equipo de la marca Agilent 1200 (Santa Clara, CA), utilizando una columna Zorbax SB-C8 (2.1 × 30 mm), mantenida a 40 ºC y con una velocidad de flujo de 300 µL/min acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Maxis HR-QTOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). El análisis de las muestras BMR-11a1 y BMR-10d1 se realizó en la Facultad de Química (UADY) mediante la técnica EM-FAB, en un espectrómetro de masas de alta resolución GCMate II de la marca Jeol.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los estudios de RMN de los compuestos BMR-5g1, BMR-10d1 y BMR-11a1 ($CDCl_3$) fueron realizados en la Facultad de Química (UADY) con un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker Avance Ultrashield 400 (400 MHz), con una sonda dual de 5 mm. Los compuestos BMR-7k1 y BMR-14f1 (Pyr-d_5), fueron obtenidos con el espectrómetro de RMN Varian/Agilent Premium Compact 600 MHz (14.1 T), con módulo de gradiente de campo pulsado y sonda de 5 mm ^{1}H-^{19}F/^{15}N-^{31}P en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) de Mérida.

Los experimentos de RMN de protón (RMN-^{1}H) proporcionan información sobre el tipo de acoplamiento que presenta un hidrógeno en relación con sus hidrógenos vecinos, permitiendo observar la multiplicidad de dicho protón, constante de acoplamiento (*J*) y el desplazamiento en ppm en las diferentes regiones del espectro. El espectro de RMN-^{13}C nos indica el número total de carbonos presentes en la molécula. El análisis de RMN DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, por sus siglas en inglés) nos indica el número de metinos y metilos (CH, CH_3) presentes en la molécula bajo análisis, los cuales se observan como señales positivas (hacia arriba del espectro) y del número de metilenos (CH_2), como señales negativas, y el espectro de DEPT-90 proporciona señales de todos los grupos metinos (CH) presentes en la molécula. COSY (Correlation Spectroscopy, por sus siglas en inglés) es una técnica bidimensional homonuclear que observa el acoplamiento entre un protón con su protón vecino. Entre los experimentos bidimensionales heteronucleares se encuentran el HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), el primero se basa en la correlación protón-carbono a un enlace de distancia; mientras que el experimento HMBC permite observar la correlación que existe entre protón-carbono a dos, tres o hasta cuatro enlaces de distancia (Silverstein *et al*., 2005).

2.2.2. MATERIAL VEGETAL

La especie *B. macrocarpa* se identificó con ayuda del taxónomo Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY); un ejemplar fue depositado en el herbario del CICY con el número de voucher P. Simá 3561. La raíz de esta especie (Figura 2.1) se colectó en octubre de 2013 en Telchac Puerto, Yucatán. Se dejó secar a una temperatura ambiente y se cortó en pequeños trozos de 1-2 cm de grosor aproximadamente.

Figura 2.1 Raíz de *Bonellia macrocarpa*.

2.2.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

Se realizó la extracción sólido-líquido con 10 Kg de la raíz de *B. macrocarpa* mediante maceración (2×) con metanol (MeOH) y se dejó reposar durante 72 h con el disolvente, posteriormente se eliminó el MeOH utilizando el evaporador rotatorio hasta la reducción del volumen mínimo para posteriormente dejar secar a temperatura ambiente. El extracto metanólico crudo seco (BMR-1a) fue sometido a una serie de particiones líquido-líquido (cuatro procesamientos masivos) con el fin de procesar todo el extracto crudo con diferentes disolventes orgánicos de polaridad creciente: hexano (Hx), diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt).

2.2.4. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES POR PARTICIÓN

Para la extracción por polaridad (líquido-líquido), una cantidad (150 g) de extracto crudo seco se disolvió en MeOH:H_2O (1:3) la cual fue puesta en un embudo de separación, posteriormente se añadió el doble del disolvente hexano, la disolución se agitó a temperatura ambiente por 5 min y se dejó reposar por una hora, separándose en dos fases. Posteriormente, este procedimiento se repitió dos veces más, pero en esta ocasión a la fase acuosa se le agregó Hx en proporción 1:1. La fracción hexánica se concentró en un evaporador rotatorio. Para la obtención de las fracciones de diclorometano y acetato de etilo se realizó el mismo procedimiento, obteniéndose al final también una fracción

acuosa. Esta metodología se repitió hasta que todo el extracto crudo seco se procesó por completo y se obtuvieron las correspondientes fracciones Hx, CH_2Cl_2, AcOEt y acuosa (BMR-2a, BMR-2b, BMR-2c y FA, respectivamente).

2.2.5. FRACIONAMIEMTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (CLV) DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA (BMR-2a)

La cromatografía líquida al vacío (CLV) es una técnica que permite la separación de mezclas de compuestos mediante la aplicación de vacío, además de que se puede procesar mayor cantidad de muestra (Coll y Bowden, 1986; Pelletier *et al*., 1986).
La fracción BMR-2a se purificó mediante una CLV con los sistemas Hx/CH_2Cl_2 (9:1-4:6) y Hx/An (9:1-5:5) porque se observó una mejor separación; las fracciones obtenidas se agruparon de acuerdo a la similitud de sus compuestos observada por CCD, y se concentraron en un evaporador rotatorio, obteniéndose 11 fracciones finales asignadas con los códigos BMR-3a – BMR-3k. Estas fracciones fueron evaluadas en el bioensayo de citotoxicidad contra la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

2.2.6. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES CON MAYOR ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Las fracciones con alta actividad citotóxica fueron sometidas nuevamente a columnas cromatográficas para su purificación. Las subfracciones resultantes fueron evaluadas mediante el bioensayo de citotoxicidad con SRB para determinar aquellas que presentaron mayor actividad, las cuales se eligieron para seguir trabajando hasta el aislamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad.

Las fracciones BMR-3e, BMR-3f, BMR-3g y BMR-3h debido a que mostraron alta actividad citotóxica se subfraccionaron mediante una cromatografía en columna por exclusión molecular con Sephadex LH-20, el polímero se dejó reposar en el sistema Hx/CH_2Cl_2/MeOH 2:1:1 durante toda la noche, posteriormente se empacó la columna cromatográfica.

2.3. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS DE LAS FRACCIONES BMR-3e – BMR-3h

Las fracciones BMR-3e – BMR-3h que se trabajaron hasta aislar los compuestos se eligieron con base en tres criterios: que tuvieran mayor porcentaje de mortalidad sobre la línea cancerígena evaluada, buena cantidad de muestra para procesar y menor complejidad (de acuerdo a la CCD).

Se realizaron diferentes técnicas cromatográficas para separar y aislar los compuestos; la metodología para la obtención de cada uno de ellos se muestra en la Figura 2.2 (los compuestos se enumeraron conforme se aislaron). Las subfracciones originadas de la fracción primaria BMR-3e no se pudieron seguir trabajando por el poco rendimiento y complejidad de cada una, sin embargo, un compuesto (BMR-5g1), según el análisis de un cromatograma obtenido en el cromatógrafo de gases, se encontraba presente en otra fracción primaria (fracción BMR-3f).

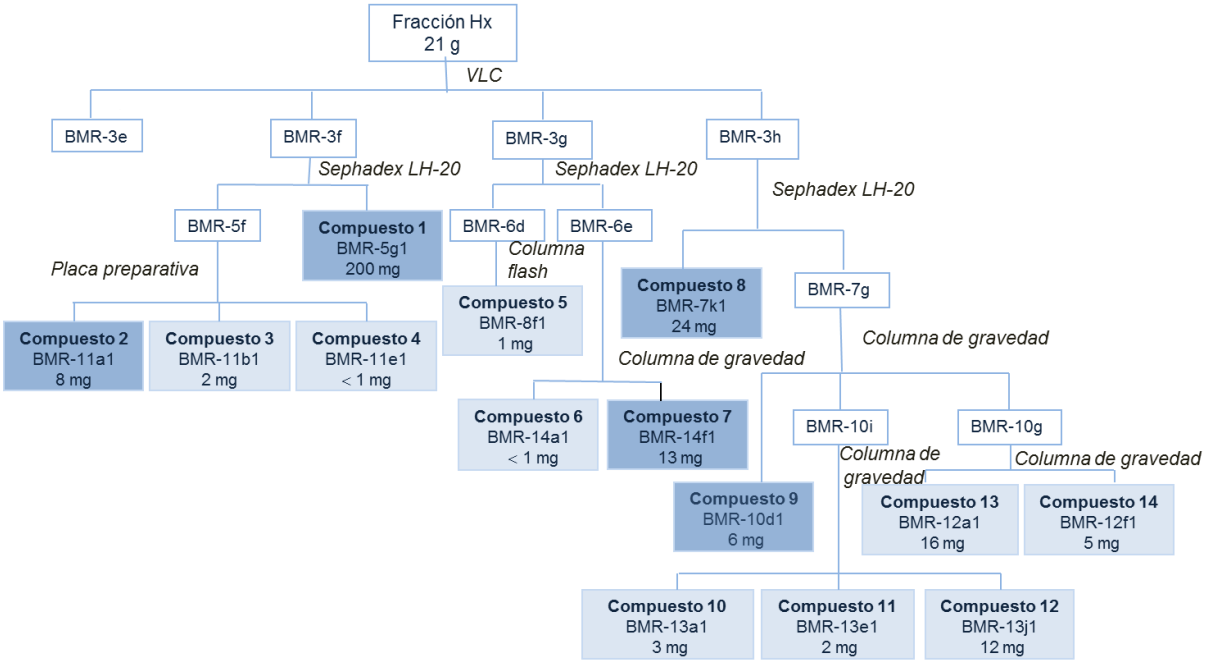


Figura 2.2 Diagrama de la obtención de compuestos puros de la fracción hexánica de la raíz de *B. macrocarpa*.

Catorce compuestos fueron aislados, de los cuales cinco de ellos se eligieron por tener la cantidad adecuada de muestra (mayor de 5 mg) para las evaluaciones citotóxicas y antiproliferativas en distintas líneas celulares cancerígenas, así como el análisis espectroscópico para determinar su estructura molecular. Sin embargo, los compuestos elegidos tuvieron escasos rendimientos, menores de un 20%, BMR-5g1 (18.9%), BMR-7k1 (2.4%), BMR-10d1 (0.6%), BMR-11a1 (0.8%) y BMR-14f1 (1.3%). Los compuestos 12 (BMR-13j1) y 13 (BMR-12a1) resultaron ser ácidos grasos y el compuesto 14 (BMR-12f1) un triterpeno con una cantidad de muestra insuficiente, razón por la cual se decidió no someterlos a análisis.

2.3.1. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO I (BMR-5g1)

La fracción primaria BMR-3f (1.06 g) se separó mediante una columna por exclusión molecular con el polímero Sephadex LH-20 utilizando el sistema Hx/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1), resultando en un total de once fracciones; de la fracción siete, marcada como BMR-5g se obtuvo el compuesto nombrado con este mismo código.

Compuesto I, BMR-5g1 (3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol), aceite color ámbar (200 mg), R_f = 0.40 (Hx/CH_2Cl_2, 4:6), soluble en CH_2Cl_2. **IR** $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 3424, 1590, 1452 y 824. **RMN-^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.31 (1H, s, H-4), 6.30 (1H, s, H-6), 4.81 (1H, s, OH), 3.81 (3H, s, OCH_3), 2.51 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, 7.8, H-1'), 2.08 (3H, s, $\underline{CH_3}$Ph), 1.59 (2H, m, H-2'), 1.32 (2H, m, H-3' y H-4'), 0.90 (3H, t, *J* = 6.9, H-5'). **RMN-^{13}C**: (Tabla 2.3). **CG-EM**: t_r = 7.55 min, *m/z* 208 ($[M]^+$, 36) 179 (2), 152 (100), 121 (7), 108 (5), 91 (9), 77 (8) y 65 (2). **EMAR**: *m/z* 208.1461 (calculado para $C_{13}H_{20}O_2$, *m/z* 208.2998).

2.3.2. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO II (BMR-7K1)

El segundo metabolito se obtuvo de la fracción primaria BMR-3h (se procesó 1.0 g de muestra) de la que se separaron 12 fracciones mediante la técnica por exclusión molecular (Hx/CH_2Cl_2/MeOH, 2:1:1), la fracción 11 fue la que contenía el compuesto puro.

Compuesto II, BMR-7k1 (3,5-dihidroxi-1-metil-2,2-dimetil-benzociclobutano), compuesto semisólido viscoso de color café (24 mg), R_f = 0.42 (CH_2Cl_2/An, 9:1), soluble en CH_2Cl_2. **IR** $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 3374, 2927, 2851 y 1615. **RMN-^{1}H** (600 MHz, Pyr-d_5): δ 6.11 (1H, s, H-4), 5.86 (1H, s, H-6), 2.76 (3H, s, H-1'), 1.96 (3H, s, H-2'), 1.04 (1H, m, H-1), 0.74 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-3'). **RMN-^{13}C** (150 MHz, Pyr-d_5): 158.1 (C-3), 157.7 (C-5), 139.3 (C-6a), 121.4 (C-3a), 108.0 (C-6), 102.0 (C-4), 31.7 (C-1), 31.1 (C-2'), 27.6 (C-1'), 22.1 (C-3'), 19.3 (C-2). **CG-EM**: t_r = 6.21 min, *m/z* 178 ($[M]^+$, 64) 163 (100), 135 (12), 115 (11), 94 (9), 91 (12), 77 (11), 69 (10) y 65 (4). **EMAR**: *m/z* 178.0984 (calculado para $C_{11}H_{14}O_2$, *m/z* 178.2304).

2.3.3. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO III (BMR-10d1)

Para el aislamiento de BMR-10d1 se procesó la fracción primaria BMR-3h (1.0 g) con Sephadex LH-20 (Hx/CH_2Cl_2/MeOH, 2:1:1), resultando en doce fracciones, se realizó una columna por gravedad para la subfracción BMR-7g (133 mg) con el sistema Hx/AcOEt (8.5:1.5), resultando en nueve subfracciones, de las cuales en la número cuatro asignada como BMR-10d1 se observó una sola mancha.

Compuesto III, BMR-10d1 [3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol], semi-líquido de color amarillo-café (6 mg), R_f = 0.39 (Hx/AcOEt, 7:3), soluble en CH_2Cl_2. **IR** $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 3400, 1613, 1595 y 1158. **RMN-^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.31 (1H, s, H-4), 6.26 (1H, s, H-6), 6.23 (1H, s, H-2), 3.76 (3H, s, 3-OCH_3), 2.50 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 1.58 (2H, q, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 1.28 (2H, m, H-3'), 1.24 (11H, s, H-4', H-6', H-7', H-8'). **RMN-^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$): δ 160.9 (C-3), 156.7 (C-1), 145.9 (C-5), 108.0 (C-6), 106.8 (C-4), 98.8 (C-2), 55.3 (OCH_3), 36.1 (C-1'), 31.2 (C-2'), 31.1 (C-5'), 29.7 (C-6', C-7' y C-8'), 29.6 (C-4'), 29.4 (C-3'). **CG-EM**: t_r = 19.72 min., *m/z* 308 ($[M]^+$+Si, 2), 222 (15), 210 (100), 195 (9) y 73 (18). **EMAR**: *m/z* 236.1780 (calculado para $C_{15}H_{24}O_2$, *m/z* 236.1776).

2.3.4. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO IV (BMR-11a1)

La fracción primaria BMR-3f (1.0 g) se separó mediante una columna cromatográfica con Sephadex LH-20 (Hx/CH_2Cl_2/MeOH, 2:1:1). De las once fracciones obtenidas, se purificó la número seis, marcada como BMR-5f en una placa preparativa con 21 mg de muestra,

utilizando el sistema Hx/AcOEt (9:1), corriéndola dos veces para luego recuperar cada compuesto, uno de ellos fue el BMR-11a1.

Compuesto IV, BMR-11a1 (1,3,5,6-tetrametoxi-8-metilnaftaleno), semi-sólido anaranjado-rojizo (8 mg), R_f = 0.42 (Hx/AcOEt, 9:1), soluble en CH_2Cl_2. **IR** $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 2962, 2935, 1620 y 1600. **RMN-^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.99 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-4), 6.80 (1H, s, H-7), 6.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 3.95 (3H, s, 6-OCH_3), 3.93 (3H, s, 1-OCH_3), 3.91 (3H, s, 5-OCH_3), 3.87 (3H, s, 3-OCH_3), 2.79 (3H, s, 8-CH_3). **RMN-^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$): δ 159.5 (C-3), 158.2 (C-1), 148.3 (C-6), 139.8 (C-5), 132.3 (C-8), 132.2 (C-10), 116.9 (C-9), 114.2 (C-7), 96.7 (C-2), 91.9 (C-4), 60.5 (5-OCH_3), 56.4 (6-OCH_3), 55.3 (1-OCH_3), 55.2 (3-OCH_3), 24.9 (Ph-$\underline{CH_3}$). **CG-EM**: tr = 12.98 min, *m/z* 262 ($[M]^+$, 100), 247(100), 219 (94), 204 (100), 189 (17), 161 (24), 115 (19), 77 (9) y 51 (4). **EMAR**: *m/z* 262.1211 (calculado para $C_{15}H_{18}O_4$, *m/z* 262.3048).

2.3.5. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO V (BMR-14f1)

Se realizó una columna de exclusión molecular de Sephadex LH-20 (Hx/CH_2Cl_2/MeOH, 2:1:1) para la fracción primaria BMR-3g (1.0 g); de esta columna se obtuvieron 10 fracciones. La quinta subfracción BMR-6e (320 mg) se separó con una columna de gravedad con el sistema Hx/AcOEt (7.8:2.2), obteniéndose once subfracciones, de las cuales en la fracción seis se tenía el triterpeno BMR-14f1.

