



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo
de metabolitos aislados de *Phoradendron
vernicosum***

Tesis que presenta

LÍA SARAHI VALENCIA CHAN

En opción al título de

DOCTORA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

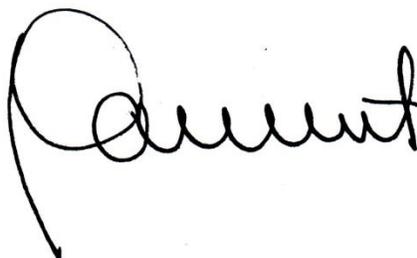
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Lía Sarahi Valencia Chan** titulado “**Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo de metabolitos aislados de *Phoradendron vernicosum***” fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Biotecnología de Productos Naturales, bajo la asesoría del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, y de la Dra. Rosa Esther Moo Puc, de la Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades 1 Mérida, Yucatán del Instituto Mexicano del Seguro Social, 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 10 de agosto de 2018.

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 del Instituto Mexicano del Seguro Social; 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 dichos Centros 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 al Instituto Mexicano del Seguro Social; y al en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán 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: LÍA SARAHI VALENCIA CHAN

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y en la Unidad de Investigación Médica Yucatán de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y forma parte del proyecto de Ciencia Básica 2010 Conacyt 156755 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, en el que se participó bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, y Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades 1 Mérida, Yucatán del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la **Dra. Rosa Esther Moo Puc**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 156755 con el título “Estudio químico y determinación del potencial como fuente de fármacos antineoplásicos de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento del cáncer” y por la beca mensual otorgada con el número 423469/290915.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Biotecnología; así como la Unidad de Investigación Médica Yucatán de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

A mis directores de tesis el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosa E. Moo Puc, por la confianza brindada, por sus valiosas aportaciones y consejos para la realización y culminación del trabajo de tesis.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, por su valiosa ayuda y consejos brindados en las técnicas cromatográficas y obtención de datos espectroscópicos de IR, masas de baja resolución y el manejo del medidor de punto de fusión, en la presente tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial, predoctoral y H. sínodo, la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, Dra. Cecilia Mónica García Rodríguez, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón, Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dr. Leovigildo Quijano y el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, por los consejos y críticas constructivas que ofrecieron para mejorar el escrito presente.

Al apoyo de la Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa por la beca otorgada en la realización de la estancia de Investigación, con el número de proyecto CONACyT 271609.

Al Centro Médico Nacional Siglo XXI, en especial a la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas (UIMEO) y al Laboratorio de Células Troncales Leucémicas, por todas las facilidades otorgadas en la realización de la estancia de investigación.

A la Dra. María Antonieta Chávez Gonzáles, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme todo su apoyo, sus conocimientos, amabilidad, su paciencia y enseñanza.

A la Dra. Dafné Linda Moreno Lorenzana, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su increíble apoyo en la estancia de investigación, desde el manejo y cultivo

de las células leucémicas, el manejo del citómetro, hasta las altas horas en el mismo y la interpretación de los datos, pero sobre todo por su invaluable amistad.

Al Dr. Emanuel Hernández Núñez, del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, por los espectros de RMN, su apoyo en el mismo y las largas horas en el equipo para la obtención de los experimentos selectivos.

Al M. en C. Manlio Graniel Sabido y Dr. Gumersindo Mirón López, de la Facultad de Química-UADY, por los espectros de masas de alta resolución y de RMN, respectivamente.

Al Téc. Paulino Simá, de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, por el apoyo brindado para la identificación taxonómica y colecta del material vegetal.

Al M. en C. Jimmy Josué Ceballos Cruz, por su apoyo objetivo en la discusión de los espectros de RMN y en general de toda la tesis, por su amistad, consejo y amor.

A mis amigos y colegas científicos por sus consejos, discusiones, aprendizaje, amistad y gozo: Cristina Castillo, Héctor Peniche, Uriel Figueroa, Ana Carrillo, Carlos Castañeda, Leonor Vila, Ashanty Baas, Gabriela Medina, Roger Sulub, Antonio Poot, Aarón Rangel, Edwin Martínez, Carlos Quintal, Juan Chalé, Jordán Alvarado, Lilian Chel Guerrero, Carmen García Ochoa, María del Carmen Duarte, Cristhian Salazar, Max Servín, Sandy Centeno, Patricia Torres, Mercedes Barradas, Elizabeth Aldana y Gabi Flores.

Parte del contenido de este trabajo fue publicado en la revista *Journal of Natural Products*, 2017, 80, 3038-3042 bajo el título: "Lupane-Type Triterpenes of *Phoradendron vernicosum*".

DEDICATORIAS

Más que una dedicatoria es un agradecimiento, al Rey de reyes, Señor de Señores, a mi Padre Celestial y Eterno, a Jesucristo por haberme llenado tanto de Él, por haber cambiado ese corazón de piedra y darme una nueva oportunidad, y al Espíritu Santo, por su guía en este trabajo y los derivados del mismo, a ellos toda la Gloria, la Honra y la Alabanza, porque sin ellos nada soy.

A mis amados padres y hermanos, por su cariño, amor, consejos, apoyo y comprensión.

A mi amado esposo Jimmy Ceballos, por ser mi esposo, amigo, colega y hermano; gracias te doy por ser la persona que eres en Cristo Jesús.

A mis amados amigos y hermanos en Cristo: Carmen, Lilian, Ma. del Carmen, Cristhian, Jordán, Ingrid, Evelyn, Laurita, Lore, José Carlos, Leslie, Guadalupe, Tere y Abelardo.

“No se amolden al mundo actual, sino sean transformados mediante la renovación de su mente...”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. Cáncer	3
2.Tratamientos contra cáncer	4
3.Los productos naturales como fuente de moléculas con actividad anticancerígena	6
4. Medicina tradicional	8
5. Género <i>Phoradendron</i>	9
6. <i>Phoradendron vernicosum</i>	14
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	20
CAPÍTULO II	21
AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Phoradendron vernicosum</i>.....	21
2.1. INTRODUCCIÓN.....	21

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
2.2.1.Procedimientos generales.....	21
2.2.2.Material vegetal	23
2.2.3. Obtención del extracto metanólico y particiones orgánicas	23
2.2.4. Estudio fitoquímico de la fracción hexánica (PVP-2A).....	25
2.2.5. Estudio fitoquímico de la fracción diclorometánica (PVP-2B).....	28
2.2.6. Estudio fitoquímico de la fracción de acetato de etilo (PVP-2C).....	30
2.2.7. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos	32
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	38
CAPÍTULO III	123
EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS TUMORALES DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Phoradendron verniosum</i>	123
3.1. INTRODUCCIÓN.	123
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	123
3.2.1.Procedimientos generales.....	123
3.2.2.Líneas celulares	123
3.2.3. Bioensayos de actividad citotóxica.....	124
3.2.4. Bioensayos de actividad antiroliferativa	124
3.2.5. Análisis de los resultados.....	125
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	126

3.3.1. Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas de la partición del extracto metanólico.....	126
3.3.2. Actividad citotóxica de las fracciones primarias.....	126
3.3.3. Actividad citotóxica de los metabolitos.	127
3.3.4. Actividad antiproliferativa de los metabolitos.	129
3.3.5. Información previa de actividad frente líneas celulares de cáncer de los compuestos aislados	132
CAPÍTULO IV	137
4.1. Discusión general	137
4.2. Conclusiones.	154
4.3. Perspectivas.....	155
BIBLIOGRAFÍA	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Alcaloides aislados de *Catharathus roseus* 6

Figura 1.2. Estructura de paclitaxel (Taxol®) 7

Figura 1.3. Estructura de docetaxel (Taxotere®)..... 7

Figura 1.4. Estructura de camptotecina..... 7

Figura 1.5. Estructura de irinotecan 7

Figura 1.6. Estructura de topotecan 8

Figura 1.7. Estructura de etopósido 8

Figura 1.8. Estructura de podofilotoxina 8

Figura 1.9. Triterpenos aislados de *P. reichenbachianum*..... 11

Figura 1.10. Esteroles aislados de *P. reichenbachianum* 11

Figura 1.11. Compuestos aislados de *P. juniperinum*..... 12

Figura 1.12. Compuestos aislados de *P. brachystachyum* 13

Figura 1.13. Flavonoides aislados de *P. tomentosum* 13

Figura 1.14. Compuestos identificados de *P. liga*..... 14

Figura 1.15. Especie *Phoradendron vernicosum* en su hábitat natural..... 15

Figura 1.16. Compuestos aislados de la especie *P. vernicosum*..... 16

Figura 1.17. Estrategia experimental planteada para este trabajo..... 20

Figura 2.1. Fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de *Phoradendron vernicosum*..... 24

Figura 2.2. Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-3C y PVP-3F de la fracción hexánica (PVP-2A) de <i>Phoradendron vernicosum</i>	26
Figura 2.3. Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-3G, PVP-3H y PVP-3I de la fracción hexánica (PVP-2A) de <i>Phoradendron vernicosum</i>	28
Figura 2.4. Aislamiento de metabolitos de la fracción diclorometánica (PVP-2B) de <i>Phoradendron vernicosum</i>	30
Figura 2.5. Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-26A y PVP-26B de la fracción de acetato de etilo (PVP-2C) de <i>Phoradendron vernicosum</i>	31
Figura 2.6. Espectro de IR (película) del compuesto I.....	38
Figura 2.7. Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentación del compuesto I.....	39
Figura 2.8. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto I en CDCl ₃ a 400 MHz.....	40
Figura 2.9. Espectro de RMN- ¹³ C en CDCl ₃ a 100 MHz del compuesto I.....	40
Figura 2.10. Estructura del compuesto I (lupenona).....	41
Figura 2.11. Espectro de IR (pastilla KBr) del compuesto II.....	42
Figura 2.12. Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto II.....	43
Figura 2.13. Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de frgmentos del compuesto II.....	44
Figura 2.14. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto II en piridina- <i>d</i> ₅ a 600 MHz.....	45
Figura 2.15. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto II en piridina- <i>d</i> ₅ a 150 MHz.....	46
Figura 2.16. Estructura del compuesto II (ácido betulínico).....	46
Figura 2.17. Espectro de IR (película) del compuesto III.....	48