Compuesto V, BMR-14f1 (3β,16α-dihidroxi-protoprimulagenina A), cristales blancos (13 mg), R_f = 0.32 (Hx/AcOEt, 8:2), soluble en CH_2Cl_2-MeOH (1:1). **IR** $\nu_{máx}$ cm^{-1}: 3449, 3360, 2964, 2922 y 1232. **RMN-^{1}H** (600 MHz, Pyr-d_5): δ 4.23 (1H, s, H-16), 3.64 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-28), 3.49 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-3), 3.35 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, H-28), 2.81 (2H, m, H-19), 2.58 (2H, H-15), 2.29 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-21), 2.13 (2H, t, *J* = 10.9, 12.9 Hz, H-22), 1.90 (2H, m, H-2), 1.79 (2H, d, *J* = 12.9 Hz, H-1), 1.74 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, H-9), 1.64 (2H, t, *J* = 10.0 Hz, H-7), 1.57 (3H, s, H-27), 1.52 (1H, d, *J* = 14.2 Hz, H-21), 1.42 (3H, s, H-26), 1.35 (5H, m, H-6, H-11 y H-18), 1.29 (2H, m, H-12), 1.25 (3H, s, H-23), 1.25 (3H, s, H-29), 1.10 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-30), 0.98 (3H, s, H-24), 0.86 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-5). **RMN-^{13}C** (150 MHz, Pyr-d_5): Tabla 2.7. **CG-EM**: tr = 25.94 min, *m/z* 458 ($[M]^+$, 50), 440 (7), 385

(40), 249 (33), 219 (81), 207 (88), 189 (100), 175 (39), 135 (56), 95 (77) y 55 (71). **EMAR**: *m/z* 458.3753 (calculado para $C_{30}H_{50}O_3$, *m/z* 458.7232).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. EXTRACCIÓN

Como resultado de la extracción sólido-líquido de la raíz de *B. macrocarpa* con MeOH se obtuvieron 661.7 g del extracto crudo seco, el cual fue procesado por completo mediante una partición líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente.

De la fracción Hx se obtuvieron 21 g, los cuales se subfraccionaron mediante distintas técnicas de cromatografía en columna.

2.4.2. CARACTERISTICAS DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA

Al analizar la fracción hexánica en CCD con los sistemas Hx/An (7:3 y 8:2) se observó una mancha rojiza a luz visible (R_f = 0.48 y 0.33, respectivamente), característica del compuesto bonediol (Figura 2.3).

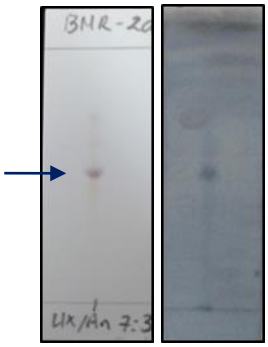


Figura 2.3 Comparación en CCD corrida en el sistema Hx/An (7:3) de la fracción hexánica con el bonediol (R_f = 0.48). Nota: Imagen (derecha) obtenida de Caamal-Fuentes (2012).

Debido a que se observó la presencia del compuesto bonediol, el cual ya había sido aislado en un trabajo anterior (Caamal-Fuentes *et al*., 2011a), además de otros metabolitos y que mostró tener actividad citotóxica, se decidió seguir con el estudio de la

fracción hexánica de la raíz de *B. macrocarpa*. De esta fracción se obtuvieron otros compuestos, los cuales también fueron evaluados en el bioensayo de actividad citotóxica.

2.4.2.1. PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA

Se realizó una columna líquida al vacío (CLV) con los sistemas Hx/CH_2Cl_2 (9:1-4:6) y Hx/An (9:1-5:5), porque se observó una mejor separación de los compuestos así como el avance de los mismos al ir incrementando la polaridad. Las fracciones se reunieron en 11 de acuerdo a su perfil en CCD (Tabla 2.1).

Cada fracción fue posteriormente evaluada para medir su actividad citotóxica en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa.

Tabla 2.1 Fracciones obtenidas mediante la técnica VLC de la fracción hexánica de *B. macrocarpa*.

Código	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
BMR-3a	0.057	0.27
BMR-3b	0.052	0.24
BMR-3c	0.288	1.37
BMR-3d	1.390	6.60
BMR-3e	0.422	2.00
BMR-3f	1.060	5.00
BMR-3g	7.603	36.20
BMR-3h	3.350	15.90
BMR-3i	2.671	12.70
BMR-3j	2.948	14.00
BMR-3k	0.107	0.50

2.4.2.2. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES ACTIVAS

Las fracciones con mayor actividad citotóxica fueron BMR-3e, BMR-3f, BMR-3g y BMR-3h (Capítulo III, sección 3.3.1, Tabla 3.1), las cuales se eligieron para seguir trabajando y subfraccionando hasta el aislamiento de compuestos.

Cuando se compararon las fracciones con la técnica de CCD, en la fracción BMR-3g se observó la mancha característica del compuesto bonediol (Figura 2.4).

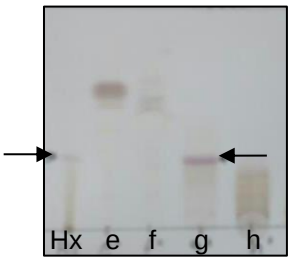


Figura 2.4 CCD de las fracciones con alta actividad comparadas con la fracción hexánica en el sistema Hx/An (8:2). El compuesto bonediol se observa en la banda marcada con la letra g correspondiente a la fracción BMR-3g.

Las cuatro fracciones se procesaron por medio de una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex LH-20 y se reunieron de acuerdo a su semejanza observada en CCD.

Se obtuvieron 11 subfracciones de BMR-3e como resultado de procesar 0.390 g de muestra; de BMR-3f se procesó 1.06 g y se reunieron en 11 subfracciones; 10 subfracciones se colectaron de BMR-3g (1 g de muestra); y por último de BMR-3h (1 g de muestra) se obtuvieron 12 subfracciones, un total de 44 subfracciones. En la Tabla 2.2 se especifica el código asignado, la cantidad en mg y el rendimiento de cada una.

Tabla 2.2 Cantidad obtenida de las 44 subfracciones de las cuatro fracciones originales con mayor actividad citotóxica de la fracción hexánica.

BMR-3e			BMR-3f			BMR-3g			BMR-3h		
Subfracción	mg	%	Subfracc.	mg	%	Subfracc.	mg	%	Subfracción	mg	%
BMR-4a	5	1.3	**BMR-5a**	8	0.8	**BMR-6a**	5	0.5	**BMR-7a**	152	15.2
BMR-4b	10	2.6	**BMR-5b**	106	10.0	**BMR-6b**	64	6.4	**BMR-7b**	123	12.3
BMR-4c	189	48.5	**BMR-5c**	91	8.6	**BMR-6c**	216	21.6	**BMR-7c**	19	1.9
BMR-4d	17	4.4	**BMR-5d**	8	0.8	**BMR-6d**	213	21.3	**BMR-7d**	50	5.0
BMR-4e	4	1.0	**BMR-5e**	47	4.4	**BMR-6e**	435	43.5	**BMR-7e**	145	14.5
BMR-4f	6	1.5	**BMR-5f**	25	2.4	**BMR-6f**	266	26.6	**BMR-7f**	103	10.3
BMR-4g	139	35.6	**BMR-5g**	30	2.8	**BMR-6g**	39	3.9	**BMR-7g**	133	13.3
BMR-4h	34	8.7	**BMR-5h**	74	7.0	**BMR-6h**	11	1.1	**BMR-7h**	129	12.9
BMR-4i	8	2.1	**BMR-5i**	15	1.4	**BMR-6i**	15	1.5	**BMR-7i**	12	1.2
BMR-4j	1	0.3	**BMR-5j**	8	0.8	**BMR-6j**	21	2.1	**BMR-7j**	44	4.4
BMR-4k	5	1.3	**BMR-5k**	6	0.6				**BMR-7k**	24	2.4
									BMR-7L	55	5.5

En las subfracciones BMR-6e y BMR-6f (provenientes de la fracción BMR-3g) se observa la mancha rojiza a luz visible característica del bonediol (Figura 2.5).

Figura 2.5 Subfracciones en donde se observa el bonediol, sistema Hx/An (7:3) (R_f = 0.48).

2.4.3. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO I (BMR-5g1)

Para evitar el aislamiento de compuestos ya conocidos, las fracciones se compararon con diversas referencias disponibles en el laboratorio. Las referencias que se utilizaron fueron: lupeol, *epi*-lupeol, β-sitosterol, mezcla de α- y β-amirina, betulina, friedelina, ácido ursólico y esmilagenina.

Del compuesto I, BMR-5g1 (inestable, Figura 2.6), se obtuvieron 200 mg con un aspecto aceitoso de color ámbar soluble en diclorometano (CH_2Cl_2). Al compararlo con las diferentes referencias no fue semejante a ninguna. En placa se observa bajo luz UV de longitud de onda corta (λ = 254 nm), y en placa revelada con óleum se observa de color rosa.

En el espectro de masas (Figura 2.7) muestra un ion molecular $[M]^+$ de 208 *m/z*, una señal de 77 *m/z* que es característica del grupo fenilo, una señal de 91 *m/z* perteneciente al ion tropilio, además de una señal a 108 *m/z* que sugiere un fragmento hidroximetilbenceno y pérdidas de grupos metoxilo (M-31) y etilo (M-29). En el espectro de IR (Figura 2.8) se detectó una banda ancha a 3424 cm^{-1} característica de un grupo hidroxilo, bandas a 1590 indicativas de enlaces sp^2 conjugados ($\nu_{C=C}$) y a 824 cm^{-1} sugerente de la presencia de un anillo de benceno, corroborando lo observado en el espectro de masas, además de una señal a 1452 cm^{-1} que aparece por los enlaces

sencillos sp^3 (ν_{C-H}). En el espectro de RMN-^{1}H (Figura 2.9) se confirma la presencia de protones aromáticos, observando dos señales simples (δ 6.30 y 6.31), en RMN-^{13}C (Figura 2.10) se corroboran los seis carbonos sp^2 del anillo de benceno (δ 100-150) y seis señales correspondientes a carbonos sp^3 (δ <50), una de ellas pertenece a un grupo metilo unido a un fenilo la cual se distingue en el espectro de protón apareciendo como una señal simple (δ 2.08), se observa además una señal perteneciente a un grupo metoxilo (δ_H 3.81 y δ_C 55.6). En el experimento DEPT-135 se observaron tres señales de metilos (CH_3), dos metinos (CH) y cuatro grupos metilenos (CH_2).

Los datos espectroscópicos concuerdan con lo reportado por Chang *et al*. (2011) para el compuesto conocido como 3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol (Figura 2.6 y Tabla 2.3), un compuesto análogo del resorcinol aislado de la raíz de *Ardisia cornudentata*.

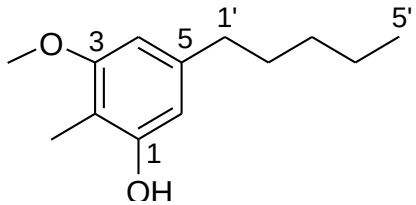


Figura 2.6 Compuesto 3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol (BMR-5g1, compuesto I).

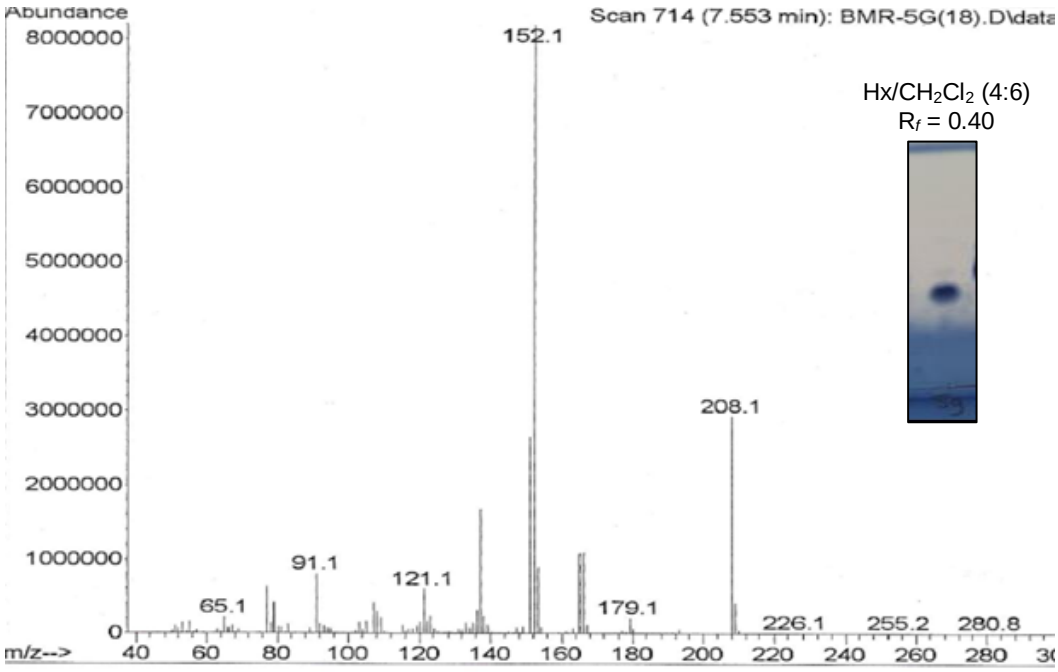


Figura 2.7 Espectro de masas (baja resolución, CG-EM) y CCD del compuesto BMR-5g1 revelada con ácido fosfomolíbdico.

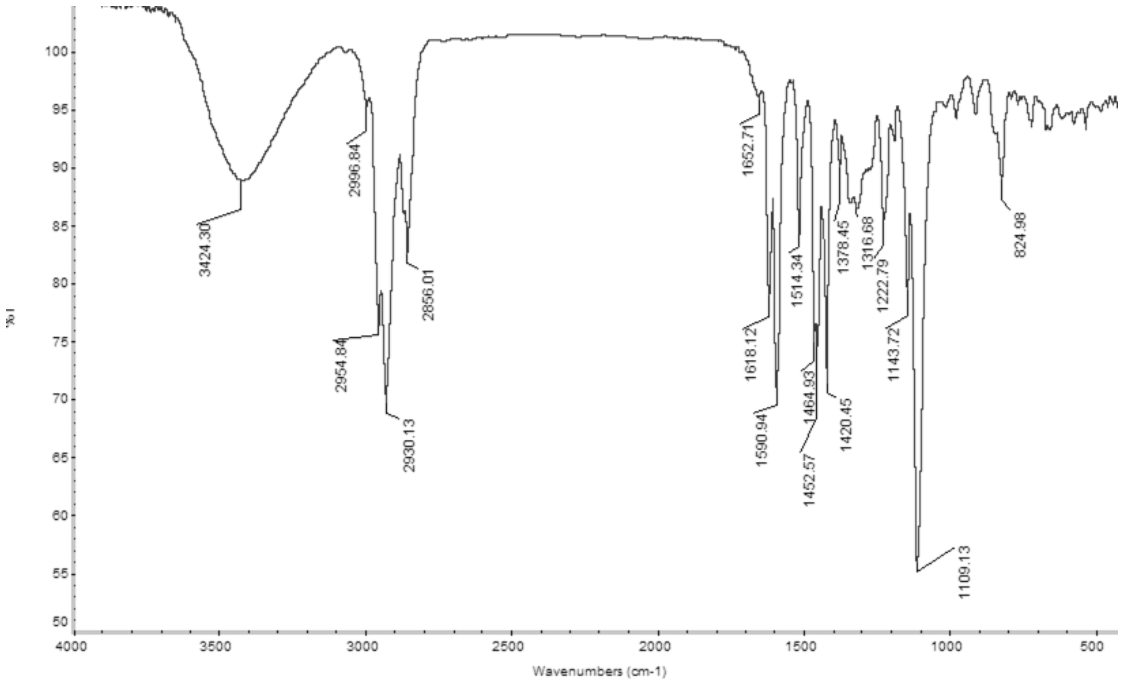


Figura 2.8 Espectro de IR del compuesto BMR-5g1.

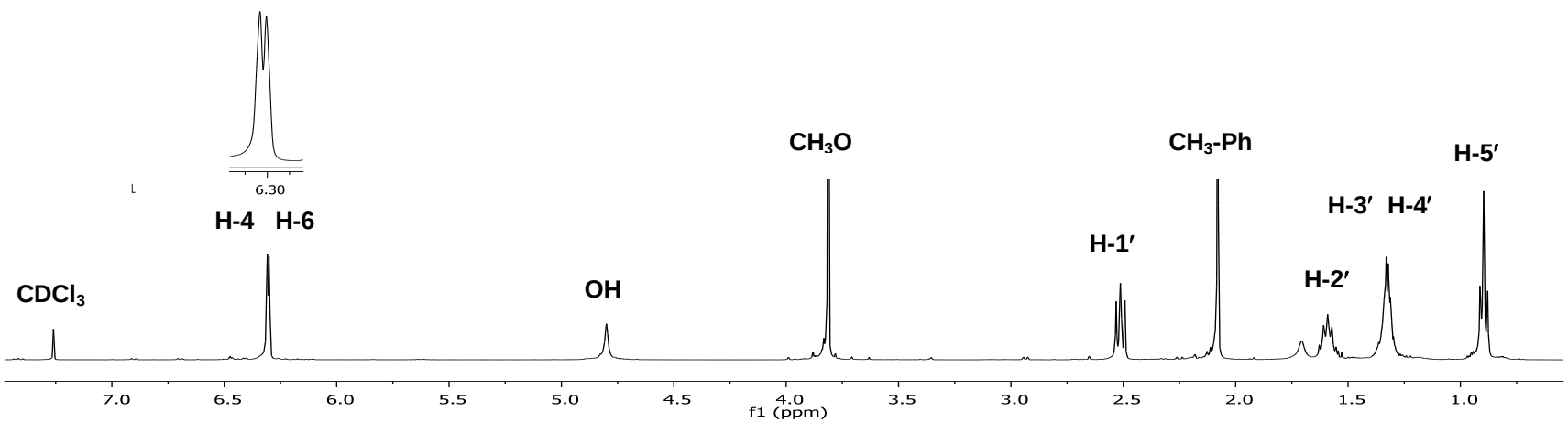


Figura 2.9 Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-5g1 ($CDCl_3$, 400 MHz).