Figura 2.18. Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto III	49
Figura 2.19. Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto III	49
Figura 2.20. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto III en (CD ₃) ₂ CO a 400 MHz.....	50
Figura 2.21. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto III en (CD ₃) ₂ CO a 150 MHz.....	51
Figura 2.22. Estructura del compuesto III (ácido 3- <i>epi</i> -betulínico).....	51
Figura 2.23. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto IV en CDCl ₃ a 600 MHz.....	53
Figura 2.24. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto IV con CDCl ₃ a 150 MHz.	54
Figura 2.25. Experimento NOESY del compuesto IV con CDCl ₃	55
Figura 2.26. Estructura del compuesto IV (ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28 oico).....	55
Figura 2.27. Espectro de IR (película) del compuesto V	57
Figura 2.28. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto V a 600 MHz en CDCl ₃	58
Figura 2.29. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto V a 150 MHz en CDCl ₃	59
Figura 2.30. Estructura del compuesto V (betulona).....	60
Figura 2.31. Espectro de IR (película) del compuesto VI	60
Figura 2.32. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto VI en CDCl ₃ (400 MHz).	61
Figura 2.33. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto VI en CDCl ₃ (150 MHz)	62
Figura 2.34. Estructura del compuesto VI (ácido betulónico)	63
Figura 2.35. Placa cromatográfica del compuesto VII comparado con ácido oleanólico..	63
Figura 2.36. Espectro de IR (pastilla KBr) del compuesto VII	64
Figura 2.37. Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto VII	65

Figura 2.38. Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto VII	65
Figura 2.39. Estructura del compuesto VII (ácido oleanólico).....	66
Figura 2.40. Placa cromatográfica del compuesto VIII comparado con betulina.....	66
Figura 2.41. Espectro de IR (película) del compuesto VIII	67
Figura 2.42. Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto VIII	68
Figura 2.43. Espectro de masas y propuestas de fragmentos del compuesto VIII	69
Figura 2.44. Estructura del compuesto VIII (betulina).....	69
Figura 2.45. Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto IX	70
Figura 2.46. Espectro de masas y propuestas de fragmentos del compuesto IX	71
Figura 2.47. Espectro de masas de alta resolución del compuesto IX	72
Figura 2.48. Espectro de IR (película) del compuesto IX	73
Figura 2.49. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto IX en piridina- <i>d</i> ₅ (600MHz).....	74
Figura 2.50. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto IX a 150 MHz en piridina- <i>d</i> ₅	74
Figura 2.51. Orientación del anillo A del compuesto IX	75
Figura 2.52. Ampliación del experimento NOESY del compuesto IX	76
Figura 2.53. Estructura del compuesto IX (ácido 3 α ,24-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico)..	76
Figura 2.54. Espectro de IR (pastilla KBr) del compuesto X	78
Figura 2.55. Espectro de masas de alta resolución del compuesto X	79
Figura 2.56. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto X en piridina- <i>d</i> ₅ (600 MHz).....	80
Figura 2.57. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto IX en piridina- <i>d</i> ₅ (150 MHz).....	81

Figura 2.58. Ampliación del experimento HMBC del compuesto X	82
Figura 2.59. Ampliación del experimento COSY del compuesto X	83
Figura 2.60. Ampliación del experimento HMBC del compuesto X	83
Figura 2.61. Ampliación del experimento HMBC del compuesto X	84
Figura 2.62. Ampliación del experimento COSY del compuesto X	85
Figura 2.63. Espectro selectivo NOESY-1D del compuesto X (A). RMN- ¹ H (600 MHz) del compuesto X (B).....	86
Figura 2.64. Estructura del compuesto X (ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxo-lup-20(29)-en-28-oico).....	86
Figura 2.65. Espectro de masas de alta resolución del compuesto XI	88
Figura 2.66. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) en CDCl ₃ del compuesto XI	89
Figura 2.67. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto XI a 100 MHz con CDCl ₃	90
Figura 2.68. Ampliación del espectro HMBC del compuesto XI	91
Figura 2.69. Ampliación del espectro ROESY del compuesto XI	92
Figura 2.70. A) Espectro del experimento selectivo NOESY-1D del compuesto XI . B) Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) del compuesto XI	93
Figura 2.71. Estructura del compuesto XI (ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-28-oico)	94
Figura 2.72. Estructura propuesta por García-Cámara (2014), para el compuesto XI (ácido 2,24-epoxi-2,3-dihidroxi-20(29)-en-28-oico).	95
Figura 2.73. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del compuesto XII en CDCl ₃ a 600 MHz	96

Figura 2.74. Ampliación del espectro de RMN- ¹³ C del compuesto XII en CDCl ₃ a 150 MHz	97
Figura 2.75. Ampliación del espectro HMBC del compuesto XII	98
Figura 2.76. Ampliación del espectro HMBC del compuesto XII	99
Figura 2.77. Espectro ROESY del compuesto XII	100
Figura 2.78. Estructura del compuesto XII (28- <i>nor</i> lup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol)	100
Figura 2.79. Espectros de RMN- ¹ H del compuesto XIII (A) y compuesto XIV (B) en CDCl ₃ a 600 MHz	102
Figura 2.80. Estructuras posibles para los compuestos XV y XVI (2-metilpentano-2,3,4-triol)	103
Figura 2.81. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) del compuesto XV en CDCl ₃	104
Figura 2.82. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) del compuesto XVI en CDCl ₃	105
Figura 2.83. Comparación de los espectros por RMN-1H (600 MHz) del compuesto XV (A) y el compuesto XVI (B) en CDCl ₃	106
Figura 2.84. Comparación de los espectros por RMN- ¹³ C (150 MHz) del compuesto XV (A) y el compuesto XVI (B) en CDCl ₃	107
Figura 2.85. Estructura del compuesto XVII (2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol)	108
Figura 2.86. Ampliación del espectro de RMN-1H (600 MHz) del compuesto XVII en CDCl ₃	109
Figura 2.87. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H (150 MHz) del compuesto XVII en CDCl ₃	110
Figura 2.88. Espectro de masas del compuesto XVIII	111

Figura 2.89. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del compuesto XIX en piridina- <i>d</i> ₅ a 600 MHz.....	112
Figura 2.90. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto XIX en piridina- <i>d</i> ₅ a 150 MHz	113
Figura 2.91. Experimento HMBC del compuesto XIX en piridina- <i>d</i> ₅	114
Figura 2.92. Ampliación del experimento HMBC del compuesto XIX en piridina- <i>d</i> ₅	115
Figura 2.93. Ampliación del experimento COSY del compuesto XIX en piridina- <i>d</i> ₅	116
Figura 2.94. Estructura del compuesto XIX (28- <i>O</i> -acetil-betulona).....	118
Figura 2.95. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto XX en An- <i>d</i> ₆ a 600 MHz.....	119
Figura 2.96. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del compuesto XX en An- <i>d</i> ₆ a 600 MHz	120
Figura 2.97. Estructura del compuesto XX (naringenina)	120
Figura 4.1. Ruta biogénica propuesta para los triterpenos de esqueleto lupano provenientes del lupeol aislados en este trabajo.....	138
Figura 4.2. Ruta biogénica propuesta para los triterpenos de esqueleto lupano provenientes del 3- <i>epi</i> -lupeol aislados en este trabajo (continuación).....	139
Figura 4.3. Sitios prometidos de los lupanos.....	147
Figura 4.4. Derivados del ácido betulínico con aminoácidos conjugados y su actividad citotóxica.....	148
Figura 4.5. Derivados del acetato de ácido betulínico y su actividad citotóxica	148
Figura 4.6. Derivados en el C-28 de dostriterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica.....	149
Figura 4.7. Derivados en los carbonos C-20 y C-29 de triterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica	149

Figura 4.8. Derivados en el C-30 de triterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica..... 150

Figura 4.9. Derivados de betulina en el C-3 y coumaroilo y su actividad citotóxica 150

Figura 4.10. Derivados glicosilados en el C-3 de lupeol y su actividad citotóxica 151

Figura 4.11. Derivados gliosilados y acetilados de betulina en el C-3 y C-28 y su actividad citotóxica..... 151

Figura 4.12. Derivados glicosilados de ácido betulínico en el C-3 y su actividad citotóxica 152

Figura 4.13. Derivados glicosilados de metil betulinato en el C-3 y su actividad citotóxica 152

Figura 4.5. Derivados de ácido betulínico y su actividad citotóxica en celulas de melanoma (MEL-2) 153

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera *P. vernicosum* 16

Cuadro 1.2. Actividad antiproliferativa e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera *P. vernicosum*..... 17

Cuadro 2.1. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (400 MHz) y RMN-¹³C (100 MHz) determinados en CDCl₃ del compuesto **I** con lupenona 41

Cuadro 2.2. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) determinados en piridina-*d*₅ del compuesto **II** con el ácido betulínico 47

Cuadro 2.3. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) del compuesto **III** con el ácido 3-*epi*-betulínico 52

Cuadro 2.4. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) del compuesto **IV** con el ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico..... 56

Cuadro 2.5. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) determinados en CDCl₃ del compuesto **V** con la betulona 59

Cuadro 2.6. Comparación de los datos espectrocópicos parciales de RMN-¹H (400 MHz) determinados en CDCl₃ del compuesto **VI** con los del ácido betulónico 62

Cuadro 2.7. Asignación completa de los datos espectrocópicos de RMN-¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz) determinado en piridina-*d*₅ del compuesto **IX** 77

Cuadro 2.8. Asignación completa de los datos espectrocópicos de RMN-¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz) determinado en piridina-*d*₅ del compuesto **X** 87

Cuadro 2.9. Asignación completa de los datos espectrocópicos de RMN-¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz) determinado en CDCl₃ del compuesto **XI** 94

Cuadro 2.10. Asignación completa de los datos espectrocópicos de RMN-¹H (600 MHz)

y ^{13}C (150 MHz) determinado en CDCl_3 del compuesto XII	101
Cuadro 2.11. Comparación de los datos estectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y RMN- ^{13}C (150 MHz) determinado en CDCl_3 del compuesto XV , XVI con los de 2-metilpentano-2,3,4-triol.....	107
Cuadro 2.12. Comparación de los datos estectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y RMN- ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 del compuesto XVII con los de 2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol en An-d_6	110
Cuadro 2.13. Comparación de los datos espectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y RMN- ^{13}C (150 MHz) en piridina- d_5 del compuesto XIX con los del 28-O-acetil-betulona en CDCl_3	117
Cuadro 2.14. Comparación de los datos estectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) determinado en An-d_6 del compuesto XX con los de la naringenina en $\text{CD}_3\text{OH:D}_2\text{O}$ (1:1)	121
Cuadro 3.1. Efecto citotóxico del extracto metanólico y las fracciones de <i>P. vernicosum</i> evaluadas frente a la línea celular HeLa ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$)	126
Cuadro 3.2. Actividad citotóxica de las fracciones primarias de la partición hexánica (PVP-2A) y diclorometánica (PVP-2B) frente a la línea celular HeLa ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$)	127
Cuadro 3.3. Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera de <i>P. vernicosum</i>	128
Cuadro 3.4. Actividad antiproliferativa e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera de <i>P. vernicosum</i>	130
Cuadro 3.5. Razón entre la actividad citotóxica y antiproliferativa de los compuestos aislados de la planta entera de <i>P. vernicosum</i>	131
Cuadro 4.1. Evaluaciones <i>in vitro</i> del ácido betulínico en distintas líneas celulares de cáncer.....	142
Cuadro 4.2. Evaluaciones <i>in vitro</i> de la betulina en distintas líneas celulares de cáncer.....	144

Cuadro 4.3. Evaluaciones *in vitro* del lupeol en distintas líneas celulares de cáncer..... 146

ABREVIATURAS

Acetona-d ₆	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía por columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CG-EM	Cromatografo de gases acoplado a espectrómetro de masas
CLV	Cromatografía líquida a vacío
COSY	Correlation Spectroscopy
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IR	Espectrofotometría de infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón
R _f	Relación de frentes
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
ROESY	Rotating-frame Overhauser Spectroscopy
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
t _R	Tiempo de retención
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NOESY-1D	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy una dimensión
pF	Punto de fusión

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se encuentra entre las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Actualmente existen diversos tratamientos para combatirla, pero se reportan también que éstos presentan serias desventajas. En la búsqueda de nuevas alternativas, en un estudio previo se evaluaron 21 plantas utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de sintomatología sugerente al cáncer, en el cual el extracto metanólico proveniente de la parte aérea de *Phoradendron vernicosum* demostró un buen potencial contra células tumorales KB ($CC_{50} = 29 \mu\text{g/mL}$).