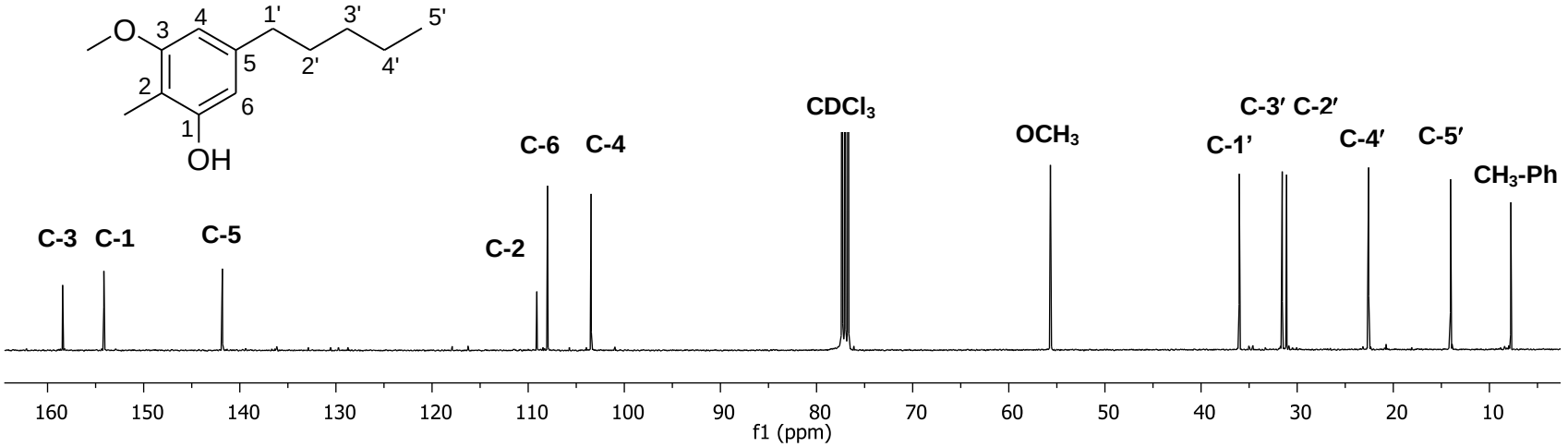


Figura 2.10 Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-5g1 ($CDCl_3$, 100 MHz).

Tabla 2.3 Comparación de las señales de RMN obtenidas del compuesto BMR-5g1 y el 3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol.

Posición		3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol[a]		Compuesto BMR-5g1[b]	
		δ ^{1}H (*J*)	δ ^{13}C	δ ^{1}H (*J*)	δ ^{13}C
1	C	-	154.1	-	154.1
2	C	-	109.1	-	109.1
3	C	-	158.4	-	158.4
4	CH	6.31 (1H, s)	103.4	6.31 (1H, s)	103.4
5	C	-	141.8	-	141.8
6	CH	6.32 (1H, s)	108.0	6.30 (1H, s)	108.0
1'	CH_2	2.52 (2H, t, 7.8)	36.0	2.51 (2H, t, 8.0, 7.8)	36.0
2'	CH_2	1.60 (2H, m)	31.5	1.59 (2H, m)	31.1
3'	CH_2	1.33 (2H, m)	31.1	1.32 (2H, m)	31.5
4'	CH_2	1.33 (2H, m)	22.5	1.32 (2H, m)	22.5
5'	CH_3	0.89 (3H, t, 7.0)	14.0	0.90 (3H, t, 6.9)	14.0
4	OCH_3	3.82 (3H, s)	55.6	3.81 (3H, s)	55.6
2	CH_3-Ph	2.09 (3H, s)	7.7	2.08 (3H, s)	7.7
1	OH	-	-	4.81 (s)	-

Entre paréntesis se especifica la multiplicidad: s = singulete, t = triplete, m = multiplete y la constante de acoplamiento en Hz (*J*).
[a] Señales por Chang *et al*. (2011).
[b] Señales obtenidas en $CDCl_3$ corridas a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente.

2.4.4. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO II (BMR-7k1)

El compuesto II, BMR-7k1, es un compuesto nuevo, no existen reportes en la literatura, tiene un aspecto semisólido viscoso color café, se obtuvieron 24 mg, es soluble en CH_2Cl_2. No se observa en luz UV y se observa en CCD revelada con óleum de un color salmón (rosa-anaranjado), R_f = 0.42 en CH_2Cl_2/An (9:1).

El espectro de masas (Figura 2.11) mostró un ion molecular de 178 *m/z*, con una señal característica del grupo fenilo (77 *m/z*) y ion tropilio (91 *m/z*); los compuestos fenólicos (radical fenólico, 94 *m/z*) tienden a reducir su anillo en uno de cinco miembros (65 *m/z*) señales que también se observan en el espectro, con escisión del grupo etileno (M-28) y del grupo metilo (M-15). El espectro de IR (Figura 2.12) confirma la presencia del grupo hidroxilo, observándose una banda ancha a 3374 cm^{-1}, una banda en la región de la huella dactilar a 829 cm^{-1} que aparece en hidrocarburos aromáticos (ν_{AR-H}) y enlaces sp^2 a 1615 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$). En el estudio de RMN-^{1}H (Figura 2.13) se observa un par de señales simples características de protones aromáticos (δ 6.11 y 5.86) y el espectro de RMN-^{13}C (Figura 2.14) muestra once carbonos, seis señales con desplazamientos mayores de 100 ppm correspondientes a los seis carbonos del anillo de benceno (δ 158.1, 157.7, 139.3, 121.4, 108.0, 102.0) y cinco señales pertenecientes a enlaces sencillos sp^3 (δ 31.7, 31.1, 27.6, 22.1, 19.3).

Por los datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos se sugiere que el compuesto BMR-7k1 es el 3,5-dihidroxi-1-metil-2,2-dimetil-benzociclobutano (Figura 2.14). La estructura propuesta sugiere un metabolito que pertenece a un grupo de compuestos comúnmente conocidos como benzociclobutenos (ciclobutabencenos, ciclobutarenos, etc.) que se caracterizan por su estabilidad termodinámica y valiosas estructuras intermediarias en bloques de construcción en síntesis orgánica, principalmente en la formación de productos policíclicos como alcaloides, esteroides, antraciclinas, por mencionar algunos (Mehta y Kotha, 2001).

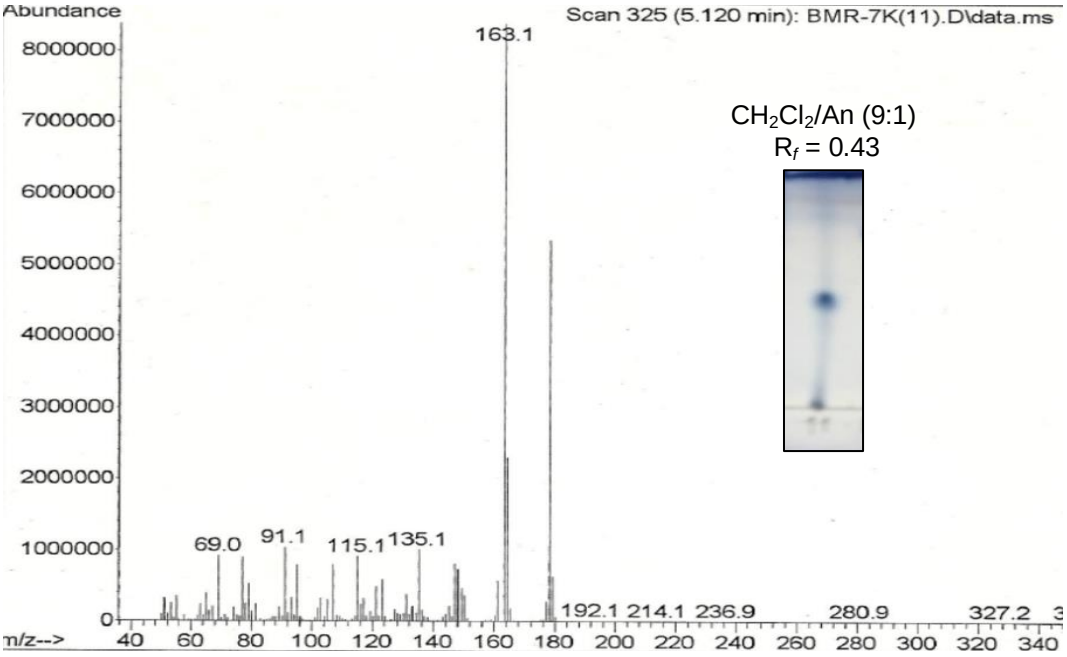


Figura 2.11 Espectro de masas (baja resolución, CG-EM) y CCD del compuesto BMR-7k1 revelada con ácido fosfomolíbdico.

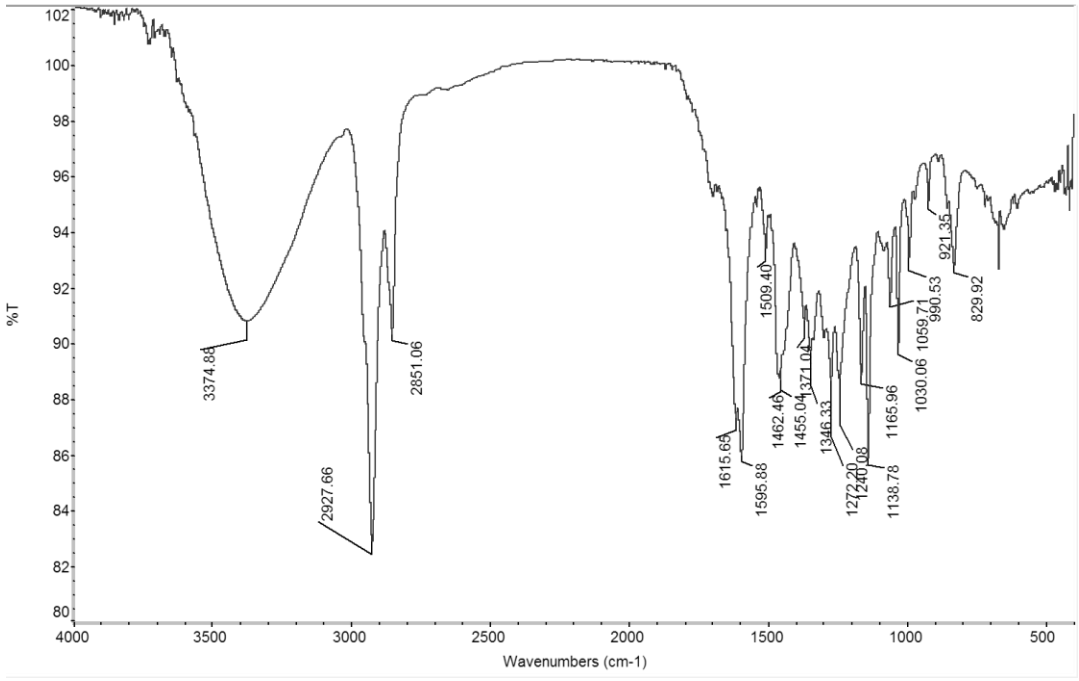


Figura 2.12 Espectro de IR del compuesto BMR-7k1.

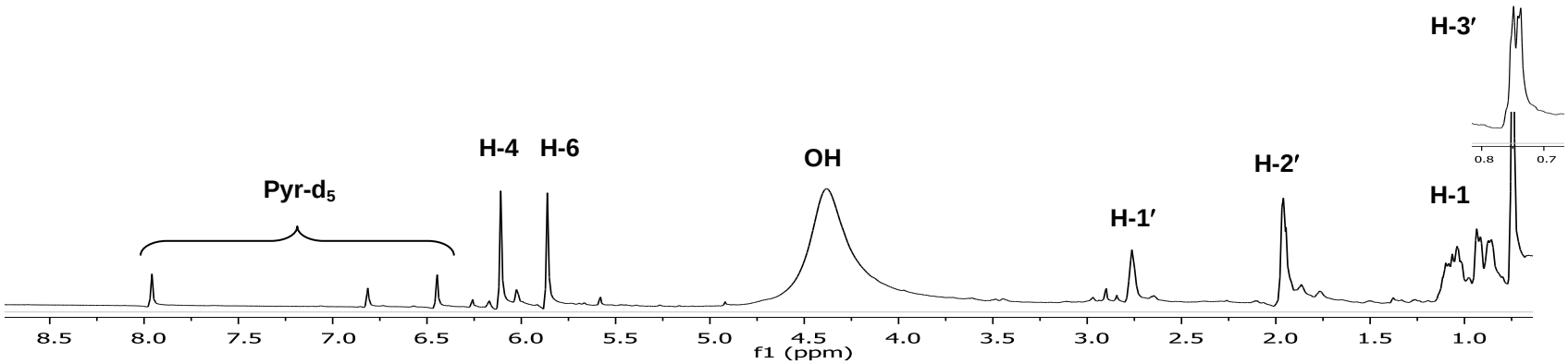


Figura 2.13 Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-7k1 (Pyr-d_5, 600 MHz).

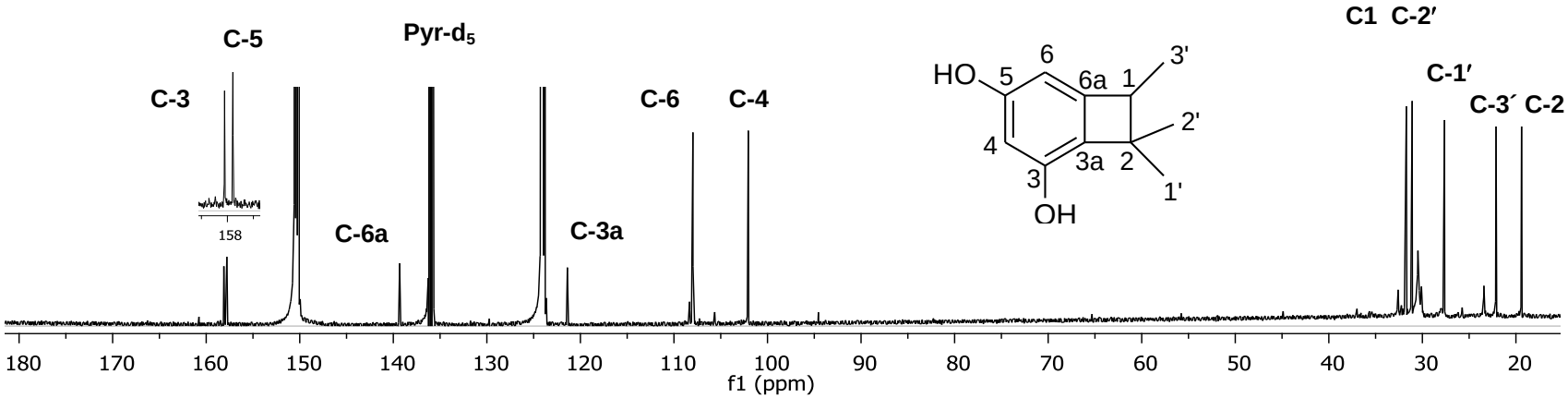


Figura 2.14 Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-7k1 (Pyr-d_5, 150 MHz).

2.4.5. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO III (BMR-10d1)

Para el compuesto III, BMR-10d1 (Figura 2.15), no existen datos reportados en la literatura. Tiene un aspecto semi-líquido de color amarillo-café, se aisló 6 mg y es soluble en CH_2Cl_2. En placa se observa en UV de onda corta (λ = 254 nm) y revelada con óleum se percibe de color rosa (R_f = 0.39, Hx/AcOEt, 7:3). Se determinó la pureza del compuesto en CG por medio de su derivado sililado, obteniéndose un sola señal con t_r = 19.72 min. Por espectrometría de masas se obtuvo un ion molecular de *m/z* 308 del compuesto sililado (señal de 73 *m/z* característico del grupo tetrametilsililo). La banda ancha del IR (Figura 2.16) a 3400 cm^{-1} muestra la presencia de grupos hidroxilo (ν_{O-H}) y de anillo aromático con las bandas a 1613 y 1595 cm^{-1}($\nu_{C=C}$), así como la presencia de enlaces C-O por una banda a 1158 cm^{-1} (ν_{C-O} y ν_{C-C}). Se confirma lo anterior con los espectros de RMN-^{1}H (Figura 2.17) y RMN-^{13}C (Figura 2.18) en los cuales se evidencia también un anillo aromático; en el espectro de protón aparecen tres singuletes (δ 6.23, 6.26, 6.31) correspondientes a los tres protones del benceno y sugerentes de un anillo tri-sustituido, aunado al experimento de RMN-^{13}C donde se observan señales indicativas de sustituyentes de un grupo metoxilo, hidroxilo y una cadena lateral directamente enlazadas al anillo aromático (δ 160.9, 156.7, 145.9, respectivamente), una señal perteneciente a los protones del metoxilo (δ 3.76), lo cual se corrobora con una señal a δ 55.3 en el espectro de carbono, además de otras siete señales (δ <50); sin embargo, una de estas señales de carbono integra para dos carbonos, siendo ocho átomos de carbono los que conforman la cadena lateral. De acuerdo con el ion molecular observado en EMAR de *m/z* 236.1780, su fórmula molecular es $C_{15}H_{24}O_2$.

La información de los desplazamientos obtenidos en cada experimento de resonancia magnética y la correlación nuclear entre sus átomos se encuentra detallado en la Tabla 2.4.

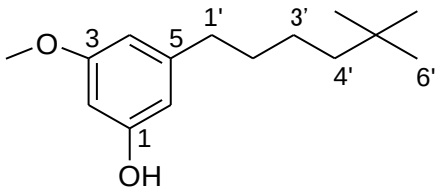


Figura 2.15 Compuesto 3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol (compuesto III, BMR-10d1).

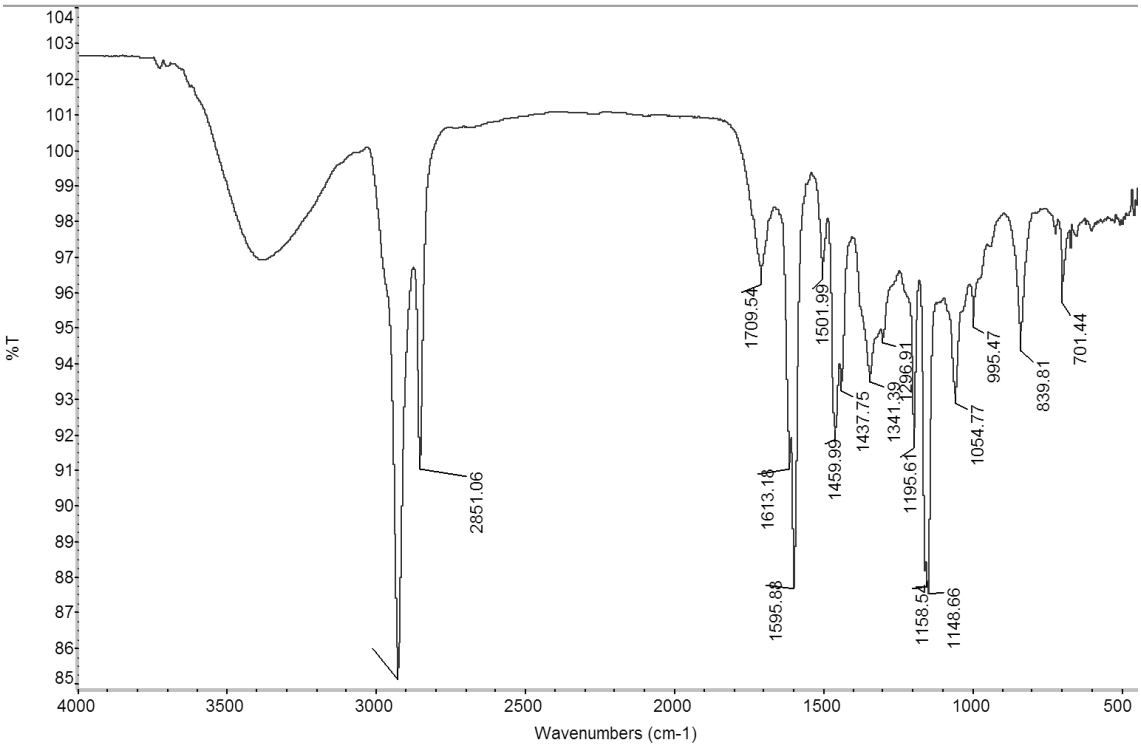


Figura 2.16 Espectro de IR del compuesto BMR-10d1.

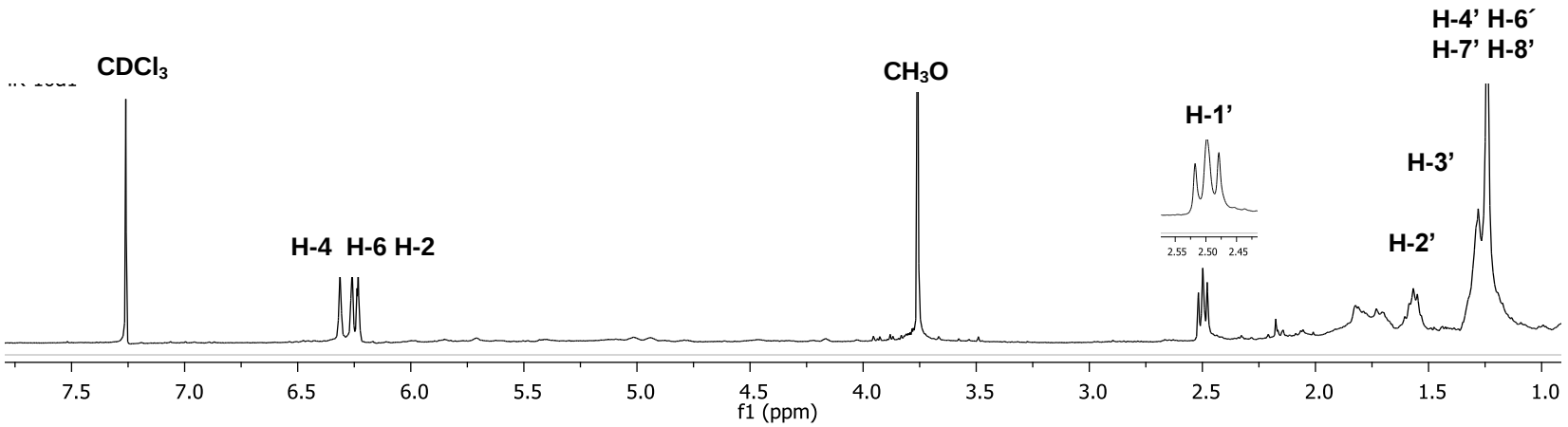


Figura 2.17 Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-10d1 ($CDCl_3$, 400 MHz).

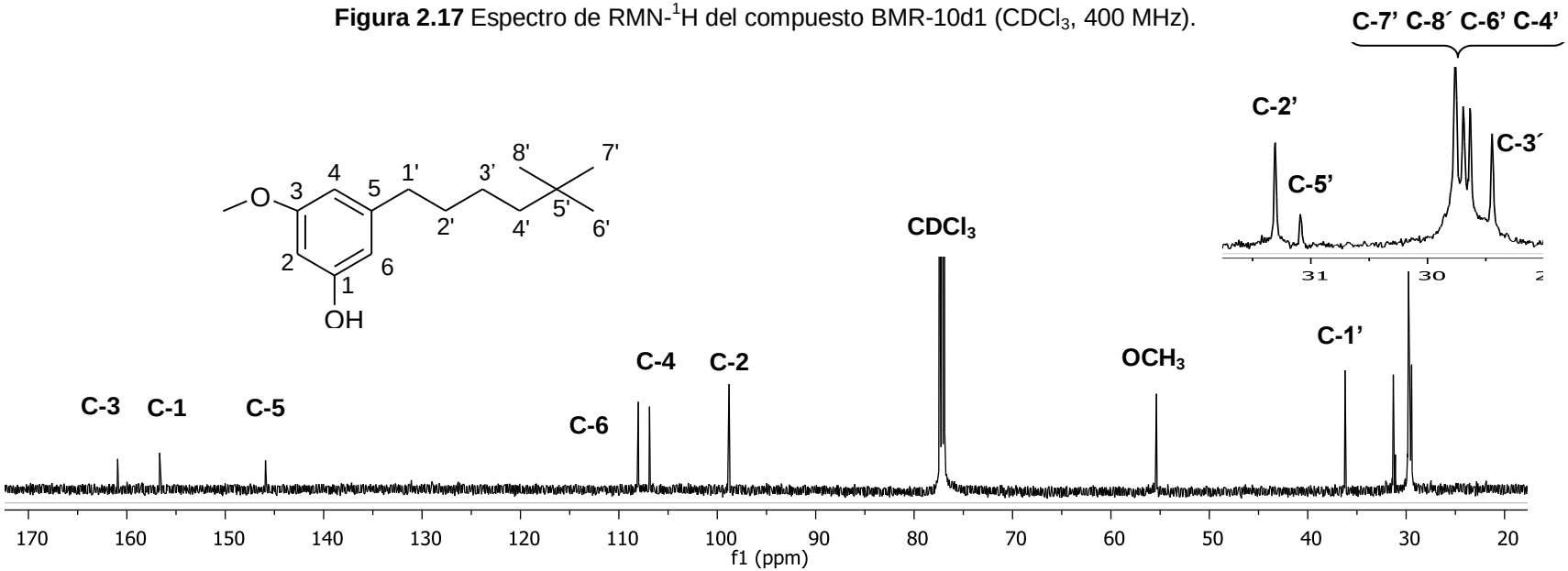


Figura 2.18 Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-10d1 ($CDCl_3$, 100 MHz).

Tabla 2.4 Datos espectroscópicos de RMN del compuesto BMR-10d1.

Posición	Multiplicidad	δ ^{1}H (*J*)	δ ^{13}C	HMBC	
				^{2}J	^{3}J
1	C	-	156.7		
2	CH	6.23 (s, 1H)	98.8		
3	C	-	160.9		
4	CH	6.31 (s, 1H)	106.8		C-2, C-6, C-1’
5	C	-	145.9		
6	CH	6.26 (s, 1H)	108.0	C-1	C-4, C-1’
1’	CH_2	2.50 (t, 2H, 8.0)	36.1	C-3, C-2’	C-4, C-3’
2’	CH_2	1.58 (q, 2H, 8.0)	31.2		
3’	CH_2	1.28 (m, 2H)	29.4		
4’	CH_2	1.24 (2H)	29.6		
5’	C		31.1		
6’	CH_3		29.7		
7’	CH_3	1.24 (s, 9H)	29.7		
8’	CH_3		29.7		
OCH_3	OCH_3	3.76 (s, 3H)	55.3	C-5	
OH		-			

2.4.6. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO IV (BMR-11a1)

El compuesto IV, BMR-11a1 (Figura 2.19) es un compuesto nuevo y se obtuvo con una consistencia semi-sólida de color anaranjado-rojizo (8 mg), soluble en CH_2Cl_2. En placa revelada con óleum se observa de color amarillo [R_f = 0.42, Hx/AcOEt (9:1), R_f = 0.51, Hx/CH_2Cl_2 (2:8)], visualizado bajo luz UV presenta un color rosa intenso a longitud de onda corta (254 nm) y cuando se revela con el ácido fosfomolíbdico se observa verde con un halo amarillo.

En la Figura 2.20 se muestra el compuesto BMR-11a1 comparado con *epi*-lupeol, sin embargo, aunque poseen un R_f idéntico, las características observadas del compuesto aislado difieren del compuesto *epi*-lupeol.

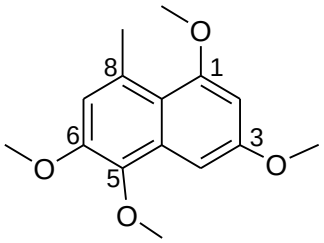


Figura 2.19 Compuesto 1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno (BMR-11a1, compuesto IV).

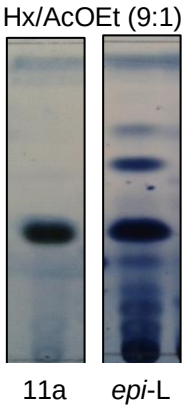


Figura 2.20 Comparación en CCD del compuesto BMR-11a1 y *epi*-lupeol.

El análisis del espectro de masas (Figura 2.21) reportó un ion molecular de 262 *m/z*, sugerente de un PM = 262 g/mol, lo que confirma que se trata de un compuesto distinto al *epi*-lupeol que tiene un PM = 426.7174 g/mol (PubChem, Open Chemistry Data Base); se observa una señal de 77 *m/z* y 51 *m/z* características del radical fenilo y la reducción del mismo en un anillo de cuatro miembros al perder dos carbonos, con pérdidas de metilos (M-15) y grupos etilenos (M-28). El espectro de IR (Figura 2.22) revela la ausencia de grupos hidroxilo en la molécula, pero confirma la presencia de dobles enlaces con las bandas de 1620 y 1600 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$). En el espectro de RMN-^{1}H (Figura 2.23) aparecen tres señales de protones aromáticos, un singulete a δ 6.80 (1H, s) y dos dobletes en posición *meta* δ 6.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz) y δ 6.99 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), además se observan cuatro señales simples correspondientes a cuatro grupos metoxilo (δ 3.87, 3.91, 3.93 y 3.95) y un singulete a δ 2.79 característico de un grupo metilo enlazado a un anillo de benceno.

El espectro de RMN-^{13}C (Figura 2.24) muestra quince carbonos, diez aparecen en la región de C_{sp2}, sugerente de que la molécula se trata de un anillo de naftaleno, cuatro señales en la región de carbonos pertenecientes a grupos metoxilo (δ 60.5, 56.4, 55.3, 55.2) y una señal de un carbono sp^3 (δ 24.9); el experimento DEPT-135 no muestra ningún grupo metileno (CH_2), y junto con el experimento DEPT-90 se observa un total de ocho señales correspondientes a tres metinos (CH) y cinco metilos (CH_3), determinando que se trata de un anillo de naftaleno penta-sustituido.

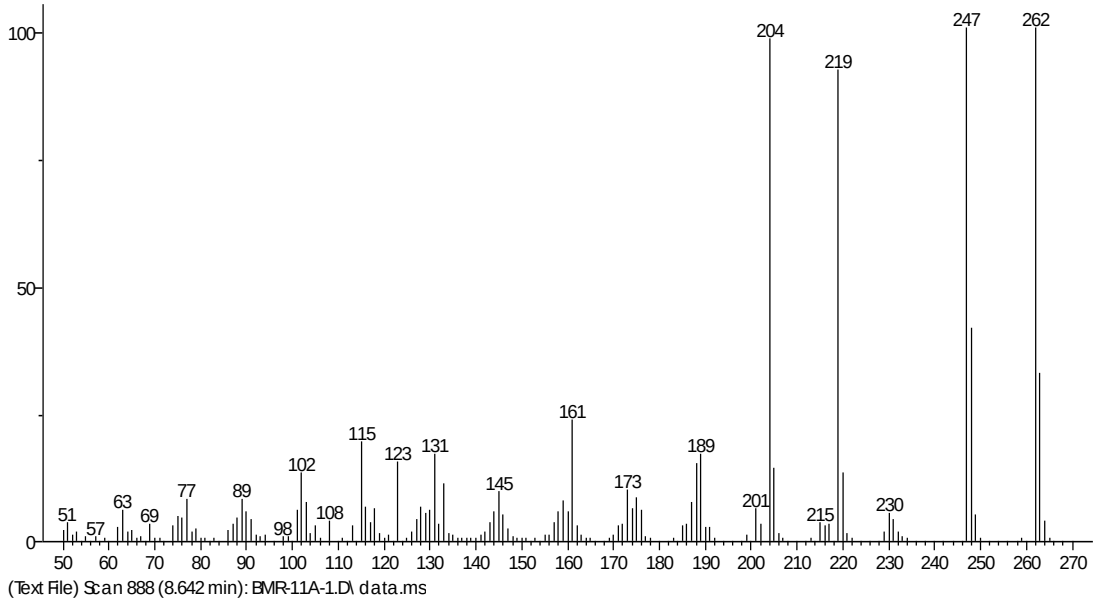


Figura 2.21 Espectro de masas (CG-EM) del compuesto BMR-11a1.

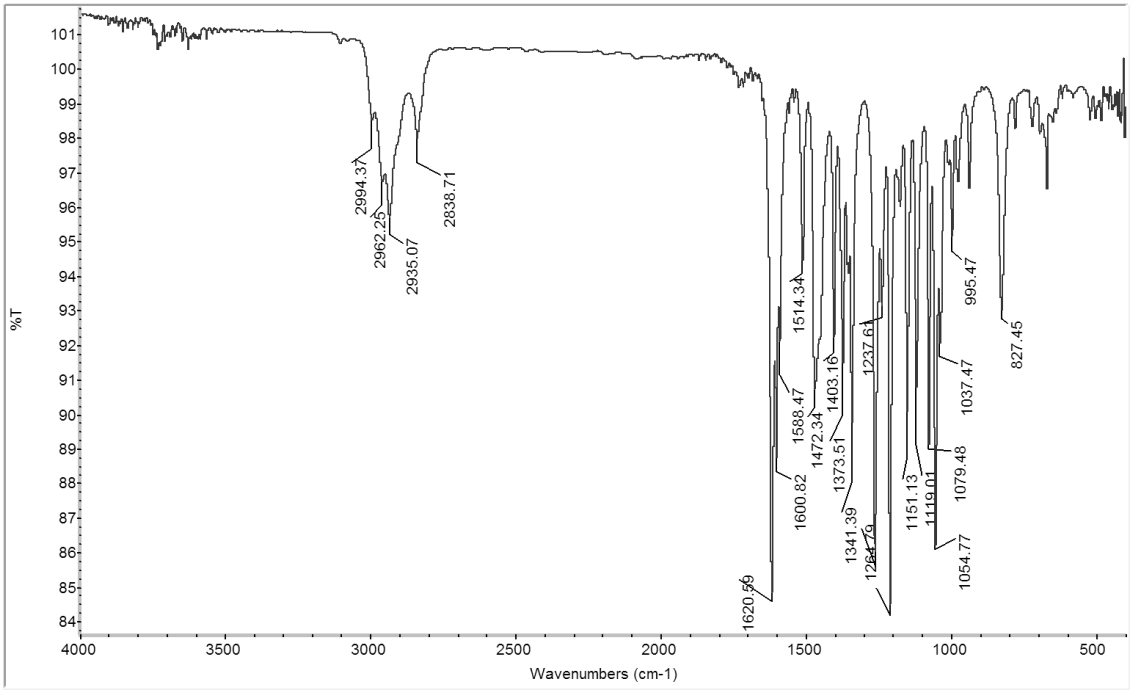


Figura 2.22 Espectro de IR del compuesto BMR-11a1.

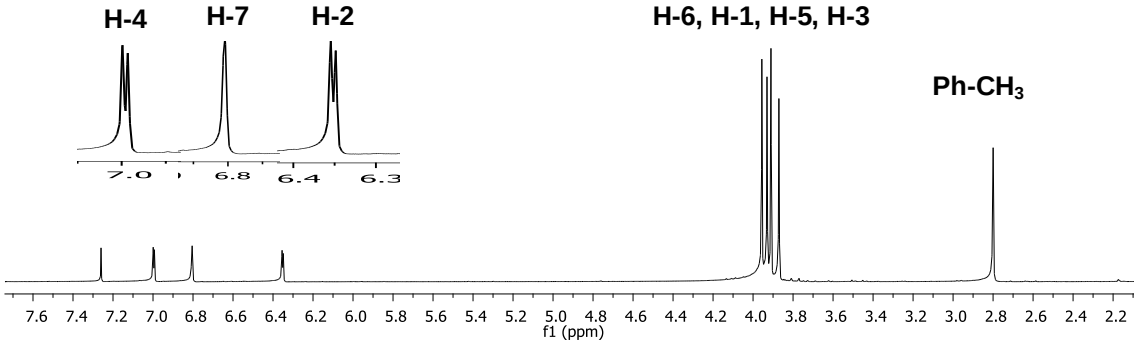


Figura 2.23 Espectro de RMN-^{1}H del compuesto BMR-11a1 ($CDCl_3$, 400 MHz).

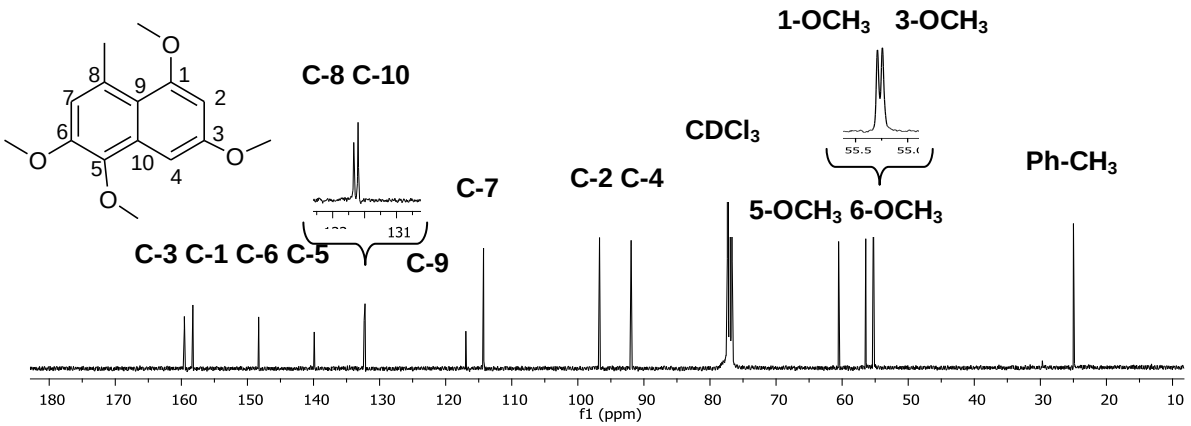


Figura 2.24 Estructura y espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-11a1 ($CDCl_3$, 100 MHz).