Siguiendo esta línea de investigación, en este trabajo se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de *P. vernicosum* frente a un panel de líneas celulares de cáncer. El extracto metanólico se fraccionó mediante particiones orgánicas de polaridad ascendente, obteniéndose tres fracciones orgánicas (fracción hexánica, diclorometánica y de acetato de etilo), de las cuales se purificaron tres triterpenos de tipo lupano y dos compuestos hidroxilados novedosos, junto con 15 compuestos ya reportados en la literatura. La estructura química de los compuestos fue determinada por técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los compuestos aislados fueron evaluados para determinar sus efectos citotóxico y antiproliferativo en un panel de líneas celulares de cáncer y una línea celular normal para establecer su selectividad.

ABSTRACT

Cancer is a disease that is among the leading causes of mortality worldwide. Currently, there are several treatments to combat it, however, they present serious disadvantages. In the search for new alternatives, in a previous study, 21 plants used in traditional Mayan medicine were evaluated for the treatment of symptomatology suggestive of cancer, in which the methanolic extract from the aerial part of *Phoradendron vernicosum* demonstrated a good potential against tumor cells KB ($CC_{50} = 29 \mu\text{g/mL}$).

Following this line of research, in this work the bio-directed phytochemical study of *P. vernicosum* was carried out against a panel of cancer cell lines. The methanolic extract was fractionated by organic partitions of ascending polarity, obtaining three organic fractions (hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions), from which three novel lupane-type triterpenes and two hydroxylated compounds were isolated, along with 15 compounds already reported in the literature. The chemical structures of the compounds were determined by spectroscopic and spectrometric techniques. The isolated compounds were evaluated for their cytotoxic and antiproliferative effects in a panel of cancer cell lines and a normal cell line to establish their selectivity.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En el año 2012 se reportaron 8.2 millones de defunciones, así como también 14.1 millones de nuevos casos, y se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas (Torre *et al.*, 2015).

Este padecimiento constituye un serio problema de salud pública, afectando de igual manera a la economía y perjudicando los avances sociales en todo el mundo, sobre todo en los países en vías de desarrollo, en los cuales se calcula que más de dos tercios de todas las muertes por cáncer afectan a su población (Torre *et al.*, 2015).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la segunda causa de muerte y se estima que 128 mil nuevos casos se detectan cada año (Rizo-Ríos *et al.*, 2015). Por otra parte, en el estado de Yucatán, la Secretaría de Salud reporta que ha crecido la incidencia por cáncer, ocupando la segunda causa de muerte y mostrando una alta prevalencia tanto de defunciones como de morbilidad, en las cuales el sexo femenino es el principal afectado (Rizo-Ríos *et al.*, 2015; Aldaco-Sarvide *et al.*, 2012).

Entre los principales tratamientos contra esta enfermedad se encuentran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Sin embargo, todas poseen desventajas importantes; en el caso de la cirugía ésta se limita a tumores locales. En el caso de la radioterapia, al igual que la cirugía, es una terapia local y sólo tiene efecto si las células malignas se encuentran localizadas dentro del campo irradiado, por lo tanto, es ineficaz para combatir metástasis. Por último, en la quimioterapia los fármacos anticancerígenos no actúan de forma selectiva, es decir, no interactúan únicamente contra las células dañadas sino lo hacen de igual manera contra las células sanas en división (Hernández-Menéndez y Hernández-Ríos, 1999). Otra desventaja importante en este tratamiento es el desencadenamiento de mecanismos de resistencia de las células cancerígenas en contra de la actividad farmacológica de dichos medicamentos (Fahad-Ullah, 2008; Liscovitch y Lavie, 2002).

Debido a lo anterior, la búsqueda de nuevos fármacos eficaces y selectivos es una prioridad. Una de las principales fuentes para la búsqueda de nuevos compuestos contra esta enfermedad lo constituye el reino vegetal, ya que de las plantas se han obtenido los principales fármacos anticancerígenos utilizados en la actualidad para el tratamiento (Heinrich y Gibbons, 2001).

Como parte de un proyecto realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en colaboración con el Departamento de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad citotóxica, se evaluaron 21 plantas utilizadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de sintomatología sugerente a cáncer; de esta evaluación se encontró que diez especies evidenciaron una actividad citotóxica promisorio contra diferentes líneas celulares tumorales, de las cuales la especie *Phoradendron vernicosum* presentó una concentración citotóxica media (CC_{50}) de 29.0 $\mu\text{g/mL}$ frente a células tumorales de cáncer nasofaríngeo (KB). Posteriormente, el estudio biodirigido de la fracción diclorometánica obtenida del extracto metanólico de *P. vernicosum* concluyó en el aislamiento de tres triterpenos de esqueleto lupano con actividad citotóxica y antiproliferativa importante frente a diversas líneas celulares (García-Cámara, 2014; Caamal-Fuentes *et al.*, 2011).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Cáncer

El cáncer es un término que se usa para un grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del organismo, en el cual las células anormales se dividen sin control y pueden diseminarse e invadir otros tejidos por medio del sistema sanguíneo y sistema linfático (Hejmadi, 2013).

El cáncer se origina por la combinación variable de factores exógenos o ambientales y factores genéticos o endógenos. Los estímulos exógenos parecen causar o contribuir a la iniciación del cáncer al dañar la estructura del ADN en la célula o puede promover la proliferación de células dañadas y el desarrollo de tumores por ayudar a crear condiciones dentro del cuerpo que son favorables para el crecimiento del cáncer. Estos factores se dividen en físicos, químicos y biológicos. Como tipo de riesgo físico se encuentra la radiación; las sustancias aromáticas, humo del tabaco, asbesto, berilio, arsénico, cadmio, óxido de etileno, radón, por mencionar algunas, son sustancias químicas que pueden desencadenar algún tipo de cáncer; y entre los causantes de cáncer por agentes biológicos se pueden mencionar algunos virus, como el virus del papiloma humano (Rugo, 2007; Alberts, 2002).

Por su parte, los factores endógenos son aquellos que surgen dentro del cuerpo, a nivel celular o molecular. Estos factores suelen ser menos propensos a la observación directa y a la manipulación, entre los que se encuentran: la edad, las hormonas, la influencia de la herencia genética y la raza (Greenwald, 1992).

Debido al daño ocasionado al ADN, las células adquieren mutaciones en algunos genes, los cuales están encargados de regular directamente la proliferación celular, controlar la apoptosis y realizar la reparación del ADN dañado. Dependiendo de cómo afectan a cada proceso, estos genes se pueden agrupar en dos categorías generales: los genes supresores de tumores (inhibidor del crecimiento) y proto-oncogenes (que promueven el crecimiento). Sin embargo, una vez que la célula adquiere mutaciones, se desencadenan

aberraciones en la regulación de las vías principales que controlan la proliferación celular, promoviendo su crecimiento y teniendo ventaja de supervivencia sobre las células normales (Weinberg, 1994; Levine, 1993; Li, 1993).

2. Tratamientos contra el Cáncer

Los tipos más comunes de tratamiento contra el cáncer son cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, para recurrir a alguno de éstos dependerá de diversos factores, tales como el tipo de cáncer, su localización, la cantidad de células anormales, así como del estado físico del paciente. Estas terapias son diseñadas para matar o remover directamente a las células cancerosas o para llevarlas a su muerte por medio de la supresión de señales necesarias para la división celular o para estimular sus defensas propias. Los diferentes tipos de tratamiento son usados constantemente en combinación, ya sea simultáneamente o secuencialmente (Alberts, 2002).

La cirugía se usa con más frecuencia para el tratamiento del cáncer que está localizado, o limitado a un área. En la mayoría de los casos, la intención de la cirugía es curar el cáncer, ya que, si éste es extirpado en la etapa en que está confinado localmente, se puede conseguir la curación. Si bien el objetivo de la cirugía sería teóricamente erradicar todo el tejido dañado, esto depende de las características del cáncer y del estado del paciente; por lo tanto, antes de proceder a la planificación del abordaje terapéutico es preciso conocer los datos citohistológicos del cáncer y su extensión y, por otra parte, la evaluación completa del paciente en todos sus aspectos como patología previa o asociada. Sin embargo, algunas veces la cirugía para el cáncer localizado puede emplearse para extirpar sólo la mayor parte de éste, y luego otros tratamientos, como la radiación y la quimioterapia, se pueden usar para eliminar células malignas remanentes (Urruticoechea *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la radioterapia, éste es el uso de un tipo de energía que se transmite mediante ondas o por medio de una corriente de partículas para destruir las células cancerosas, reducir el tamaño del cáncer o aliviar los síntomas. Este tratamiento lesiona o destruye las células en el área que recibe la radiación al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. Entre los inconvenientes encontrados en los diferentes tipos de radiación es que son considerados tratamientos locales porque la

radiación se dirige a un área específica, por lo tanto, la mayoría de las formas de radioterapia no pueden alcanzar a todas las partes del cuerpo, y por ende no son útiles cuando hay metástasis. De igual manera, se han encontrado otros problemas ocasionados por esta terapia, como son cansancio, cambios en la piel (enrojecimiento, hipersensibilidad, dolor, descamación, entre otras), inflamación en la cavidad bucal y garganta; también puede causar daño importante en órganos específicos irradiados; además, pueden desarrollarse otros cánceres secundarios. Sin embargo, se estima que aproximadamente la mitad de los pacientes con cáncer reciben algún tipo de radioterapia (Urruticoechea *et al.*, 2010; Rajamanickam *et al.*, 2012; Delaney *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la quimioterapia para el tratamiento del cáncer su objetivo consiste en la destrucción de células cancerosas. El mecanismo de acción de los fármacos a utilizar es muy variado, pero con un mismo fin, el cual es provocar una alteración celular, ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. Sin embargo, este tratamiento tiene una gran limitación, ya que estos medicamentos también pueden dañar algunas células normales y, de esta manera, causar efectos secundarios, como náusea y vómito, falta de apetito, caída del cabello, úlceras en la boca, diarrea, mayor posibilidad de infección, sangrado o aparición de moretones después de cortes o lesiones menores, así como cansancio y debilidad (Urruticoechea *et al.*, 2010; Vicent *et al.*, 2008).

De igual manera, uno de los principales fracasos de este tratamiento es el desencadenamiento de mecanismos de resistencia de las células anormales, ya sea en la presentación inicial del cáncer o debido a alguna recaída. Esta resistencia se puede deber a diversos factores, tales como la disminución de la concentración del fármaco en la célula, daño en las enzimas diana, reparación del ADN dañado, hasta a algún tipo de fallo en la muerte programada del mismo, por mencionar algunos (Lage *et al.*, 2010; Fahad-Ullah, 2008; Borowski *et al.*, 2005; Gottesman, 2002; Liscovitch y Lavie, 2002; Raderer *et al.*, 1993).

Estos hechos han puesto de manifiesto la necesidad de buscar nuevos fármacos anticancerígenos más seguros y eficaces.

3. Los productos naturales como fuente de moléculas con actividad anticancerígena

Debido a lo anterior, la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos para combatir el cáncer es una prioridad y de las diferentes fuentes que existen para la obtención de éstos son los productos naturales, los cuales siguen siendo uno de los principales recursos, ya que se encuentran agentes anticancerígenos utilizados en la farmacéutica o que se ubican en fases clínicas, obtenidas de fuentes naturales. Se calcula que aproximadamente el 68% de los fármacos anticancerígenos son obtenidos de productos naturales o basados en estos mismos (Newman y Cragg, 2016; Gordaliza, 2007; Newman y Cragg, 2007; Musarrat *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2003; Cragg *et al.*, 1997).

Ejemplo de lo anterior son los alcaloides vinblastina, vincristina y vindesina (Figura 1.1), aislados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), los cuales fueron los primeros alcaloides identificados con actividad anticancerígena; estos metabolitos son usados como fármacos para combatir diversos tipos de cánceres, tales como leucemia, cáncer de mama, pulmón y renal (Nirmala *et al.*, 2011; Nobili *et al.*, 2009; Da Rocha *et al.*, 2001).

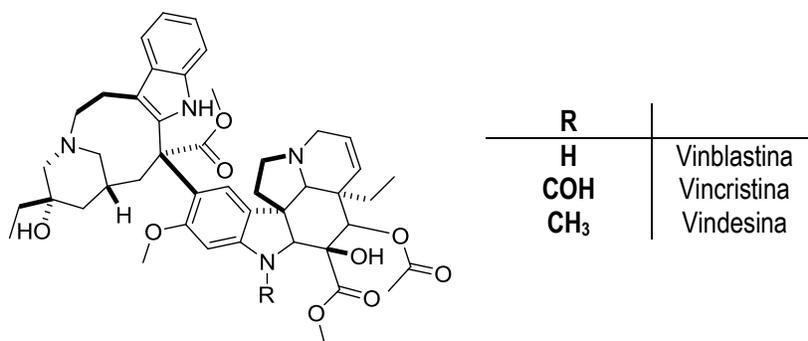


Figura 1.1. Alcaloides aislados de *Catharanthus roseus* (Cragg y Newman, 2005).

El paclitaxel (Taxol®, Figura 1.2), obtenido de la corteza de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), es un medicamento que entró al mercado desde los años 90s, sin embargo, este compuesto presenta poca solubilidad en agua y cierta toxicidad, por lo tanto, se desarrolló a partir de éste un derivado semisintético, el docetaxel (Taxotere®, Figura 1.3); de igual manera, éste ha presentado una mayor efectividad, por lo cual es usado en pacientes resistentes al paclitaxel. Tanto el paclitaxel como el docetaxel son utilizados para el

tratamiento en pacientes que sufren de cáncer de mama, pulmón y próstata (Nirmala *et al.*, 2011; Nobili *et al.*, 2009; Cragg y Newman, 2005; Da Rocha *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 2000).

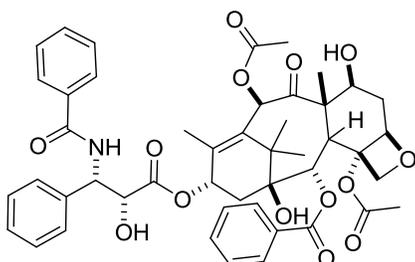


Figura 1.2 Estructura de paclitaxel (Taxol®)
(Cragg y Newman, 2005).

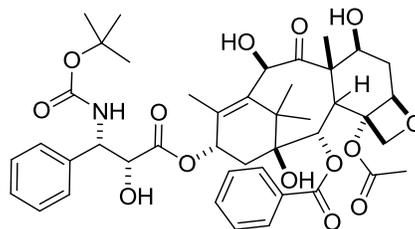


Figura 1.3 Estructura de docetaxel (Taxotere®)
(Cragg y Newman, 2005).

De *Camptotheca acuminata* fue aislada la camptotecina (Figura 1.4), la cual presentó actividad anticancerígena, pasando así a fases preclínicas y clínicas, pero debido a su alta toxicidad fue necesario realizar modificaciones estructurales para evitar los efectos no deseados, obteniéndose así dos análogos semisintéticos de la camptotecina, el irinotecan y topotecan (Figuras 1.5 y 1.6), los cuales han entrado a fases clínicas para el tratamiento de cáncer colorrectal y de ovario, respectivamente (Nirmala *et al.*, 2011; Nobili *et al.*, 2009; Da Rocha *et al.*, 2001).

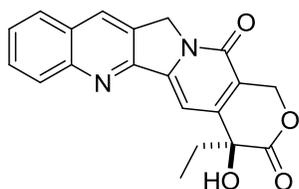


Figura 1.4 Estructura de camptotecina
(Cragg y Newman, 2005).

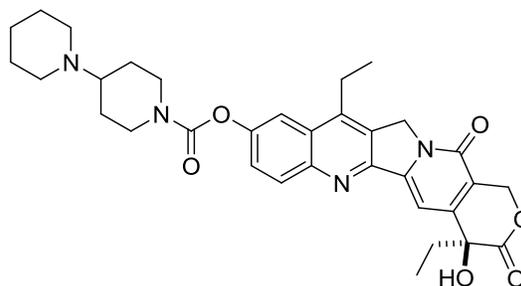


Figura 1.5 Estructura de irinotecan
(Cragg y Newman, 2005).

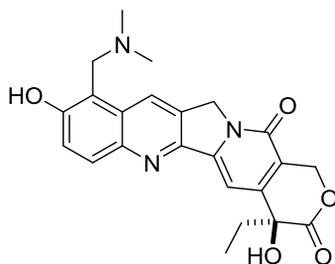


Figura 1.6 Estructura de topotecan (Cragg y Newman, 2005).

El etopósido (Figura 1.7) es otro ejemplo de fármaco semisintético derivado de la podofilotoxina (Figura 1.8) aislada de las especies *Podophyllum peltatum* y *P. emodi*; este fármaco es utilizado para el tratamiento de cáncer bronquial, testicular y linfomas (Nirmala *et al.*, 2011; Nobili *et al.*, 2009).

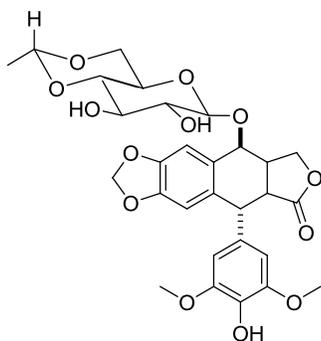


Figura 1.7 Estructura de etopósido (Cragg y Newman, 2005).

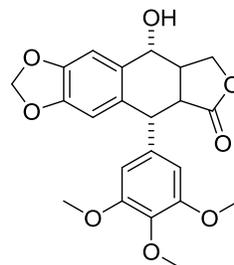


Figura 1.8 Estructura de podofilotoxina (Cragg y Newman, 2005).

Si bien, en la investigación de nuevas entidades químicas de origen vegetal con propiedades farmacológicas se utilizan diversos métodos para la búsqueda de metabolitos bioactivos, entre los cuales el uso de la medicina tradicional es uno de los más utilizados como guía para dicho estudio (Patwardhan, 2005).

4. Medicina tradicional

La medicina tradicional es una práctica que consiste en la suma total de los conocimientos basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, utilizadas

para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (Yuan *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, entre el 70 y 95% de los habitantes en la mayoría de los países en vías de desarrollo, en especial en China, India, África y América Latina, utilizan la medicina tradicional como recurso primario en cuanto a las necesidades de salud. Asimismo, en algunas naciones industrializadas, como Estados Unidos y la Unión Europea, también se usa la medicina tradicional, aunque bajo el nombre de medicina complementaria, alternativa o no convencional, reportándose así que el 80% de la población ha utilizado medicina tradicional (Cragg y Newman, 2002).

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer, ya que las plantas tienen una larga historia para combatir esta enfermedad; si bien, el término “cáncer” para diversas culturas puede no ser tan apropiado como una entidad de enfermedad específica, debido a una mala definición o traducción en términos folclóricos, por lo cual es importante estudiar sintomatologías que sugieran esta enfermedad (Ramawat *et al.*, 2009; Gurib-Fakim, 2006; Balunas y Douglas Kinghorn, 2005; Graham *et al.*, 2000).

Como ejemplo de esto es el estudio llevado a cabo en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY en conjunto con el Departamento de Investigación del IMSS, en el cual se evaluaron 21 plantas usadas en la medicina tradicional maya para sintomatologías sugerentes al cáncer, observándose que el extracto metanólico de *Phoradendron vernicosum* presentó una actividad citotóxica media de 29 µg/mL sobre la línea de cáncer nasofaríngeo (KB), la cual es considerada una actividad biológica alta; por lo anterior, es importante continuar con el aislamiento y purificación de los compuestos que le pudieran conferir esta actividad (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011).

5. Género *Phoradendron*

El género *Phoradendron* pertenece a la familia Santalaceae y consta de 300 especies a nivel mundial, de las cuales 234 se encuentran presentes en el continente americano. En México se encuentran en casi todos los estados de la República, con 57 especies, con

una distribución que va desde el nivel del mar hasta los 3,000 m (Vázquez-Collazo *et al.*, 2006; Kuijt, 2003; García-Regalado, 1998).