El espectro de HMBC muestra correlación a dos y tres enlaces de distancia de los tres protones aromáticos y de los cuatro grupos metoxilo, así como del metilo (Tabla 2.5); una ampliación del espectro se observa en la Figura 2.25 (algunas correlaciones no se muestran en esta figura).

Tabla 2.5 Datos espectroscópicos de HMBC del compuesto BMR-11a1.

Posición	HMBC	
	^2J	^3J
H-4		C-2, C-5, C-9
H-7	C-6, C-8	C-5, C-9
H-2	C-1	C-4, C-9
1-OCH_3	C-1	
3-OCH_3	C-3	
6-OCH_3	C-6	
5-OCH_3	C-5	
8-CH_3	C-8	C-7, C-9

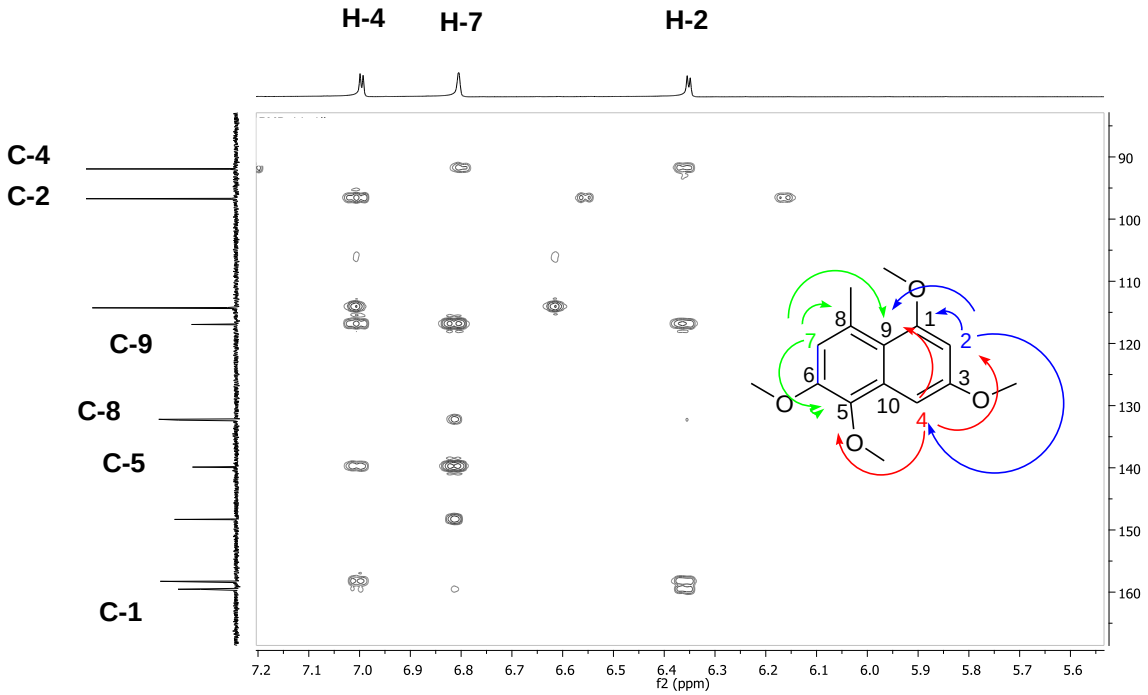


Figura 2.25 Ampliación del espectro de HMBC del compuesto BMR-11a1.

Se analizaron con la literatura diferentes distribuciones en las que se podrían encontrar los sustituyentes en el anillo de naftaleno, de acuerdo a los desplazamientos presentes en nuestra molécula. El compuesto 1,3,6,7-tetrametoxi-naftaleno reportado por Dickstein *et al*. (2013) presenta ciertas similitudes, en el cual uno de los anillos del naftaleno posee dos carbonos con desplazamientos menores de 100 ppm, con protones en posición *meta* como en nuestro compuesto, sin embargo, la otra parte del anillo presenta algunas semejanzas con el 5,6,8 trimetoxi-3-metil-naftol aislado por Matsushita *et al*. (2010); con esta información y con la ayuda del programa ChemDraw, que permite dibujar las estructuras de compuestos químicos (ChemDraw Ultra 7.0), proporcionando una estimación probable de los desplazamientos esperados en la molécula, se concluye que el compuesto BMR-11a1 es el 1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno (Figura 2.19).

El cotejo de los datos espectroscópicos de RMN-^{13}C del compuesto BMR-11a1 con diferentes compuestos es especificado en la Tabla 2.6 y Figura 2.26.

Tabla 2.6 Comparación de los datos espectroscópicos de RMN-^{13}C del compuesto BMR-11a1 con compuestos similares.

Carbonos	δ ^{13}C		
	Compuesto A [a]	Compuesto B [b]	BMR-11a1 [c]
1	157.3	-	158.2
2	97.7	-	96.7
3	155.7	-	159.5
4	96.1	-	91.9
5	-	137.3	139.8
6	147.4	148.1	148.3
7	-	94.4	114.2
8	130.8	-	132.3
9	116.1	-	116.9
10	-	131.7	132.2
1-OCH_3	55.6	-	55.3
3-OCH_3	55.0	-	55.2
5-OCH_3	-	60.9	60.5
6-OCH_3	56.0	57.3	56.4
CH_3	-	22.0	24.9
OH	-	*154.3	-
	*150.4	*153.0	
	*105.9	*137.3	
	*101.9	*111.6	
	* 55.9	*110.7	
		*109.5	
		* 56.3	

[a] Señales del compuesto A (1,3,6,7-tetrametoxi-naftaleno, $CDCl_3$, 125 MHz). Dickstein *et al*. (2013).
[b] Señales del compuesto B (5,6,8-trimetoxi-3-metil-naftol, $CDCl_3$, 100 MHz). Matsushita *et al*. (2010).
[c] Señales del compuesto BMR-11a1 (1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno, $CDCl_3$, 100 MHz).
* Señal que no coincide.

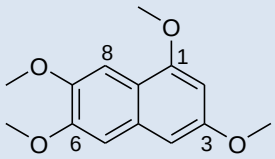
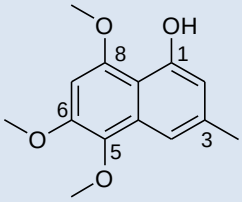
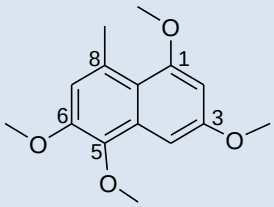
Compuesto A	**Compuesto B**	**Compuesto BMR-11a1**
1,3,6,7-tetrametoxi-naftaleno Dickstein *et al*. (2013)	5,6,8-trimetoxi-3-metil-naftol Matsushita *et al*. (2010)	1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno
		

Figura 2.26 Comparación de los compuestos A y B con BMR-11a1 (compuesto IV).

2.4.7. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO V (BMR-14f1)

Del compuesto V, BMR-14f1 (Figura 2.27), se obtuvieron 13 mg en forma de cristales de agujas blancas, soluble en CH_2Cl_2/MeOH (1:1); en placa no es visible bajo luz UV y revelada con óleum se observa de un color morado [R_f = 0.32, Hx/AcOEt (8:2)]. El análisis espectrométrico de alta resolución en HPLC-EM reveló un triterpeno con fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O_3$; el estudio de espectrometría de masas de baja resolución en CG-EM (Figura 2.28) muestra un ion molecular de 458 *m/z*, una señal a 440 *m/z*, indicativo que ocurrió una pérdida de agua (M-18), una señal de 249 *m/z* $[C_{16}H_{25}O_2]^+$ que corresponde a un fragmento común en triterpenos de tipo oleanano con grupos hidroxilo en el anillo D/E, además de una señal a 207 *m/z* $[C_{14}H_{21}O]^+$ que sugiere la presencia del grupo OH en el anillo A/B y un pico base de 189 *m/z* $[C_{14}H_{21}]^+$. El espectro de infrarrojo (Figura 2.29) denota la presencia de grupos hidroxilo por la banda ancha entre 3449-3360 cm^{-1} (ν_{O-H}) y enlaces sencillos unidos a oxígeno debido a la banda a 1232 cm^{-1} (ν_{C-O}). En el espectro de RMN-^{1}H (Figura 2.30) se aprecian los singuletes de cada grupo metilo (δ <2), así como la ausencia de protones vinílicos en la molécula y la presencia de protones de base de alcohol (H-3 y H-16). El espectro de RMN-^{13}C (Figura 2.31, Tabla 2.7) confirma 30 carbonos pertenecientes a enlaces sencillos (C_{sp3}, δ <100) con siete carbonos cuaternarios. Los experimentos espectroscópicos DEPT-90 y DEPT-135 muestran un total de cinco grupos metinos (CH), once metilenos (CH_2) y siete grupos metilo (CH_3).

De acuerdo a lo reportado en la literatura el triterpeno aislado corresponde al 3β,16α-dihidroxi-protoprimulagenina A (Figura 2.27, Tabla 2.7), un sapogenol aislado de la raíz de *Primula sieboldi* (Kitagawa *et al*., 1976). Recientemente este triterpeno se ha encontrado formando parte de una sakuraso-saponina, compuesto aislado de *Jacquinia flammea*, especie ahora denominada *Bonellia flammea* (Sánchez-Medina *et al*., 2009).

El triterpeno aislado consiste en un esqueleto pentacíclico de tipo oleanano con un puente epóxido entre el C-13 y C-28 (Figura 2.27).

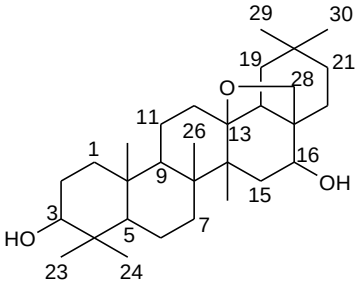


Figura 2.27 Estructura de 3β,16α-dihidroxi-protoprimulagenina A (BMR-14f1, compuesto V).

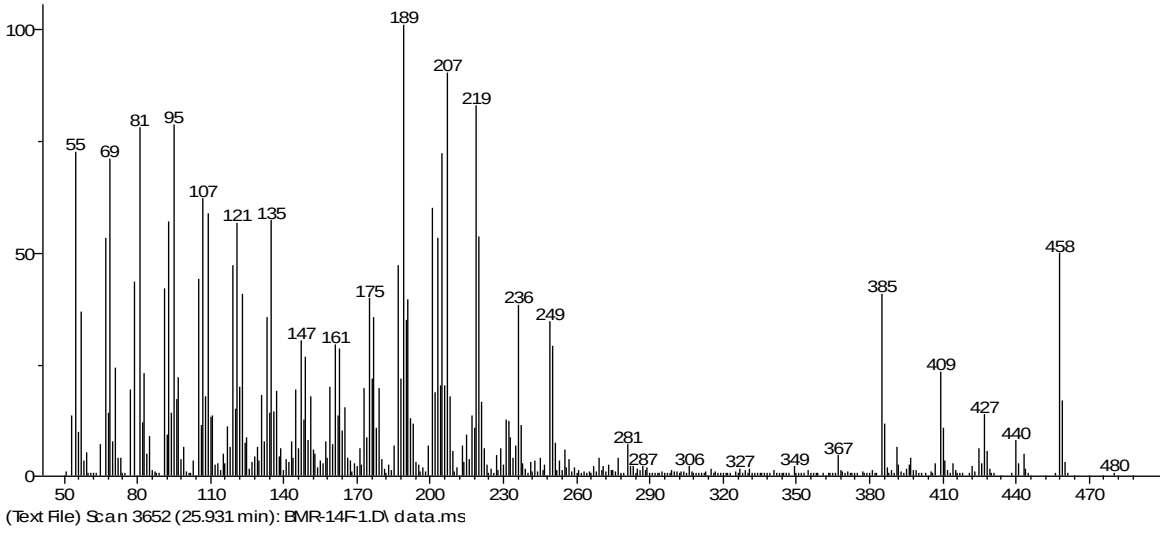


Figura 2.28 Espectro de masas (CG-EM) del compuesto BMR-14f1.

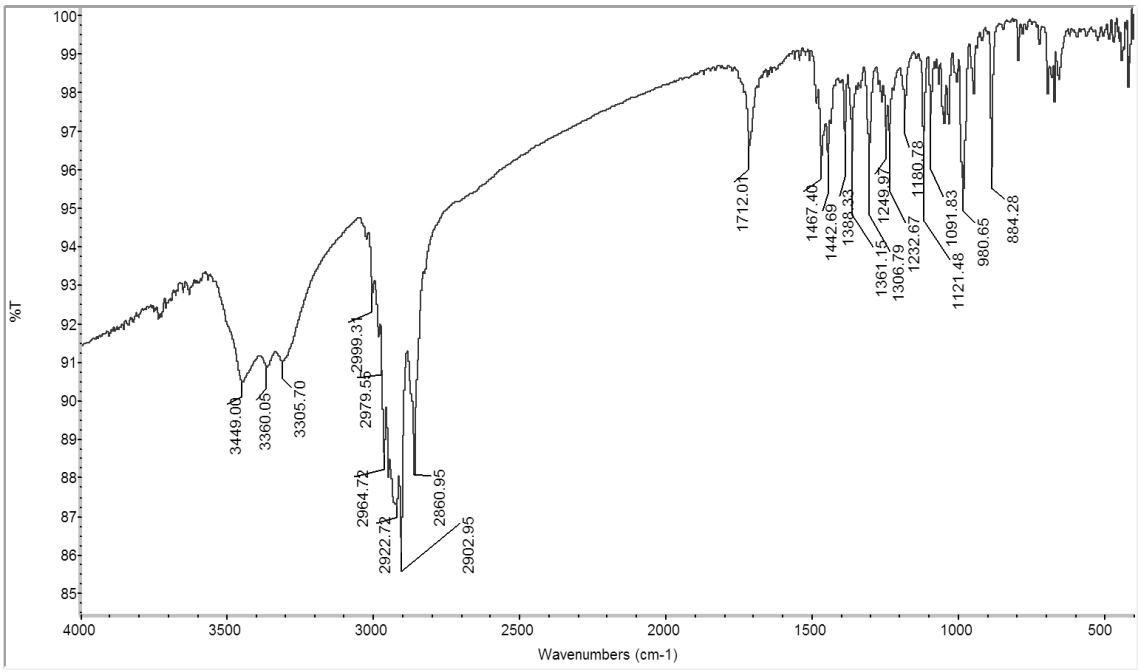


Figura 2.29 Espectro de IR del compuesto BMR-14f1.

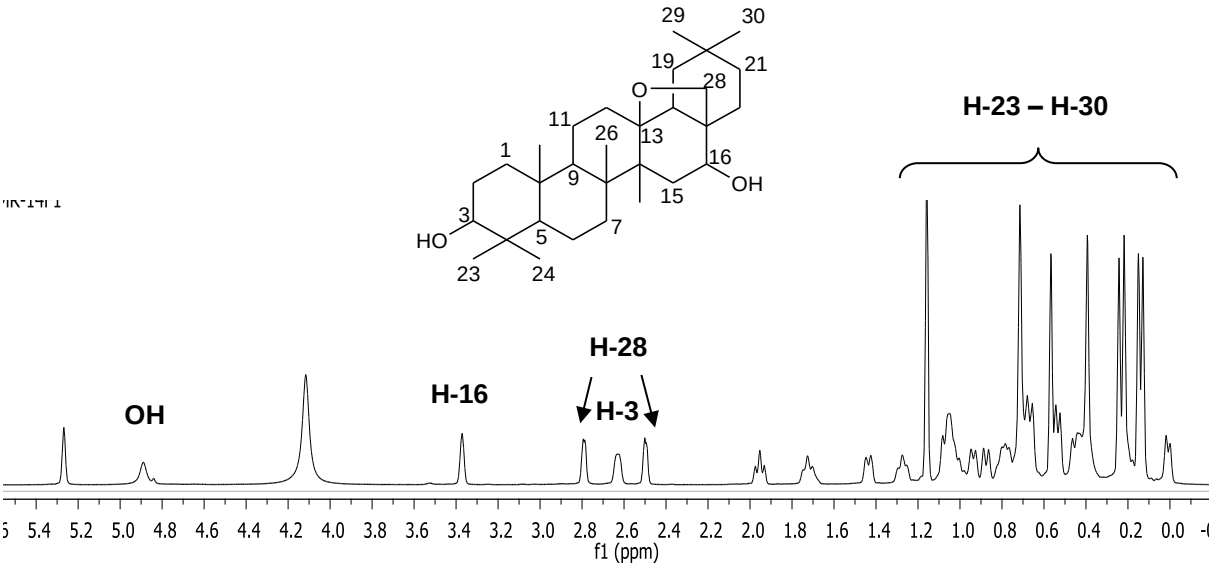


Figura 2.30 Espectro de RMN-^{1}H y estructura del compuesto BMR-14f1 ($CDCl_3$, 600 MHz, se indican los protones característicos).