Las especies del género *Phoradendron* son principalmente arbustos erectos o colgantes, de varios metros de longitud y hemiparásitos de dicotiledóneas. Poseen ramas redondeadas, glabras, de color verde, amarillo o verde amarillento; las hojas son opuestas de color verde o amarillentas, lanceoladas u oblongas; sus flores son pequeñas y unisexuales (Vázquez-Collazo *et al.*, 2006; García-Regalado, 1998).

El género *Phoradendron* ha sido poco estudiado desde el punto de vista químico y biológico, por lo tanto, el número de reportes de este género es limitado. En general, el género *Phoradendron* ha mostrado poseer actividad citotóxica importante, ejemplo de esto es la especie *P. serotinum*, la cual mostró una CI_{50} de 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a células tumorales de cáncer de mama MCF-7 y células epiteliales de ratón TC-1, respectivamente (Alonso-Castro *et al.*, 2012; Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). De igual manera, esta misma especie mostró actividad antitumoral en ratones, al administrarse el extracto acuoso, observándose una disminución del tumor TC-1 (Alonso-Castro *et al.*, 2012).

Con respecto a estudios fitoquímicos de las especies de *Phoradendron*, se han aislado principalmente terpenoides y compuestos polihidroxiados; como ejemplo se puede citar que de las partes aéreas de *P. reichenbachianum* se aislaron los triterpenos ácido morónico, el ácido 3,4-seco-olean-18-en-3,28-dioico, ácido morólico, lupeol, betulonaldehído, betulinaldehído (Figura 1.9), así como los esteroides β -sitosterol, β -sitosterol glucopiranosido (Figura 1.10) y escualeno. Entre éstos, el ácido morónico mostró actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares, con CI_{50} de 7.9 μM , 8.6 μM y 11.7 μM sobre adenocarcinoma colorrectal humano (HCT-15), carcinoma de piel (UISO) y carcinoma nasofaríngeo humano (KB), respectivamente (Ríos *et al.*, 2001).

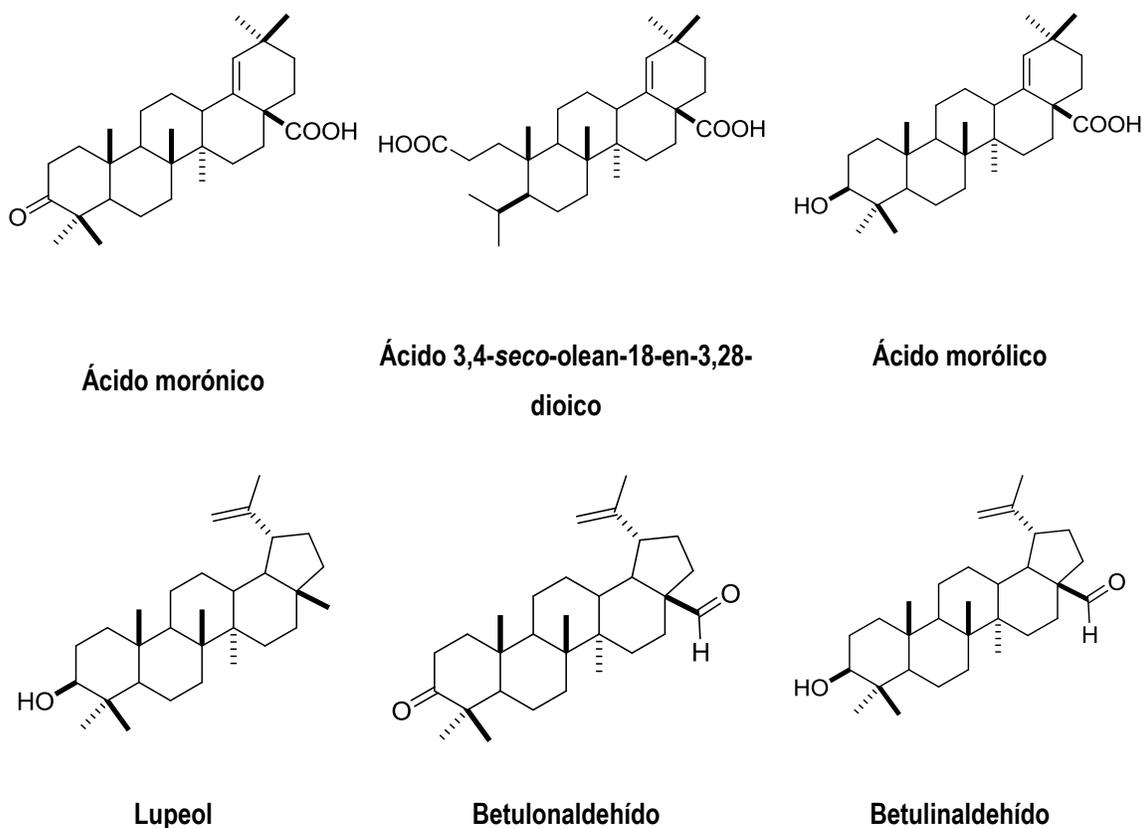


Figura 1.9 Triterpenos aislados de *P. reichenbachianum* (Ríos *et al.*, 2001).

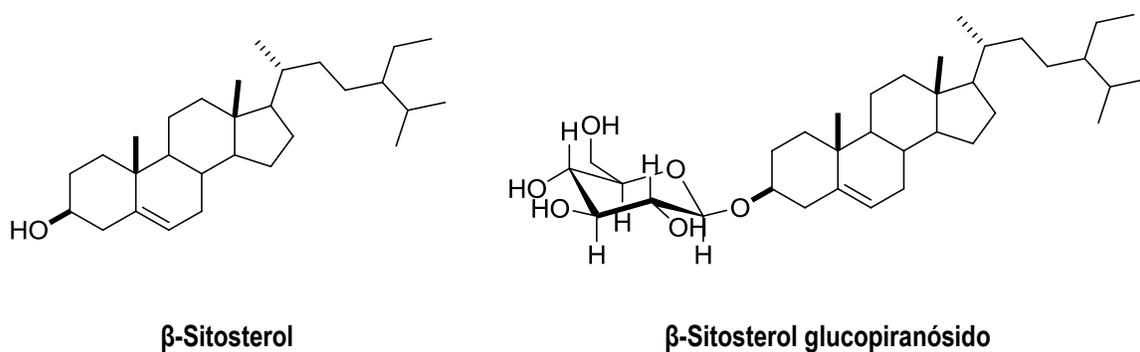
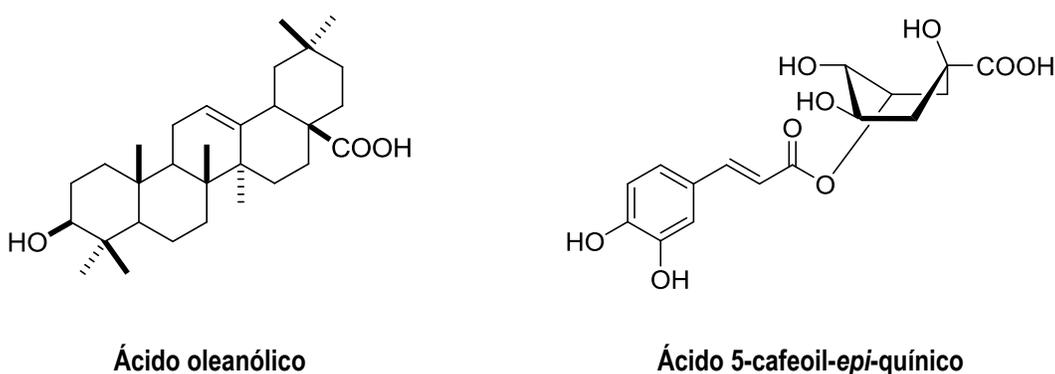


Figura 1.10 Esteroles aislados de *P. reichenbachianum* (Ríos *et al.*, 2001).

En otro estudio, de *P. juniperinum* se aisló el ácido oleanólico que presentó actividad anti-VIH (Kashiwada *et al.*, 1998), así como también un derivado de ácido cafeico, el ácido 5-cafeoil-*epi*-quínicico con potencial antineoplásico (Furbacher, 2001) (Figura 1.11).



Ácido oleanólico

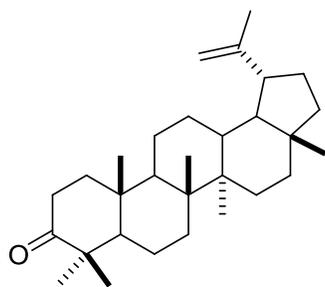
Ácido 5-cafeoil-epi-quinico

Figura 1.11 Compuestos aislados de *P. juniperinum* (Furbacher, 2001; Kashiwada *et al.*, 1998).

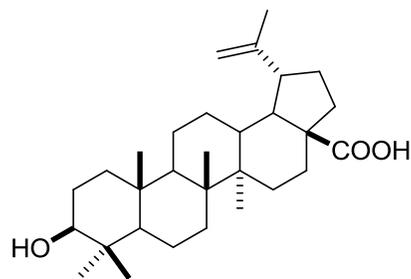
De *P. brachystachyum* se han aislado terpenoides tales como: lupenona, ácido betulínico, ácido betulónico, ácido oleanólico, aldehído del ácido oleanólico, dos flavonoides, la acetina y la acetina 7-metil-éter, y como componente mayoritario el ácido morónico, el cual, además de presentar actividad citotóxica, ha mostrado actividad antihipertensiva, antidiabética y anti-VIH (López-Martínez *et al.*, 2013) (Figura 1.12).

De *P. tomentosum* se aislaron los flavonoides vitexina, schaftosida (6-C-glucosil-8-C-arabinosil-apigenina), isoschaftosida (6-C-arabinosil-8-C-glucosil-apigenina), apigenina y apigenina-4'-O-glucopiranosido (Dossaji *et al.*, 1983) (Figura 1.13).

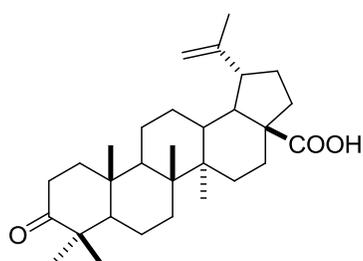
Por último, de *P. liga* se identificó la presencia de flavonoides y antocianidinas (Figura 1.14), tales como apigenina-6-C-glicósido, apigenina-8-C-glicósido, luteolina-6-C-xilosa-8-C-glicósido y la apigeninidina (Varela *et al.*, 2004).



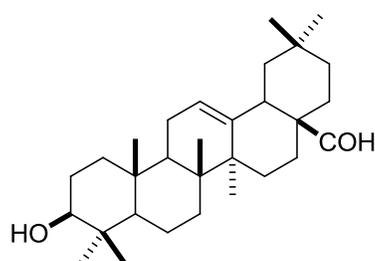
Lupenona



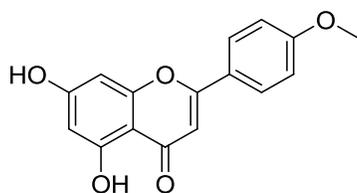
Ácido betulínico



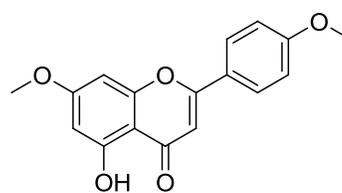
Ácido betulínico



Aldehído del ácido oleanólico



Acacetina



Acacetina 7-metil-éter

Figura 1.12 Compuestos aislados de *P. brachystachyum* (López-Martínez et al., 2013).

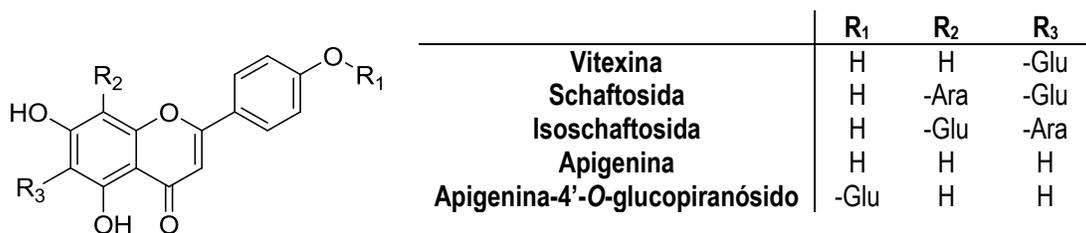


Figura 1.13 Flavonoides aislados de *P. tomentosum*. -Ara: Arabinosa, -Glu: Glucosa (Dossaji et al., 1983).

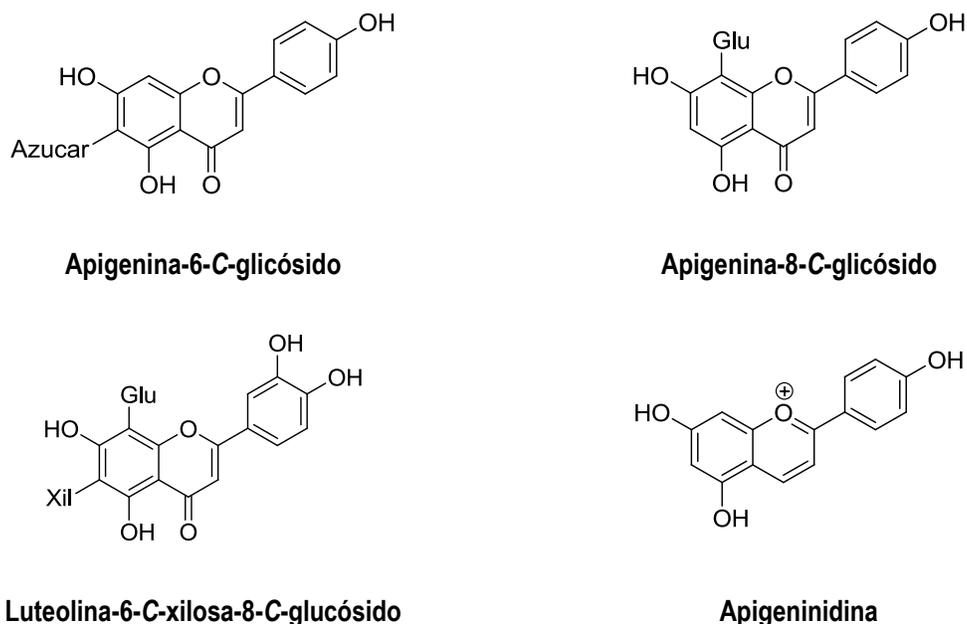


Figura 1.14 Compuestos identificados de *P. liga*. -Xil: Xilosa, -Glu: Glucosa (Varela *et al.*, 2004).

6. *Phoradendron vernicosum*

La especie *Phoradendron vernicosum* Greenm. (Figura 1.15), sinonimia de *Phoradendron decussatum* Trel., *Phoradendron vulcanicum* Trel., *Phoradendron wattii* Krug & Urb, se desarrolla en un hábitat tropical, abarcando desde un clima subhúmedo hasta tropical cálido. Esta especie se encuentra distribuida en Centroamérica, las Antillas y en la República Mexicana en los estados de Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán, en este último principalmente en el centro (Alvarado-Cárdenas, 2010; Trelease, 1916).

Es conocida comúnmente como “caballero” en español, y como “*k'awis k'k'ew*” o “*ya'ax k'ew*” en maya. Es un arbusto, con tallos de ramificación erecta, glabros y con hojas de color verde y lustrosas, lanceoladas-ovaladas o elípticas, y frutos ovoides, de ruguloso a verrugoso, de color blanco a amarillo, los cuales contienen varias semillas incrustadas. Sus flores son discretas, de color amarillo verdoso de 1-3 mm de diámetro (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Barrera-Marín *et al.*, 1976; Osadao, 1834, 2010; Trelease, 1916).



Figura 1.15 Especie *Phoradendron vernicosum* en su hábitat natural.

Es una planta hemiparásita, esto quiere decir que es parcialmente parásita, provista de clorofila lo cual le permite realizar la fotosíntesis, pero necesita obtener de su huésped agua y sales por medio de su haustorio, en donde sólo el xilema entra en contacto con el hospedero (Hull y Leonard, 1964a; 1964b).

Esta planta es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de los abscesos, los cuales son afecciones en la piel caracterizadas por la acumulación de material purulento, inflamación y enrojecimiento (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Barrera-Marín *et al.*, 1976; Osadao, 1834).

Hasta el momento, la información obtenida de la investigación bibliográfica realizada en diversas bases de datos respecto a estudios químicos o biológicos de esta especie es limitada. Sin embargo, en un estudio preliminar efectuado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en conjunto con la Unidad de Investigación del Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) “Lic. Ignacio García Téllez”, se realizó el aislamiento y la elucidación estructural de tres triterpenos con esqueleto lupano (Figura 1.16): ácido betulínico, 2,24-epoxi-2,3-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico y ácido 24-hidroxibetulínico, de los cuales se evaluó su efecto citotóxico (Cuadro 1.1) y antiproliferativo (Cuadro 1.2), con su respectivos índices de selectividad, frente a diversas líneas celulares de cáncer humano, observándose que las concentraciones presentadas en la línea celular de cáncer nasofaríngeo (KB) son cercanas al corte establecido por el Instituto Nacional del Cáncer y con índices de selectividad altos ($IS \geq$

10), teniendo esta especie el potencial para producir metabolitos de interés anticancerígeno (García-Cámara, 2014; Mena-Rejón *et al.*, 2009).

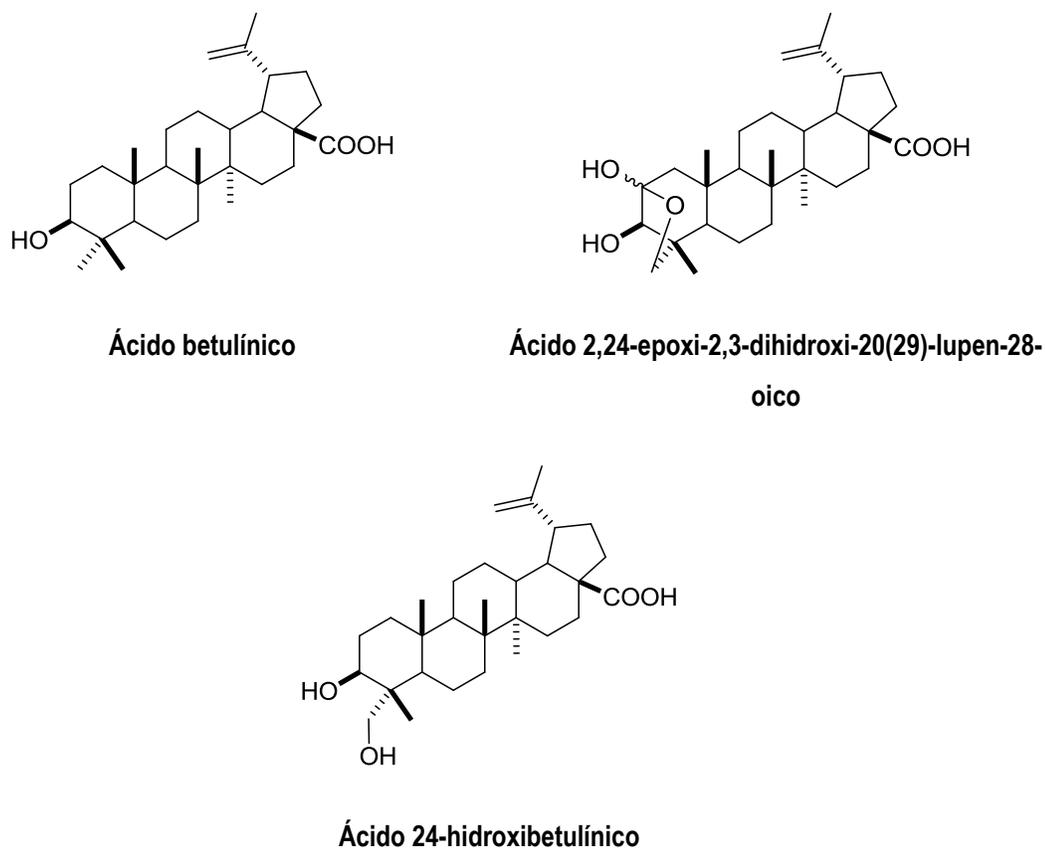


Figura 1.16 Compuestos aislados de la especie *P. vernicosum* (García-Cámara, 2014).

Cuadro 1.1 Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera *P. vernicosum*.

Compuesto	Líneas celulares CC_{50} $\mu M \pm DE$ (IS)				
	Hek-293	SiHa	KB	MCF-7	Hep-2
Ácido betulínico	80.0 \pm 11.5	38.8 \pm 1.1 (2.1)	15.6 \pm 1.8 (5.1)	56.6 \pm 4.4 (1.4)	48.2 \pm 1.3 (1.6)
Ácido 2,24-epoxi-2,3-dihidroxi-20(29)-lupen-28-oico	442.4 \pm 21.8	---	24.1 \pm 2.6 (18.3)	89.1 \pm 3.8 (5.0)	---
Ácido 24-hidroxibetulínico	95.8 \pm 9.0	20.3 \pm 0.8 (4.7)	10.8 \pm 1.1 (8.9)	31.7 \pm 1.7 (3.0)	34.1 \pm 2.0 (2.8)

Cuadro 1.2 Actividad antiproliferativa e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera *P. vernicosum*.