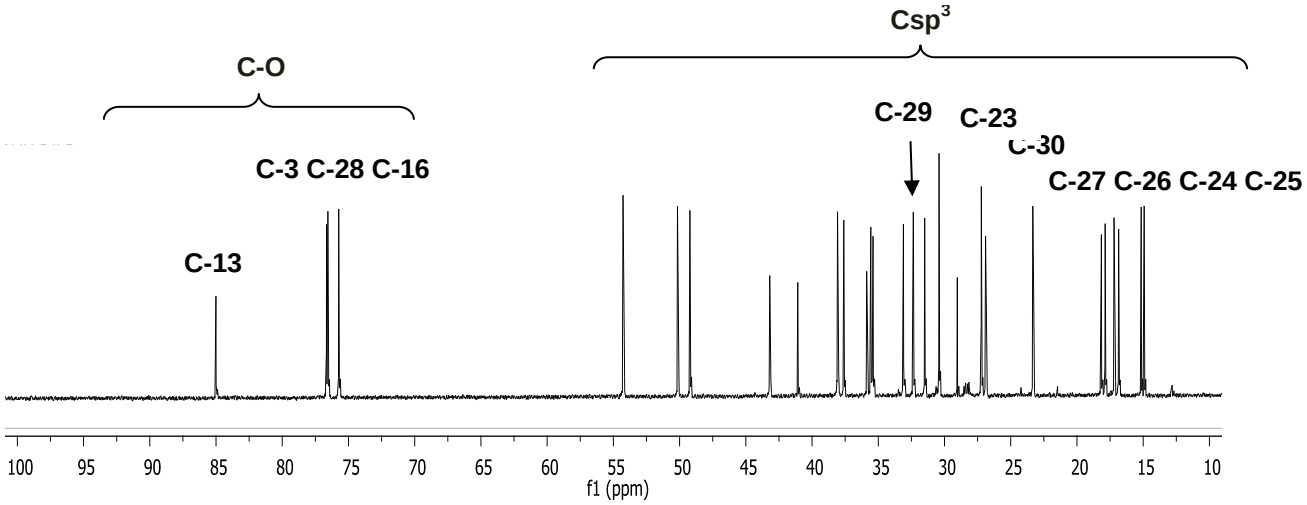


Figura 2.31 Espectro de RMN-^{13}C del compuesto BMR-14f1 ($CDCl_3$, 150 MHz, se indican los carbonos característicos).

El cotejo de los desplazamientos obtenidos para cada carbono entre los compuestos BMR-14f1 (compuesto V) y 3β,6α-dihidroxi-protoprimulagenina A, como el tipo de carbono al cual pertenecen, se especifican en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Comparación de las señales de RMN-^{13}C obtenidas del compuesto BMR-14f1 y el compuesto 3β,16α-dihidroxi-protoprimulagenina A.

Carbono	Multiplicidad	Protoprimulagenina A[a]	BMR-14f1[b]
1	CH_2	39.6	39.9
2	CH_2	28.4	28.8
3	CH	78.1	78.5
4	C	39.6	40.0
5	CH	55.8	56.1
6	CH_2	18.3	18.7
7	CH_2	31.9	32.3
8	C	42.6	42.9
9	CH	50.7	52.0
10	C	37.3	37.7
11	CH_2	19.3	19.7
12	CH_2	34.6	34.9
13	C	86.5	86.9
14	C	44.7	45.0
15	CH_2	37.0	37.2
16	CH	77.2	77.6
17	C	44.7	45.1
18	CH	51.6	51.1
19	CH_2	39.1	39.4
20	C	31.9	32.3
21	CH_2	36.9	37.4
22	CH_2	33.0	33.3
23	CH_3	28.7	29.1
24	CH_3	16.6	17.0
25	CH_3	16.4	16.8
26	CH_3	18.7	19.1
27	CH_3	19.6	20.0
28	CH_2	78.0	78.4
29	CH_3	33.8	34.2
30	CH_3	24.8	25.2

[a]Señales por Kohda *et al*. (1989). Pyr-d_5 a 100 MHz.
[b]Señales de RMN-^{13}C obtenido en Pyr-d_5 a 150 MHz.

Se determinó la estructura molecular de cinco compuestos de la raíz de la especie *B. macrocarpa*, de los cuales dos compuestos, BMR-5g1 (compuesto I) y BMR-14f1 (compuesto V) son nuevos en la especie, sin embargo, son considerados conocidos porque existen reportes de estos compuestos en otras especies dentro del género *Bonellia* o en otros géneros. Los compuestos BMR-7k1 (compuesto II), BMR-10d1 (compuesto III) y BMR-11a1 (compuesto IV) son considerados nuevos (no conocidos), ya que no existen reportes en la literatura sobre estos metabolitos.

Los compuestos BMR-5g1 (compuesto I) y BMR-10d1 (compuesto III) son estructuralmente semejantes al compuesto bonediol (Figura 2.32). Estos compuestos pertenecen al grupo de los alquilbencenos, específicamente son lípidos fenólicos, se caracterizan por tener una cadena lateral hidrocarbonada unida a un núcleo aromático que puede ser un fenol, catecol, resorcinol o hidroquinona; el compuesto bonediol es derivado del grupo catecol (*orto*-dihidroxibenceno), mientras que los otros compuestos se derivan del grupo resorcinol (*meta*-dihidroxibenceno). Los lípidos fenólicos poseen un carácter anfifílico o anfipático, es decir, presentan una doble afinidad polar-no polar, generando un amplio interés en la química industrial, farmacéutica, ciencias agrícolas, nutricionales y biomédicas (Stasiuk y Kozubek, 2010).

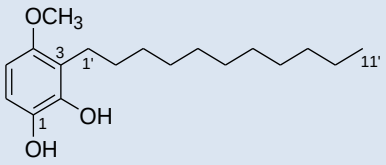
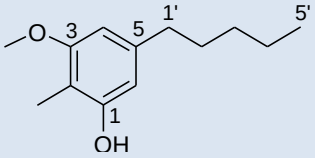
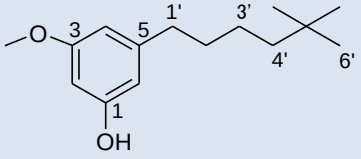
Bonediol	**BMR-5g1**	**BMR-10d1**
Caamal-Fuentes *et al.* (2011)	3-metoxi-2-metil-5-pentil-fenol	3-metoxi-5-(5’,5’-dimetilhexil) fenol
		

Figura 2.32 Comparación de los compuestos semejantes al bonediol.

En el capítulo siguiente se abordará el efecto citotóxico y antiproliferativo que poseen los compuestos aislados y las diferencias con bonediol (compuesto reportado de *B. macrocarpa* en un trabajo anterior) en las diferentes líneas celulares, además de la posible relación estructura-actividad y la actividad biológica encontrada para los compuestos conocidos.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTICANCERÍGENO DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA Y COMPUESTOS PUROS DE *BONELLIA MACROCARPA*

3.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer ocupa el quinto lugar entre las enfermedades responsables de defunciones en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), México se encuentra en el tercer lugar y a nivel estatal ocupa el segundo lugar (INEGI, 2014; OMS, 2013; Unión Yucatán, 2012), por lo tanto, el cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Distintas terapias son empleadas para combatir esta enfermedad, entre las que se encuentra la quimioterapia; desafortunadamente el tratamiento farmacológico (quimioterapia) en muchas ocasiones resulta ser ineficaz, debido a la resistencia de las células tumorales; la incapacidad del fármaco de permanecer en su forma activa dentro de la célula, la localización del tumor o el desarrollo de diversos mecanismos para proteger a la población de células malignas pueden ser algunas otras causas probables de la falla de la terapia farmacológica (Stavrovskaya, 2000); por eso es necesaria la búsqueda de compuestos con potencial anticancerígeno que puedan servir para el desarrollo de un nuevo fármaco y ser utilizado como terapia eficiente.

Es conocido que diversos compuestos antineoplásicos han sido aislados de plantas. Más de 3,000 plantas alrededor del mundo han sido reportadas con propiedades anticancerígenas, es decir, son utilizadas para tratar síntomas sugerentes de cáncer y diversos estudios científicos revelan un efecto citotóxico de diferentes especies vegetales contra distintas líneas de células cancerígenas (Fadeyi *et al*., 2013; Shahneh *et al*., 2013; Ismail *et al*., 2012; Alonso *et al*., 2011; Caamal-Fuentes *et al*., 2011b; Bayor *et al*., 2007), representando una fuente principal para la obtención de nuevos compuestos. La península de Yucatán contiene una amplia diversidad de especies vegetales; el 30% de las 2,500 plantas estimadas para la península posee un uso medicinal, destacando como el estado de la península con mayor riqueza de plantas medicinales (Méndez-González *et al*., 2012). Diversas especies de la península de Yucatán han sido estudiadas, demostrando que muchas de ellas poseen actividad anticancerígena, entre las que

destaca la especie *Bonellia macrocarpa* (Caamal-Fuentes *et al*., 2011b), por lo cual es necesario ampliar estos estudios para llegar al aislamiento de moléculas con potencial efecto citotóxico sobre las células de cáncer.

Una de las maneras para analizar el potencial anticancerígeno es mediante el cultivo celular *in vitro*, un conjunto de técnicas que permite el mantenimiento celular *in vitro*, conservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, lo cual hace posible la evaluación de compuestos en diferentes líneas celulares.

El estudio *in vitro* sirvió como guía para conocer las fracciones con mayor actividad y poder aislar los metabolitos secundarios responsables de esa actividad; el presente trabajo refuerza la capacidad citotóxica de la raíz de la especie *B. macrocarpa*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. EVALUACIÓN ANTICANCERÍGENA

El presente trabajo es un estudio biodirigido, el extracto metanólico y las diferentes fracciones fueron evaluadas para conocer la actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

Las fracciones obtenidas de la partición hexánica fueron nuevamente evaluadas, se seleccionaron aquellas con alta actividad citotóxica para seguir purificando y nuevamente monitorear cuáles fracciones presentaron actividad, hasta aislar los metabolitos puros, a los cuales se les evaluó su efecto citotóxico y antiproliferativo en cuatro líneas celulares cancerígenas humanas (SiHa, HeLa, MCF-7 y DU-145) y una línea celular normal (Vero)

3.2.2. LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER

Para conocer el efecto citotóxico y/o antiproliferativo de los metabolitos es necesario disponer de un grupo de células que representan los diversos tumores; para ello, se han elegido distintas líneas celulares de cáncer disponibles en el laboratorio, las cuales se han

seleccionado por pertenecer dentro del grupo de líneas cancerígenas en las cuales el género *Bonellia* ha mostrado actividad citotóxica y/o encontrarse dentro de los tipos de cáncer con mayor frecuencia.

El grupo de líneas celulares que fueron cultivadas son: adenocarcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma de células escamosas de cérvix (SiHa), adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de próstata (DU-145) y una línea celular normal de riñón de mono verde (Vero). Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo con el medio Eagle modificado de Dulbeco (DMEM). Este medio de cultivo es una modificación del medio basal Medium Eagle (BME) y contiene una mayor concentración de aminoácidos y vitaminas, lo cual lo hace adecuado para el crecimiento celular. Se agregó 10% de suero fetal bovino con una disolución de antibióticos, a una concentración de 10,000 U de penicilina, para evitar el crecimiento de bacterias Gram-positivas, y 10 mg/mL de estreptomicina para evitar el crecimiento de las bacterias Gram-negativas, además de agregarle anfotericina B como antifúngico a una concentración de 2.5 mg/mL. Las líneas celulares se mantuvieron incubadas (Nuaire CO_2 water-jacketed incubator) en una atmósfera de 5% de CO_2, 95% de humedad, a una temperatura de 37 ^{0}C.

3.2.3. BIOENSAYO DE SULFORODAMINA B (SRB)

Esta es una prueba colorimétrica de punto final que se fundamenta en la habilidad del colorante sulforodamina B (SRB) (rosa brillante) de unirse electrostáticamente a los residuos de aminoácidos de las proteínas. Determina la proliferación celular mediante la relación indirecta entre el número de células y la concentración de proteínas totales (Voigt, 2005). Esta prueba nos permite evaluar la actividad citotóxica mediante la medición indirecta del número de células muertas debido al extracto, fracción o compuesto evaluado o puede evaluarse la actividad antiproliferativa cuando el extracto, fracción o compuesto evaluado impide la reproducción celular.

Cada evaluación se realizó por triplicado con el objetivo de verificar su reproducibilidad. Los bioensayos se efectuaron bajo la supervisión de la Dra. Rosa Esther Moo Puc de la Unidad de Investigación Médica de Yucatán del IMSS.

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA

El bioensayo de sulforodamina (SRB) nos permite evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa, la diferencia radica en dos puntos importantes: el porcentaje de confluencia celular necesaria y la adición o no de suero fetal bovino (SFB), lo que dependerá del tipo de bioensayo que se desea efectuar, es decir, si las células teniendo el requerimiento necesario para proliferar no logran hacerlo cuando se agrega el compuesto, entonces podemos concluir que posee un efecto antiproliferativo.

La línea celular con 100% de confluencia (en la caja de cultivo celular F_{25}) se trató con disolución de tripsina por 5 minutos en una atmósfera de 5% de CO_2 y en una canaleta se agregó la suspensión celular con SFB al 10% (sin distinción para un ensayo antiproliferativo y citotóxico, ya que lo que se pretende en este paso es ayudar al crecimiento celular en la placa), luego se distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pozos a un volumen de 100 µL con una densidad celular de 5,000 células por pocillo y, finalmente, se incubaron por 24 h para permitir la adhesión de las células a la superficie del pozo. El porcentaje de confluencia celular necesario en la placa de 96 pozos lo determinará el tipo de bioensayo requerido: en un ensayo citotóxico se necesita una confluencia celular de 100%, mientras que en un ensayo antiproliferativo 70% de confluencia celular será indicado. Cuando las células alcanzan el porcentaje adecuado de crecimiento, se retira el medio para adicionarle medio fresco y posteriormente se adiciona cada compuesto con la concentración adecuada; este paso también es indispensable, pues depende de la adición o no de suero fetal bovino (SFB) en el medio fresco; se debe agregar suero fetal bovino al 10% si se desea evaluar la actividad antiproliferativa (pero se debe prescindir de éste en un ensayo citotóxico); posteriormente, se retiró el medio antiguo de la placa para adicionarle 100 µL de medio nuevo (con/sin SFB); cada compuesto o fracción se evaluó a concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.5 µg/mL y la placa se incubó por 48 horas. Para revelar la placa, se adicionó 100 µL de ácido tricloroacético (10%) por 30 min a 4 °C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se adicionó 100 µL de la disolución de sulforodamina B (0.1% de SRB en ácido acético al 1%) por 15 min a

temperatura ambiente; después se retiró el sobrenadante y se lavó tres veces con 100 µL de ácido acético al 1%, la tinción se dejó solubilizar con 100 µL de tris-base (10 mM). La densidad óptica se midió a 540 nm mediante un espectrofotómetro y se calculó el porcentaje de mortalidad. La Figura 3.1 es un ejemplo de diferentes tipos de porcentaje de confluencia celular.

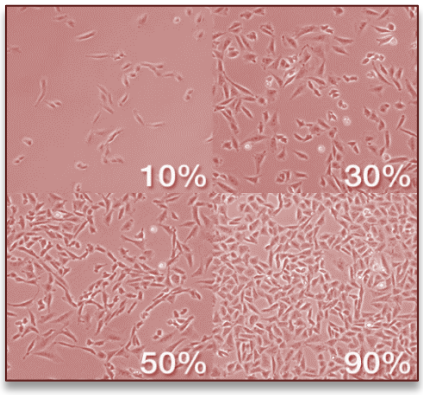


Figura 3.1 Porcentajes de confluencia en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

3.2.5. CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA (CC_{50}) Y CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (CI_{50})

La concentración citotóxica media (CC_{50}) se define como la concentración a la cual el extracto o compuesto logra reducir la viabilidad celular en un 50% después de un tiempo de exposición específico y la concentración inhibitoria media (CI_{50}) es cuando se logra alcanzar el 50% de la inhibición máxima (Arias, 1999).

Para calcular la concentración del extracto, fracciones o compuestos que sean capaces de matar o inhibir el 50% de células (sección 3.2.4) se midió la densidad óptica después de 48 h con el compuesto o extracto y se calculó el porcentaje de mortalidad o inhibición mediante la fórmula: [(D.O. control – D.O. extracto) / D.O. control] × 100; los datos obtenidos fueron analizados en el programa estadístico prisma Graph Pad 4.0 para definir la CC_{50} y CI_{50}.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LA RAÍZ DE *B. MACROCARPA*

El extracto metanólico y sus distintas fracciones de polaridad creciente, fracción hexánica, fracción de CH_2Cl_2, fracción de AcOEt y fase acuosa se evaluaron en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa) para determinar el poder citotóxico de los mismos, revelando que el extracto original metanólico no presentó actividad citotóxica y que la actividad biológica se observó solamente en la fracción hexánica a la concentración de 50 µg/mL con un 70% de muerte celular.

Sin embargo, los resultados obtenidos son diferentes a los descritos previamente por Caamal-Fuentes *et al*. (2012), en los que se observó, de acuerdo a la guía internacional del NCI, una moderada actividad para el extracto metanólico (CC_{50} = 31.51 µg/mL), una alta actividad citotóxica para las fracciones de Hx, AcOEt y fase acuosa (CC_{50} = 27.02, 19.52 y 25 µg/mL, respectivamente) mientras que para la fracción de CH_2Cl_2 se observó baja actividad ($>$ 50µg/mL).

Es importante mencionar que en el primer trabajo se realizó la recolecta de la especie en octubre de 2007, posteriormente la raíz de *Bonellia* se colectó en una época distinta (febrero de 2008) con el fin de aislar en mayor cantidad el metabolito responsable de la actividad citotóxica (bonediol), pero no se encontró en esa nueva colecta, sugiriendo que probablemente la molécula responsable del efecto biológico se encuentra presente en temporada de lluvias (Caamal-Fuentes, 2012). Registros de la Comisión Nacional del Agua (Conagua) reportaron que los últimos años fue una época con menor cantidad de lluvias; el año 2012 fue el vigesimoquinto más seco, mientras que el 2011 se caracterizó por ser el decimotercer año con menor cantidad de lluvias reportadas desde 1941, siendo el menos lluvioso de los últimos 14 años (smn.conagua.gob.mx). En el presente estudio la recolecta se llevó a cabo en octubre de 2013. Es probable que la disminución de las lluvias también afectara la producción de otros metabolitos activos y esta sea la razón

admisible por la cual distintas fracciones no presentaran actividad y que la fracción hexánica no mostrara un efecto citotóxico similar que en el trabajo previo.

Se siguió trabajando con la fracción hexánica, los bioensayos se realizaron en la Unidad de Investigación Médica de Yucatán (UIMY). Seis de las once fracciones primarias resultantes de la separación de la fracción hexánica mediante la técnica de VLC fueron responsables de la actividad citotóxica y cuatro de ellas mostraron una alta actividad citotóxica (≤ 30 μg/mL), por lo que se decidió trabajar con éstas. En la Tabla 3.1 se muestran las fracciones que presentaron actividad y marcadas en negrita las fracciones con mayor efecto citotóxico.