Compuesto	Líneas celulares CI_{50} $\mu M \pm DS$ (IS)				
	Hek-293	SiHa	KB	MCF-7	Hep-2
Ácido betulínico	336.2 \pm 13.8	90.3 \pm 6.7 (3.7)	28.1 \pm 2.1 (12.0)	66.2 \pm 1.8 (5.1)	---
Ácido 2,24-epoxi-2,3-dihidroxi-20(29)-en-28-oico	692.0 \pm 25.4	61.3 \pm 2.3 (11.3)	17.3 \pm 1.8 (40.0)	---	---
Ácido 24-hidroxibetulínico	95.5 \pm 11.6	57.8 \pm 1.5 (1.6)	12.5 \pm 1.4 (7.6)	48.9 \pm 6.6 (1.9)	75.2 \pm 2.0 (1.3)

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se plantea continuar con el estudio fitoquímico de la especie *P. vernicosum* con el fin de aislar e identificar otros metabolitos secundarios que pudieran presentar una mayor actividad citotóxica y antiproliferativa.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad que se encuentra entre las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Las alternativas existentes para el tratamiento de esta enfermedad tienen como objetivo primordial la mejora de la calidad de vida de los pacientes y la reducción de las tasas de mortalidad. Sin embargo, éstos presentan serias desventajas, tales como múltiples efectos secundarios, costos elevados, mecanismos de resistencia de las células tumorales ante compuestos anticancerígenos y poca eficacia de los tratamientos contra la metástasis. Debido a esto, es necesario encontrar nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer.

Actualmente existen muchas investigaciones dedicadas a la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces y con menos efectos adversos. Entre una de las principales fuentes para esta búsqueda, son las plantas superiores, de las cuales se ha obtenido la mayoría de los fármacos usados para la quimioterapia del cáncer.

La especie *P. vernicosum* es una planta utilizada en la medicina tradicional maya y que ha sido utilizada para el tratamiento de sintomatología sugerente al cáncer. Aunado a esto, en un estudio previo se evaluaron tanto el extracto metanólico como tres triterpenos aislados de esta planta en los bioensayos de citotoxicidad y antiproliferativo, presentando actividad citotóxica importante, aunque se piensa que pueden estar presentes otros metabolitos que sean responsables de la actividad biológica que se observa en el extracto metanólico original y en algunas fracciones del mismo, por lo que en este trabajo se plantea continuar con el estudio fitoquímico de *P. vernicosum* con el objetivo de aislar e identificar más compuestos con actividad citotóxica y antiproliferativa.

HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Phoradendron vernicosum* tiene metabolitos, tales como triterpenos y flavonoides, con actividad citotóxica y antiproliferativa.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa de compuestos obtenidos de las partes aéreas de la especie *Phoradendron vernicosum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar en el bioensayo *in vitro* de actividad citotóxica las fracciones del extracto metanólico de *Phoradendron vernicosum* para obtener sus concentraciones citotóxicas medias.
2. Aislar por técnicas cromatográficas metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas del extracto metanólico de *Phoradendron vernicosum*.
3. Elucidar las estructuras moleculares de los metabolitos aislados por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas
4. Evaluar los compuestos puros obtenidos en bioensayos *in vitro* contra células normales de riñón de mono verde (Vero) y tumorales de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), cérvix (HeLa y SiHa) y próstata (DU-145) para obtener sus concentraciones citotóxicas y antiproliferativas medias.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental del presente trabajo (Figura 1.17) inició con extracciones líquido-líquido del extracto metanólico con disolventes de polaridad ascendente para la obtención de las particiones orgánicas. El extracto metanólico y las fracciones resultantes de las particiones orgánicas se evaluaron frente a la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa) por medio del ensayo de citotoxicidad. Las tres fracciones orgánicas fueron purificadas mediante diferentes técnicas cromatográficas hasta la obtención de compuestos puros, cuyas estructuras fueron elucidadas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas y son presentadas en este trabajo.

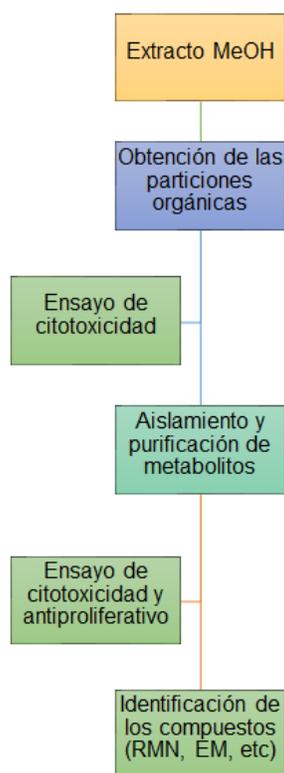


Figura 1.17 Estrategia experimental planteada para este trabajo.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Phoradendron vernicosum*

2.1 INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de los beneficios a la salud que la medicina tradicional ha demostrado tener, los científicos y profesionales de la salud han manifestado un aumento en su interés sobre plantas medicinales utilizadas en este campo. Por tal motivo, se desarrollan estudios fitoquímicos con especies vegetales utilizadas en medicina tradicional, para lo cual se realiza una serie de investigaciones que requieren varios métodos para la separación, purificación e identificación de los distintos constituyentes presentes en las plantas (Harbone, 1998).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Procedimientos generales

Los disolventes que se utilizaron para los procesos de extracción, separación y purificación fueron de grado industrial, previamente destilados en el laboratorio.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (ccd) fueron realizados utilizando cromatofolios impregnados de gel de sílice G-60 de 0.25 mm de espesor con indicador fluorescente F_{254} . Los agentes reveladores utilizados en todos los casos fueron luz ultravioleta (UV_{254} y UV_{366}), óleum (H_2SO_4 , AcOH, H_2O en proporción 1:20:4) y ácido fosfomolibdico (0.10 moles de $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$, 6.18×10^{-3} moles de $Ce(SO_4)_2$ y 5% de H_2SO_4).

Para las separaciones por cromatografía en columna (cc) se utilizaron columnas de vidrio empacadas con gel de sílice con tamaño de partícula 63-200 μm (malla 70-230) y 40-63 μm (malla 230-400); y gel de sílice para ccd, con tamaño de partícula de 2-25 μm , sin indicador de fluorescencia (Merck). Para las separaciones por métodos cromatográficos de exclusión molecular se empleó Sephadex lipofílico LH-20 (Sigma Aldrich) como fase estacionaria. De igual manera, se empleó un sistema de separación cromatográfica de

mediana presión (marca Büchi, modelo Sepacore), usando una columna cromatográfica de vidrio de 2 cm de diámetro interno y como fase estacionaria gel de sílice con tamaño de partícula de 2-25 μm , sin indicador de fluorescencia (Merck).

Los puntos de fusión de los compuestos novedosos fueron determinados por medio de un aparato de punto de fusión (Laboratory Devices, Inc., modelo Mel-Temp II).

La rotación óptica de los compuestos novedosos fue medida por medio de un polarímetro (Rudolph Research Analytical Autopol).

Para los espectros de infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro (Nicolet, modelo Protegé 460).

Los espectros de masas de baja resolución fueron realizados en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un detector másico (5975B). Los espectros de masas de alta resolución fueron medidos por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (JEOL GCMate II).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H), de carbono trece (RMN- ^{13}C), los experimentos mono (1D) y bidimensionales (2D), homo (COSY, NOESY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) se obtuvieron en un espectrómetro de 400 MHz (Bruker Avance 400 Ultrashield) con una sonda dual de 5 mm y en un espectrómetro de 600 MHz (Varian/Agilent Premium Compact 600), con módulo gradiente de campo pulsado y sonda de 5 mm ^1H - ^{19}F / ^{15}N - ^{31}P , usando disolventes deuterados (Aldrich). Los desplazamientos químicos se proporcionan en partes por millón (ppm) referidos a los protones residuales del disolvente deuterado utilizado y al tetrametilsilano (TMS).

El experimento ^1H - ^1H COSY (COrelated SpectroscopY) es una técnica para establecer las correlaciones spin-spin entre protones vecinos, hasta cuatro enlaces.

El experimento ^1H - ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) es una técnica para determinar qué señales surgen de los protones que están cerca el uno del otro (hasta 5 Å) a través de correlaciones espaciales.

El experimento ^1H - ^1H ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) es una técnica para determinar señales que surgen de protones a través de correlaciones espaciales por medio de la relajación spin-spin (hasta 5 Å).

El experimento HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) se usa para determinar las correlaciones entre protón y carbono directamente unidos a través de un enlace.

El experimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) da correlaciones entre los carbonos y los protones que están separados de dos a cuatro enlaces.

Las muestras que no se volatilizaban a la temperatura del inyector en el GC-EM fueron derivatizadas por sililación, con el propósito de sustituir los grupos oxhidrilo a éteres de sililo, compuestos con menor punto de ebullición y así obtener sus espectros de masas. La sililación se llevó a cabo usando 50 μL de reactivo BSTFA + TMCS, 99:1 (Sigma-Aldrich) en 50 μL de piridina con un 1 mg de la muestra durante 10 min a 100 °C en placa de calentamiento.

2.2.2 Material vegetal

Varios ejemplares de *P. vernicosum* fueron recolectados en la carretera Sisal-Hunucmá (21°05'38.0" N, 89°58'21.4" W), Yucatán (México) en el mes de octubre de 2011; la especie fue identificada por el Técnico Paulino Simá-Polanco. Los especímenes fueron colectados completamente; un ejemplar fue depositado en el herbario *U Najil Tikin Xiw* del Centro de Investigación Científica de Yucatán, con el número PSima-2999 (García-Cámara, 2014).