Tabla 3.1 Concentración citotóxica de las fracciones primarias activas en la línea celular HeLa con su desviación estándar (DE).

Fracción	CC_{50} μg/mL ± DE
BMR-3e	**16.79** ± 1.04
BMR-3f	**16.55** ± 1.05
BMR-3g	**20.57** ± 1.08
BMR-3h	**16.04** ± 1.14
BMR-3i	31.78 ± 1.07
BMR-3k	40.47 ± 1.07

3.3.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS SUBFRACCIONES

Se obtuvieron en total 44 subfracciones originadas a partir del procesamiento de las fracciones primarias BMR-3e, BMR-3f, BMR-3g y BMR-3h, responsables de la mayor actividad. Cada subfracción fue evaluada sobre la línea celular de cáncer cervicouterino (Hela) y se determinó la concentración citotóxica media. En la Tabla 3.2 se muestran solamente las que poseen actividad, y las subfracciones donde se encuentra presente el compuesto bonediol se indican en rojo.

Once subfracciones presentaron una alta actividad citotóxica (< 30 μg/mL) en la línea celular cancerígena HeLa (tres subfracciones de BMR-3e, cuatro de BMR-3f, tres de BMR-5g y una subfracción de BMR-3h) dentro de las cuales se encuentra la subfracción

que contienen al compuesto bonediol, causante de la actividad citotóxica de la fracción hexánica de acuerdo con estudios previos (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011a).

Tabla 3.2 Concentración citotóxica media de las subfracciones activas (desviación estándar).

Subfracción	CC50 ± DE	Subfracción	CC50 ± DE
BMR-4d	17.12 ± 1.31	**BMR-6f**	39.63 ± 1.02
BMR-4f	20.67 ± 1.26	**BMR-6g**	35.32 ± 1.08
BMR-4g	24.84 ± 1.43	**BMR-6h**	25.62 ± 1.23
BMR-5d	34.98 ± 1.01	**BMR-6i**	20.07 ± 1.21
BMR-5e	31.50 ± 1.03	**BMR-7d**	37.56 ± 1.01
BMR-5f	20.98 ± 1.30	**BMR-7f**	40.41 ± 1.01
BMR-5g	21.12 ± 1.42	**BMR-7g**	21.34 ± 1.27
BMR-5h	15.98 ± 1.16	**BMR-7h**	34.27 ± 1.02
BMR-5i	13.88 ± 1.17	**BMR-7i**	37.27 ± 1.03
BMR-5j	42.63 ± 1.03	**BMR-7j**	41.56 ± 1.04
BMR-6e	27.41 ± 1.05	**BMR-7k**	44.26 ± 1.00

BMR-3e = subfracciones BMR-4, BMR-3f = subfracciones BMR-5
BMR-3g = subfracciones BMR-6, BMR-3h= subfracciones BMR-7

Subfracciones en donde no se encuentra presente el bonediol tuvieron un efecto citotóxico mejor, por lo cual se infiere que existen otros compuestos, además del ya mencionado, responsables de la actividad presente en la fracción hexánica y que pudieran ser más potentes. El efecto biológico de los cinco compuestos elegidos para su estudio espectroscópico (de 14 compuestos aislados) se muestra en las Tablas 3.3 y 3.4, resaltando aquellos compuestos con mejor actividad en las diferentes líneas celulares cancerígenas evaluadas.

3.3.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Tabla 3.3 Concentración citotóxica media para cada compuesto en las diferentes líneas celulares.

	CC_{50} µg/mL ± DE (IS)				
Compuestos	**Vero**	**HeLa**	**SiHa**	**MCF-7**	**DU-145**
BMR-5g1	186.6 ± 1.10	48.67 ± 1.24 (3.8)	22.28 ± 1.31 (8.4)	38.37 ± 1.20 (4.9)	27.09 ± 1.24 (6.9)
BMR-7k1	427.1 ± 1.36	137.4 ± 1.69 (3.1)	75.13 ± 1.66 (5.7)	123.4 ± 1.26 (3.5)	120.4 ± 1.36 (3.5)
BMR-10d1	215.1 ± 1.19	72.80 ± 1.36 (3.0)	36.56 ± 1.31 (5.9)	62.01 ± 1.15 (3.5)	46.13 ± 1.19 (4.7)
BMR-11a1	331.6 ± 1.25	90.65 ± 1.55 (3.7)	78.01 ± 1.29 (4.3)	62.65 ± 1.13 (5.3)	108.4 ± 1.20 (3.1)
BMR-14f1	169.6 ± 1.14	38.24 ± 1.12 (4.4)	39.88 ± 1.24 (4.3)	39.32 ± 1.26 (4.3)	47.25 ± 1.11 (3.6)
Docetaxel	1.1 ± 0.05	0.20 ± 0.01 (5.5)	0.18 ± 0.02 (6.1)	0.01 ± 0.03 (110)	0.007 ± 0.01 (157)

Docetaxel control positivo.
DE = desviación estándar, entre paréntesis se especifica el índice de selectividad (IS).

Tabla 3.4 Concentración inhibitoria media para cada compuesto en las diferentes líneas celulares.

	CI_{50} µg/mL ± DE (IS)				
Compuestos	**Vero**	**HeLa**	**SiHa**	**MCF-7**	**DU-145**
BMR-5g1	129.8 ± 1.39	102.1 ± 1.02 (1.3)	73.63 ± 1.23 (1.8)	63.28 ± 1.25 (2.1)	46.27 ± 1.16 (2.8)
BMR-7k1	1284 ± 1.09	---	219.6 ± 1.23(5.8)	210.0 ± 1.57 (6.1)	158.5 ± 1.03 (8.1)
BMR-10d1	242.4 ± 1.42	136.5 ± 1.48 (1.8)	61.91 ± 1.46 (3.9)	84.31 ± 1.21 (2.9)	139.4 ± 1.42 (1.7)
BMR-11a1	352.5 ± 1.40	165.1 ± 1.48 (2.1)	59.88 ± 1.15 (5.9)	84.93 ± 1.20 (4.2)	127.2 ± 1.51 (2.8)
BMR-14f1	142.4 ± 1.13	67.04 ± 1.08 (2.1)	24.66 ± 1.14 (5.8)	53.31 ± 1.21 (2.7)	36.77 ± 1.23 (3.9)
Docetaxel	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.01 (3.6)	0.08 ± 0.03 (1.3)	0.01 ± 0.04 (11)	0.01 ± 0.02 (11)

--- sin actividad.
DE = desviación estándar, entre paréntesis se especifica el índice de selectividad (IS).

El compuesto BMR-5g1 (compuesto I) mostró la mejor actividad citotóxica de los cinco compuestos evaluados, observando su mayor efecto contra la línea de células escamosas de cáncer cervicouterino (SiHa), además de la línea de cáncer de próstata (DU-145) y la línea de cáncer de mama (MCF-7) en las cuales la actividad citotóxica fue un poco más baja (22.28, 27.09, 38.37 µg/mL respectivamente), seguido por BMR-10d1 (compuesto III) que presentó actividad citotóxica (36.56 µg/mL) contra la línea celular SiHa y, por último, el triterpeno marcado como BMR-14f1 (compuesto V) presentó acción citotóxica sobre tres de las líneas celulares, SiHa, HeLa y MCF-7 (39.88, 38.24 y 39.32 µg/mL respectivamente), presentando un mejor efecto antiproliferativo en SiHa y DU-145 (24.66, 36.77 µg/mL respectivamente). Como se observa en la Tabla 3.3 todos los compuestos tuvieron un efecto citotóxico mejor en la línea de células escamosas de cáncer cervicouterino (SiHa) con respecto a las demás líneas cancerígenas, sin embargo, aunque es evidente el aumento del efecto, no logran ser potentes para ellos; la mayoría de los metabolitos evaluados tienen un bajo índice de selectividad.

En este trabajo los análisis previos indican que diferentes fracciones presentaron una mayor actividad citotóxica cuando estos se encontraban aún en combinación con otros. Edgar Caamal *et al*. (2012) aislaron diferentes compuestos: el triterpeno tirucalan-7,24-dien-3β-ol, el compuesto estigmaste-7,16-dien-3-ol, una mezcla de ácidos grasos y el bonediol, de los cuales sólo el último metabolito fue el responsable de la actividad observada en la fracción hexánica de esta especie. Estructuralmente algunos de los metabolitos responsables del efecto citotóxico son similares al compuesto bonediol, sin embargo, la actividad observada en los compuestos puros en este estudio no fue mejor que el obtenido por el compuesto aislado anteriormente; el compuesto bonediol posee una CI_{50} = 8.3 µg/mL contra la línea celular SiHa, mientras que los compuestos BMR-5g1 y BMR-10d1 (similares estructuralmente) poseen una CI_{50} baja (73.63 y 61.91 µg/mL, respectivamente), sin embargo, la CC_{50} observada fue mejor (22.28, 36.56 µg/mL), concluyendo que los compuestos evaluados tuvieron un mejor efecto citotóxico que antiproliferativo.

Considerando que cada fracción contiene un conjunto de metabolitos, la falta o la poca actividad citotóxica que presentaron los compuestos de este estudio podría explicarse por diversas razones, una explicación sería que los compuestos aislados no son los responsables de la actividad y que otros compuestos no aislados o que fueron aislados pero no se lograron evaluar (por tener reducida cantidad de muestra) sean los responsables de la actividad presente en estas fracciones. Sin embargo, aunque los metabolitos aislados en este trabajo poseen un débil efecto citotóxico, es probable que presenten otro tipo de efecto biológico.

Los compuestos con grupos fenoles presentan diversas actividades bilógicas. Abliz *et al*. (2015) encontraron que el extracto de una planta de China rica en contenidos fenólicos fue responsable de la actividad citotóxica observada en la línea celular de cáncer cervicouterino (SiHa), lo cual es similar a este trabajo, donde la línea celular SiHa fue una de las líneas celulares cancerígenas en donde se observó la mejor actividad citotóxica. BMR-5g1 (compuesto I) y BMR-10d1 (compuesto III) pertenecen al grupo de los ácidos fenólicos, específicamente son alquilresorcinoles, compuestos que se han caracterizado por sus propiedades antioxidantes, bactericidas y citotóxicas (Stasiuk y Kozubek, 2010; Torres de Pinedo *et al*., 2007; Suter y Weston, 1939). En particular, un estudio reportado por Chang *et al*. (2011) mostró una potente actividad antituberculosa para el compuesto 3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol (nombrado BMR-5g1 en este trabajo).

Es conocido que la relación estructura-actividad también es un factor crucial. Rojas *et al*. (2006) evaluaron la actividad antimicobacteriana entre protoprimulagenina A (BMR-14f1) y un compuesto similar contra *Mycobacterium tuberculosis*, demostrando que la presencia de un grupo carbonilo en el C-16 en lugar del grupo OH favorece el efecto antimicobacterial. Estudios en donde el triterpeno protoprimulagenina A se encuentra formando parte del esqueleto de una sakurasosaponina (saponina glicosilada), el compuesto presenta un mejor efecto citotóxico en las líneas celulares cancerígenas evaluadas, además de poseer actividad molusquicida y antifúngica (Podolak *et al*., 2013; García-Sosa *et al*., 2011; Sánchez-Medina *et al*., 2009; Kohda *et al*., 1989); siendo el número de azúcares y sitios de glicosilación un factor importante que determina la actividad observada.

Trabajos donde se evaluó la influencia del largo de la cadena lateral en relación a su actividad, demostraron que al aumentar el número de carbonos intensifican el efecto biológico (Girlanda-Junges *et al*., 1998; Razdan *et al*., 1986). La longitud de la cadena alquílica, como la presencia de grupos hidroxilo enlazados al anillo aromático es determinante para la actividad biológica observada; Torres de Pinedo *et al*. (2007) al evaluar la capacidad antioxidante de compuestos derivados de grupos fenólicos observaron que un incremento en el número de carbonos en la cadena o un aumento en los grupos hidroxilo mejoró el efecto observado. Es también importante considerar que el compuesto bonediol contiene en su estructura al grupo catecol (*orto*-dihidroxibenceno) mientras que los compuestos aislados provienen del resorcinol (*meta*-dihidroxibenceno); en trabajos en donde existe un cambio de estructura de resorcinol a catecol, las propiedades bactericidas de los compuestos se modifican (Suter y Weston, 1939; Miller *et al*., 1938), esto podría explicar porqué el compuesto bonediol que contiene una cadena lateral de 11 carbonos y dos grupos hidroxilo (*orto*-dihidroxibenceno), perteneciente al grupo catecol, presenta una mejor actividad en comparación con los compuestos similares aislados en este trabajo, con cadenas laterales menores de 10 carbonos y solamente con un grupo hidroxilo.

Otra característica estructural importante es un grupo metilo enlazado al benceno. Según lo observado en un estudio por Chang *et al*. (2011), un compuesto similar a BMR-5g1, pero sin este grupo metilo, disminuyó su actividad antituberculosa comparado con un compuesto que sí poseía este grupo metilo, determinando un mejor efecto, similar a lo observado en otros trabajos, en donde tampoco presentaron actividad los compuestos sin el grupo metilo (Girlanda-Junges *et al*., 1998), razón que explicaría porqué el compuesto BMR-5g1 mostró un mejor efecto citotóxico que el compuesto BMR-10d1 (similares estructuralmente).

La necesidad de interacción entre los compuestos para poder observar un mejor efecto es otro punto a considerar. Varios estudios demuestran que la combinación de diversos compuestos producen un efecto sinérgico, es decir, que para poder observar actividad biológica es necesario encontrarse en forma de mezclas; Ghavami *et al*. (2011)

demostraron que se produjo un efecto sinérgico al utilizar el cisplatino o doxorrubicina (fármacos utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer) en combinación con algún extracto derivado de distintas especies herbales contra líneas de cáncer ovárico y adenocarcinoma renal; se observó que la combinación del extracto con el fármaco aumentó el efecto anticancerígeno. Por lo general, los tratamientos contra diversas enfermedades son una combinación de fármacos, los llamados cocteles, con el objetivo de potenciar el efecto de estos (Chou *et al*., 2006). Un estudio realizado por Eid *et al*. (2012) reveló que la combinación de doxorrubicina intensificó su actividad citotóxica en combinación con algún metabolito secundario, tales como alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos (glaucina, timol, mentol, β-sitosterol, etc.), y se intensificó aún más cuando se añadió un tercer fármaco (digitonina), demostrando el efecto sinérgico de éstos, remarcando que no solamente es mejor la combinación de ellos, sino que esto podría ser útil para reducir la dosis tóxica y mantener la eficacia terapéutica. Estas razones podrían explicar la necesidad de evaluar los compuestos en combinación para mejorar la actividad de los compuestos aislados, evaluando el posible efecto sinérgico.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Estudios previos han demostrado que plantas del género *Bonellia* tienen actividad antifúngica, tripanocida y anticancerígena (Buitimea-Cantúa *et al*., 2013; Moo-Puc *et al*., 2013; Caamal-Fuentes *et al.,* 2011; García-Sosa *et al*., 2011; Peña Rodríguez *et al*., 2010; Sánchez-Medina *et al*., 2009), pero escasos trabajos se han realizado sobre la especie *B. macrocarpa*; asimismo, pocos compuestos se han aislado de esta especie y sólo uno de ellos se había encontrado como el causante de la actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer (Caamal-Fuentes *et al.,* 2012; 2011a; 2011b).

Se lograron aislar cinco compuestos, BMR-5g1 (3-metoxi-2-metil-5-pentil fenol, compuesto I), BMR-7k1 (3,5-dihidroxi-1-metil-2,2-dimetil-benzociclobutano, compuesto II), BMR-10d1 [3-metoxi-5-(5',5'-dimetilhexil) fenol, compuesto III], BMR-11a1 (1,3,5,6-tetrametoxi-8-metilnaftaleno, compuesto IV) y BMR-14f1 (3β, 16α-dihidroxi-protoprimulagenina A, compuesto V), correspondiendo a dos lípidos fenólicos, un benzociclobutano, un tetrametoxinaftaleno y un triterpeno de tipo oleanano. Los compuestos aislados en el presente trabajo hasta el momento eran desconocidos en la especie y tres de estos compuestos (BMR-7k1, BMR-10d1 y BMR-11a1) son nuevos, no existen reportes en la literatura, aportando más información sobre la fitoquímica de esta especie.

Los lípidos fenólicos son un tipo de compuestos que exhiben una marcada propiedad anfifílica, lo que explica la facilidad para incorporarse a la bicapa lipídica de las membranas biológicas, y se encuentran en plantas superiores como el trigo y centeno (Stasiuk y Kozubek, 2010). De acuerdo a estudios científicos, este tipo de compuestos poseen diversos efectos biológicos (mencionados en el capítulo anterior). Los metabolitos secundarios aislados BMR-5g1 y BMR-10d1 son ejemplos de este tipo de compuestos. Reportes en la literatura indican que el compuesto BMR-5g1 (3-metoxi-2-metil-5-pentilfenol), derivado específicamente de los alquilresorcinoles, que aunque no presentó

un efecto citotóxico intenso, posee una actividad antituberculosa potente (Chang *et al*., 2011). El compuesto BMR-7k1 pertenece al grupo de los benzociclobutenos; este tipo de compuestos se encuentran formando parte de la estructura de una nueva clase de agentes antitumorales, los benzociclobutacarbazoles (Graf-Christophe *et al*., 2000; Christophe *et al*., 1998). Aunque no se observó una actividad citotóxica ni antiproliferativa de este compuesto en el presente trabajo, la presencia del grupo carbazol (compuesto aromático heterocíclico, con un anillo de pirrol y dos anillos de benceno fusionados) produce un cambio determinante para poder observar un mejor efecto biológico. Los compuestos tetrametoxinaftalenos, como BMR-11a1 (1,3,5,6-tetrametoxi-8-metil-naftaleno), han sido utilizados como precursores para sintetizar diversas moléculas con mejores propiedades, que sean capaces de intensificar la actividad citotóxica contra células cancerígenas o producir compuestos con efecto algicida; además, compuestos derivados de naftaleno han mostrado actividad antiparasitaria (Kwon *et al*., 2013; Ganapaty *et al*., 2006; Song *et al*., 2000). El último compuesto aislado fue un triterpeno, BMR-14f1, el cual demostró poseer un modesto efecto citotóxico. En la literatura se ha reportado un compuesto similar como responsable de actividad antituberculosa (Rojas *et al*., 2006) y de actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer cervicouterino humano (HeLa) y una línea celular de leucemia de macrófagos de ratón (RAW 264.7) cuando se encuentra formando parte del esqueleto de una sakurasosaponina (Sánchez-Medina *et al*., 2009).

Los compuestos aislados fueron capaces de producir un mejor efecto citotóxico que antiproliferativo y tres compuestos (BMR-5g1, BMR-10d1 y BMR-14f1) mostraron modesta actividad contra alguna de las diferentes líneas celulares de cáncer (SiHa, HeLa, MCF-7 y DU-145); sin embargo, aunque el efecto citotóxico no fue potente, la citotoxicidad sobre las células normales de riñón de mono verde africano (Vero) fue menor en comparación con las líneas celulares cancerígenas, siendo estos metabolitos menos dañinos y más seguros para las células normales; además, es posible que en combinación estos metabolitos sean capaces de mejorar su efecto citotóxico y/o antiproliferativo contra las líneas celulares cancerígenas. El tipo de grupo funcional, la presencia o no de una cadena lateral, el tamaño de esta cadena alquílica, como la posición en la que se encuentra en la molécula son factores que determinan el efecto biológico observado.

Es importante considerar que por razones de tiempo no fue posible aislar más metabolitos de la fracción hexánica y que existen subfracciones en las que no está presente el bonediol (metabolito responsable de la actividad antiproliferativa de *B. macrocarpa* en un estudio previo) que presentaron mejor actividad citotóxica, con un porcentaje de muerte celular de 70-80% (CC_{50} < 30 µg/mL), mientras que las subfracciones donde se encontraba el bonediol el efecto fue menor del 50% (CC_{50} < 40 µg/mL) contra la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa); así, se infiere que otros compuestos de las subfracciones sin bonediol son responsables del efecto citotóxico en esta línea celular y es probable que exista un metabolito con mejor actividad citotóxica en la raíz de *B. macrocarpa*.

Más estudios son necesarios en busca del metabolito ideal, que sea capaz de poseer un efecto citotóxico y antiproliferativo potente, con alto índice de selectividad. Así, de la raíz de la especie *B. macrocarpa*, al estar poco estudiada, faltan muchos compuestos por aislar y evaluar. En el presente trabajo se reveló el potencial anticancerígeno de esta planta, ya que es probable que los metabolitos aislados y que mostraron tener una actividad moderada, en combinación podrían intensificar su actividad biológica. Por lo anterior, más investigaciones son necesarias sobre esta especie, ahondar sobre el mecanismo de acción de los metabolitos aislados, su posible efecto sinérgico, sus diferentes efectos biológicos además del anticancerígeno, así como estudios *in vivo* que corroboren el efecto observado a nivel *in vitro*.

A la especie *B. macrocarpa* todavía le faltan más análisis químicos y biológicos, pero con lo aportado en este trabajo esperamos que sea de gran ayuda para los investigadores interesados en esta especie.

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la raíz de *B. macrocarpa* posee diversos metabolitos que le confieren la capacidad citotóxica y antiproliferativa a la fracción de baja polaridad (Hx) del extracto metanólico. Sin embargo, aunque la actividad citotóxica de la mayoría de los compuestos aislados fue mejor (menor de 40 µg/mL) en comparación con la actividad antiproliferativa, el efecto citotóxico observado fue bajo.

Dos de los compuestos aislados que fueron responsables del efecto biológico son similares estructuralmente al compuesto bonediol.

4.3. PERSPECTIVAS

Continuar con el aislamiento de compuestos de las subfracciones activas que faltaron en ser estudiadas y que tienen rendimientos mayores de 100 mg (BMR-4g, BMR-6f, BMR-7f y BMR-7h) y determinar su actividad biológica.

Identificar el mecanismo de acción de los compuestos aislados involucrados en la muerte celular de las líneas cancerígenas.

Determinar la ruta de síntesis de los compuestos.

Efectuar pruebas biológicas *in vivo* de los compuestos con mayor actividad citotóxica.

Determinar si existe sinergismo entre los compuestos aislados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K., A.H., Lichtman y S.J. Pober (2002). Inmunología Celular y Molecular, 4ª edición, McGraw-Hill Interamericana, Madrid. pp. 398-417.

Abbott, D. y Andrews R.S. (1977). Introducción a la Cromatografía, 3ª. edición, Editorial Alhambra, Madrid. pp. 26-30 y 37-41.

Abliz, G., F. Mijit, L. Hua, G. Abdixcur, T. Ablimit, N. Amad y H. Upur (2015). Anti-carcinogenic effect on the phenolic-rich extract from abnormal *Sadva Munziq* in association with its cytotoxicity, apoptosis inducing properties and telomerase activity in human cervical cancer cells (SiHa). Complementary and Alternative Medicine 15, 1-10.

Agosta, W. (1997). Medicines and drugs from plants. Section: history, education and documentation. Journal of Chemical Education, 74, 857-860.

Alison, M. (2001). Cancer. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, Imperial College School of Medicine, London. pp. 1-8.

Alonso-Castro, A.J., M.L. Villarreal, L.A. Salazar-Olivo, M. Gómez-Sánchez, F. Domínguez y A. García-Carranza (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. Journal of Ethnopharmacology, 133, 945-972.

Anyaehie, U.B. (2009). Medicinal properties of fractionated acetone/water (*Azadirachta indica*) leaf extract from Nigeria: a review. Journal of Physiological Sciences, 24, 157-159.

Arias, T.D. (1999). Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud, Washington. pp. 44.

Ávalos-García, A. y E. Pérez-Urria Carril (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología), Fisiología Vegetal, 2, 119-145.

Azrad, M., C. Turgeon y W. Demark-Wahnefried (2013). Current evidence linking polyunsaturated fatty acids with cancer risk and progression. Frontiers in Oncology, 3, 1-12.

Bayor, M.T., J.S.K. Ayim, R.M. Phillips, S.D. Shnyder y C.W. Wright (2007). The evaluation of selected Ghanaian medicinal plants for cytotoxic activities. Journal of Science and Technology, 27, 16-22.

Boyle, P. y P. Boffetta (2009). Alcohol consumption and breast cancer risk. Breast Cancer Research, 11, 1-4.

Braithwaite, A. y F.J. Smith (1999). Chromatographic Methods. Springer Science & Business Media, New York. pp. 1-14, 44-80, 124, 125.

Buitimea-Cantúa, G.V., E.M. Rosas-Burgos, F.J. Cinco-Moroyoqui, A. Burgos-Hernández, M. Plascencia-Jatomea, M.O. Cortez-Rocha y J.C. Gálvez-Ruiz (2013). *In vitro* effect of antifungal fractions from the plants *Baccharis glutinosa* and *Jacquinia macrocarpa* on chitin and β-1,3-glucan hydrolysis of maize phytopathogenic fungi and on the fungal β-1,3-glucanase and chitinase activities. Journal of Food Safety, 33, 526-535.

Caamal-Fuentes, E., L.W. Torres-Tapia, R. Cedillo-Rivera, R. Moo-Puc y S.R. Peraza-Sánchez (2011a). Bonediol, a new alkyl catechol from *Bonellia macrocarpa*. Phytochemistry Letters, 4, 345-347.

Caamal-Fuentes, E., L.W. Torres-Tapia, P. Simá-Polanco, S.R. Peraza-Sánchez y R. Moo-Puc (2011b). Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. Journal of Ethnopharmacology, 135, 719-724.

Caamal-Fuentes, E. (2012). Evaluación citotóxica de metabolitos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes a cáncer. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 45-55.

Calderón, A.I., Y. Vázquez, N.P. Solís, C. Caballero-George, S. Zacchino, A. Gimenez, R. Pinzón, A. Cáceres, G. Tamayo, M. Correa y M.P. Gupta (2006). Screening of Latin-American plants for cytotoxic activity. Pharmaceutical Biology, 44, 1-11.

Carnevali, F.C.G., J.L. Tapia-Muñoz, R. Duno de Stefano y I. Ramírez Morillo (2010). Flora Ilustrada de la Península de Yucatán: Listado Florístico. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México.

Castillo-Campos, G., M.E. Medina y S. Hernández (1998). *Theophrastaceae*. Flora de Veracruz. pp. 1-13.

Chang, C.-P., H.-S. Chang, C.-F. Peng, S.-J. Lee y I.-S. Chen (2011). Antitubercular resorcinol analogs and benzenoid *C*-glucoside from the roots of *Ardisia cornudentata*. Planta Medica, 77, 60-65.

Chou T.-C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological, 58, 621–681.

Christophe, S., C. Kuehm-Caubere, P. Renard, B. Pfeiffer y P. Caubere (1998). Design of new anticancer drugs. II. Easy arynic access to benzocyclobutacarbazoles, a new family of antitumor agents. Tetrahedron Letters, 39, 9431-9434.

Coll, J. y B.F. Bowden (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. Journal of Natural Products, 49, 934-936.

Cragg, G.M. y D.J. Newman (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology, 100, 72-79.

Damián-Badillo, L.M., R. Salgado-Garciglia, R.E. Martínez-Muñoz, M.M. Martínez-Polanco (2008). Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. The Open Natural Products Journal, 1, 27-33.

Dickstein, J.S., J.M. Curto, O. Gutierrez, C.A. Mulrooney y M.C. Kozlowski (2013). Mild aromatic palladium-catalyzed protodecarboxylation: kinetic assessment of the decarboxylative palladation and the protodepalladation steps. Journal of Organic Chemistry, 78, 4744-4761.

Domínguez, A.X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa, México.

Eid, S.Y., M.Z. EL-Readi y M. Wink (2012). Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. Phytomedicine, 19, 1288– 1297.

Fadeyi, S.A., O. Fadeyi, A. Adejumo, C. Okoro y E.L. Myles (2013). In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13, 1-9.

Florea, A.M. y D. Büsselberg (2011). Metals and breast cancer: risk factors or healing agents? Journal of Toxicology, 2011, 1-8.

Ganapaty, S., P.S. Thomas, G. Karagianis, P.G. Waterman y R. Brun (2006). Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. Phytochemistry, 67, 1950-1956.

García-Sosa, K., A. Sánchez-Medina, S.L. Álvarez, S. Zacchino, N.C. Veitch, P. Simá-Polanco y L.M. Peña-Rodriguez (2011). Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. Natural Products Research, 25, 1185-1189.

Genkinger, J.M. y A. Koushik (2007). Meat consumption and cancer risk. PLoS Medicine, 4, 1883-1886.

Gerson, R., A. Serrano y A. Villalobos (2006). Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. Clinical and Translational Oncology, 8, 200-207.

Ghavami, G., S. Sardari y M. Ali Shokrgozar (2011). Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistance tumor cells-ACHN and A2780/cp cell lines. Computer in Biology and Medicine, 41, 665-674.

Girlanda-Junges, C., F. Keyling-Bilger, G. Schmitt y B. Luu (1998). Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. Study on structure-activity relationship. Tetrahedron, 54, 7735-7748.

González, M., E. Espinosa, J. Felio, J. Castro, P. Zamora, A. Ordoñez, A. Redondo, C. Belda (2010). Oncología Clínica. Momento Médico. Iberoamericana, Madrid. pp. 15-25, 71, 76-77.

Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. Clinical Translational Oncology, 9, 767-776.

Graf-Christophe, S., C. Kuehm-Caubere, P. Renard, B. Pfeiffer, A. Pierre, S. Léonce y P. Caubere (2000). Synthesis and antiproliferative activity of benzocyclobutacarbazol derivatives. A new class of potential antitumor agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 2589-2591.

Instituto Nacional del Cáncer (NCI), Cáncer, 2011. Disponible en: www.cancer.gov.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2014. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf (Acceso enero 2014).

Ismail, M., G. Bagalkotkar, S. Iqbal y H.A. Adamu (2012). Anticancer properties and phenolic contents of sequentially prepared extracts from different parts of selected medicinal plants indigenous to Malaysia. Molecules, 17, 5745-5756.

Jaramillo, F., E. Cardona y A. Rincón (2008). Farmacología General. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes. pp. 25-28.

Källersjö, M. y B. Ståhl (2004). Reinstatement of *Bonellia* (*Theophrastaceae*). Novon, 14, 115-118.

Kitagawa, I., Y. Ikenishi, M. Yoshikawa y I. Yosioka (1976). Saponin and sapogenol. XVII. Structure of sakuraso-saponin, a pentaglycoside of protoprimulagenin A from the root of *Primula sieboldi*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 24, 2470-2479.

Kohda, H., O. Takeda y S. Tanaka (1989). Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikokiana*. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 37, 3304-3305.

Kwon, H.L., J.H. Kim, D.H. Na, D. Byeun, Y. Wu, S.W. Kim, E.S. Jin y H. Cho (2013). Combination of 1,4-naphthoquinone with benzothiazoles had selective algicidal effects against harmful algae. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18, 932-941.

Majors, A. y T. Enzweiler (1988). Flash Chromatography. Editorial Advisory Board of LC-GC, pp. 1-4.

Matsushita, Y., I.-C. Jang, T. Imai, K. Fukushima, S.-C. Lee (2010). Naphthalene derivatives from *Diospyros kaki*. Japan Wood Research Society, 56, 418-421.

Mehta, G. y S. Kotha (2001). Recent chemistry of benzocyclobutenes. Tetrahedron, 57, 625-659.

Méndez-González, M., R. Duran-García, R. Borgez-Argáez, S. Peraza-Sánchez, A. Duran-Euán, J. Tapia-Muñoz, W. Torres-Avilez y M. Ferrer-Cervantes (2012). Flora Medicinal de los Mayas Peninsulares. CICY, Yucatán, México. pp. 39-40.

Miller, E., W.H. Hartung, H.J. Rock y F.S. Crossley (1938). Antiseptics. IV.[1] Alkyl Catechols. Journal of the American Chemical Society, 60, 7–10.

Moo-Puc, R., J. Chale-Dzul y E. Caamal-Fuentes (2013). *Bonellia albiflora*: A Mayan medicinal plant that induces apoptosis in cancer cells. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-8.

National Geographic Society, 1996-2013. Disponible en: www.nationalgeographic.com.es (acceso enero 2015).

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2013. Disponible en: http://www.who.int/es (Acceso octubre 2013).

Panghal, M., V. Kaushal y J. Yadav (2011). *In vitro* antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 10, 1-11.

Pelletier, S.W., H.P. Chokshi y H.K. Desai (1986). Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. Journal of Natural Products, 49, 892-900.

Peña Rodríguez, L.M., R. Durán García, B.M. Vera Ku, A.G. Fuentes García, D.B. Domínguez Carmona (2010). Flora nativa como fuente potencial de nuevos fármacos. En: Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, R. Durán y M. Méndez (Eds.), CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Yucatán, México. pp. 475-481.

Podolak, I., P. Koczurkiewicz, M. Michalik, A. Galanty, P. Zadjel y Z. Janeczko (2013). A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia*. Carbohydrate Research, 375, 16-20.

Ramírez, G., M. Zavala, J. Pérez y A. Zamilpa (2012). *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. Hindawi Publishing Corporation, 1-6.

Razdan, R.K. (1986). Structure-activity relationships in cannabinoids. Pharmacological Reviews 38, 75-149.

Rojas, R., L. Caviedes, J.C. Aponte, A.J. Vaisberg, W.H. Lewis, G. Lamas, C. Sarasara, R.H. Gilman y G.B. Hammond (2006). Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. Journal of Natural Products, 69, 845-846.

Sánchez-Medina, A., L.M. Peña-Rodríguez, F. May-Pat, G. Karagianis, P.G. Waterman, A. Mallet y S. Habtemariam (2009). Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. Natural Product Communications, 4, 1-6.

Secretaría de Salud de Yucatán, 2013. Disponible en: salud.yucatan.gob.mx/ (Acceso febrero 2013).

Shahneh, F.Z., S. Valiyari, A. Azadmehr, R. Hajiaghaee, S. Yaripour, A. Bandehagh y B. Baradaran (2013). Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by *Echinophoraplatyloba* DC: in vitro analysis. Hindawi Publishing Corporation, Advances in Pharmacological Sciences, 1-7.

Sierra, L., F. Calvo, I. Villa y J. Cañadell (1992). Oncología Pediátrica. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España. pp. 1-4.

Silverstein, R.M., F.X. Webster y D.J. Kiemle (2005). Spectrometric Identification of organic compounds (seventh edition). Editorial John Wiley δ Sons, New York.

Smith, I. y J.G. Feinberg (1979). Cromatografía Sobre Papel y Capa Fina. Electroforesis. Editorial Alhambra, Madrid, España. pp 181-183, 193, 219.

Song, G., Y. Kim, X.G. Zheng, Y.J. You, H. Cho, J.H. Chung, D.E. Sok y B.Z. Ahn (2000). Naphthazarin derivatives (IV): synthesis, inhibition of DNA topoisomerase I and cytotoxicity of 2- or 6-acyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones. Journal of Medicinal Chemistry, 35, 291−298.

Stasiuk, M. y A. Kozubek (2010). Biological activity of phenolic lipids. Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 841-860.

Stavrovskaya, A.A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry Review, 65, 95-106.

Suter, C.M. y A.W. Westo (1939). The synthesis and bactericidal properties of some 5-n-alkylresorcinols. Journal of the American Chemical Society, 61, 232-236.

Torres de Pinedo, A., P. Peñalver y J.C. Morales (2007). Synthesis and evaluation of the new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. Food Chemistry, 103, 55-61.

Unión de Yucatán, 2012. Disponible en: www.unionyucatan.mx

Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. Methods in Molecular Medicine, 110, 39-48.

Watson, J.T. y O.D. Sparkman (2007). Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. Editorial Wiley John and sons, England. pp 3-25.

Wu, J.W., A.J. Cross, D. Baris, M.H. Ward, M.R. Karagas, A. Johnson, M. Schwenn, S. Cherala, J.S. Colt, K.P. Cantor, N. Rothman, D.T. Silverman y R. Sinha (2012). Dietary intake of meat, fruits, vegetables, and selective micronutrients and risk of bladder cancer in the New England region of the United States. British Journal of Cancer, 106, 1891-1898.

Zeiger, E. y L. Taiz (2006). Fisiología Vegetal. Universitat de Jaume I, España. pp. 531-534.

Zhang, L., A.S. Ravipati, S.R. Koyyalamudi, S.C. Jeong, N. Reddy, P.T. Smith, J. Bartlett, K. Shanmugam, G. Münch y M.J. Wu (2011). Antioxidant and anti-inflammatory

activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 12361-12367.