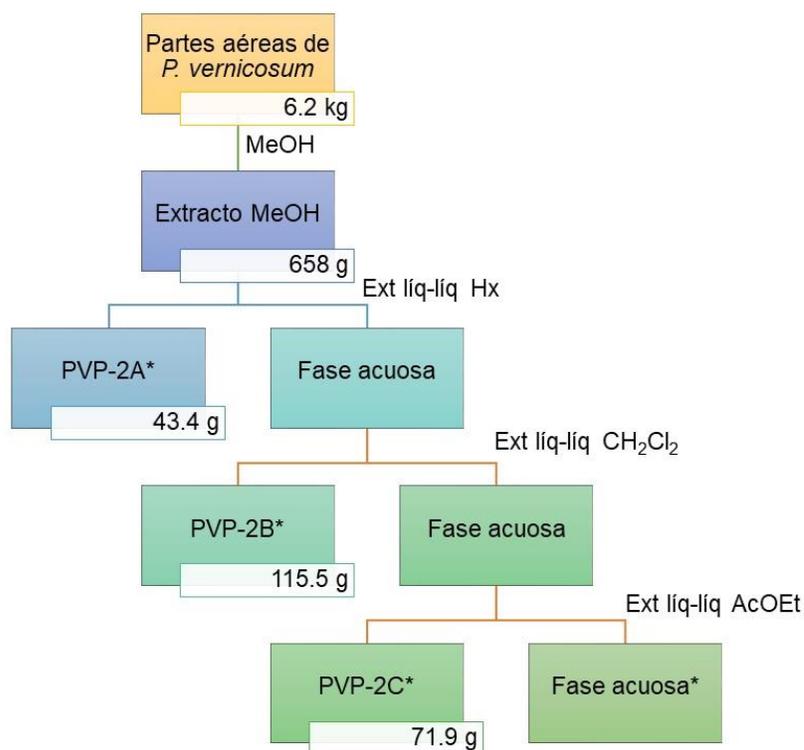
2.2.3 Obtención del extracto metanólico y particiones orgánicas

Los especímenes completos, previamente desecados a una temperatura no mayor de 50 °C, fueron pulverizados en un molino de cuchillas sin enfriamiento hasta un tamaño de partícula correspondiente a un tamiz de malla No. 10, obteniéndose 6.2 kg. El material vegetal fue sometido a un proceso de extracción con metanol (MeOH), por el método de maceración (García-Cámara, 2014).

Posteriormente, el extracto metanólico (658 g), disuelto en una mezcla de MeOH:H₂O (1:3) fue sometido a un proceso de partición líquido-líquido con hexano (Hx). A la fase hexánica se le eliminó el disolvente con ayuda de un evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose 43.4 g de la fracción hexánica (PVP-2A).

Este mismo procedimiento también fue realizado con diclorometano (CH₂Cl₂) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose 115.5 g de la fracción CH₂Cl₂ (PVP-2B) y 71.9 g de la fracción de AcOEt (PVP-2C). Finalmente, se tomó una alícuota de 5 mL del residuo acuoso y éste fue concentrado hasta obtener 149.7 mg de la fracción acuosa (PVP-2D) (Figura 2.1).

El extracto metanólico, así como las fracciones obtenidas mediante las diferentes particiones líquido-líquido, fueron sometidas a un bioensayo de citotoxicidad.



*Actividad biológica

Figura 2.1 Fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de *Phoradendron vernicosum*.

2.2.4 Estudio fitoquímico de la fracción hexánica (PVP-2A)

La fracción hexánica (43.4 g, Figura 2.2) fue fraccionada en una columna cromatográfica, por medio de cromatografía líquida al vacío (CLV) empacada con gel de sílice para ccd, utilizando como fase móvil Hx, mezclas de Hx-AcOEt (98:2 – 1:1), AcOEt y mezclas de AcOEt-MeOH (7:3 y 1:1). Así se obtuvieron 10 fracciones (PVP-3A – 3J), las cuales fueron sometidas a un nuevo bioensayo de citotoxicidad.

La fracción primaria **PVP-3C** (200 mg) se fraccionó por medio de una cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice para cc y como eluyente una mezcla de Hx-AcOEt (98:2), de la cual se obtuvo un total de nueve fracciones (PVP-4A – 4I), obteniéndose así el **compuesto I** (PVP-4g1, 81.7 mg, lupenona).

La fracción primaria **PVP-3F** (11.0 g) fue sometida a un fraccionamiento por medio de una CLV, usando como fase móvil CH₂Cl₂, mezclas de CH₂Cl₂-AcOEt (98:2 – 1:1), AcOEt y una mezcla de AcOEt-MeOH (7:3). Se obtuvo un total de once fracciones (PVP-5A – 5K). La fracción **PVP-5D** mostró la presencia de un precipitado blanco, el cual fue filtrado a gravedad, hasta obtener el **compuesto III** (PVP-5d1, 198.1 mg, ácido-3 *epi*-betulínico).

Por otro lado, el sobrenadante de la fracción **PVP-5D** fue fraccionado por medio de una cromatografía en columna, cuya fase estacionaria utilizada fue Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de Hx-cloroformo (CHCl₃)-MeOH (2:1:1), obteniéndose de esta manera siete fracciones (PVP-6A – 6G).

La fracción **PVP-6D** (1.29 g) fue purificada por cromatografía en columna con gel de sílice usando un sistema isocrático con Hx-acetona ((CH₃)₂CO) en proporción 9:1, de la cual se obtuvo el **compuesto II** (PVP-7e1, 16 mg, ácido betulínico) y la fracción PVP-7b (20 mg), que es la mezcla de los compuestos **V** (betulona) y **VI** (ácido betulínico).

La fracción **PVP-5F** (318 mg) se fraccionó por cromatografía en columna y usando como eluyente CHCl₃-AcOEt (2:8), obteniéndose así cuatro fracciones (PVP-8A – 8D). La fracción **PVP-8B** (252.5 mg) se fraccionó por cromatografía en columna con una mezcla de CHCl₃-AcOEt (9:1); de la cual se obtuvieron siete fracciones (PVP-9A – 9G). De la fracción PVP-9B se obtuvo el **compuesto IV** (PVP-9b1, 11 mg, ácido 3β,23-dihidroxilup-20(29)-en-oico).

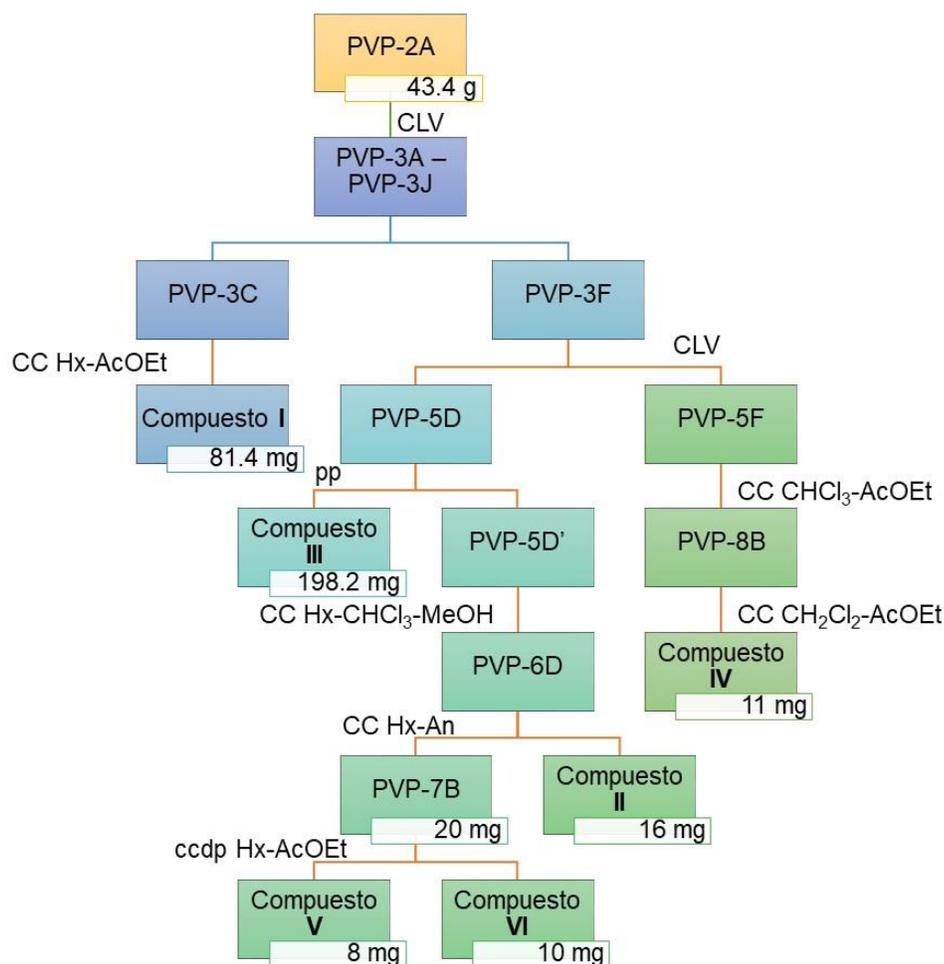


Figura 2.2 Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-3C y PVP-3F de la fracción hexánica (PVP-2A) de *Phoradendron vericosum*.

La fracción primaria **PVP-3G** (709.4 mg) (Figura 2.3) se fraccionó por cromatografía en columna usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-AcOEt}$ (9:1), obteniendo 11 fracciones, de las cuales de la fracción PVP-10K1 se obtuvo el **compuesto VII** (88.5 mg, ácido oleanólico). La fracción PVP-11I (348.6 mg) se purificó por cromatografía en columna con Hx-AcOEt (8:2) como fase móvil, obteniendo al **compuesto VIII** (68.6 mg, betulina).

Con la fracción primaria **PVP-3H** (2.9 g) se realizó una cromatografía en columna usando como eluyente Hx-AcOEt isocrático (7:3), obteniéndose trece fracciones (PVP-12A - PVP-12N), en la mayoría de las cuales se observó la presencia del compuesto **VII** (ácido oleanólico) y **VIII** (betulina); en la fracción **PVP-12J** (584.7 mg) se observó un precipitado,

el cual se separó por filtración a vacío, obteniéndose dos fracciones, PVP-13A (248.9 mg) y PVP-13B (335.8 mg). La fracción PVP-13B se fraccionó por medio de una columna cromatográfica eluida con Hx-An (8:2), obteniéndose el compuesto **IX** (PVP-14d1, 215.7 mg, ácido 3 β ,24-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico).

Por otro lado, la fracción **PVP-12N** (380.2 mg) se separó por cromatografía en columna eluida con Hx, una mezcla de Hx-AcOEt (98:2 – 1:1) y (CH₃)₂CO, de la cual se obtuvieron 73 fracciones, las cuales por medio de ccd se reunieron por similitud en 15 fracciones (PVP-15A – PVP-15O). La fracción PVP-15J (66.2 mg) fue fraccionada por cromatografía en columna usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de Hx-CHCl₃-MeOH (2:1:1), de la cual se obtuvieron seis fracciones (PVP-16A – PVP-16F), obteniendo así el compuesto **X** (PVP-16c1, 49.1 mg, ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico).

La fracción primaria **PVP-3I** (2.5 g) fue separada por cromatografía en columna usando como fase móvil CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-An (95:5 – 1:1) y se obtuvieron 16 fracciones (PVP-17A – 17P), de las cuales la fracción **PVP-17A** (51.3 mg) fue separada por medio de cromatografía en columna con Sephadex LH-20 usando el sistema Hx-CH₂Cl₂-MeOH (2:1:1), obteniéndose siete fracciones (PVP-18A – 18G); la fracción PVP-18C fue separada por ccdp obteniéndose el compuesto **XI** (4.4 mg, PVP-19b1, ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico).

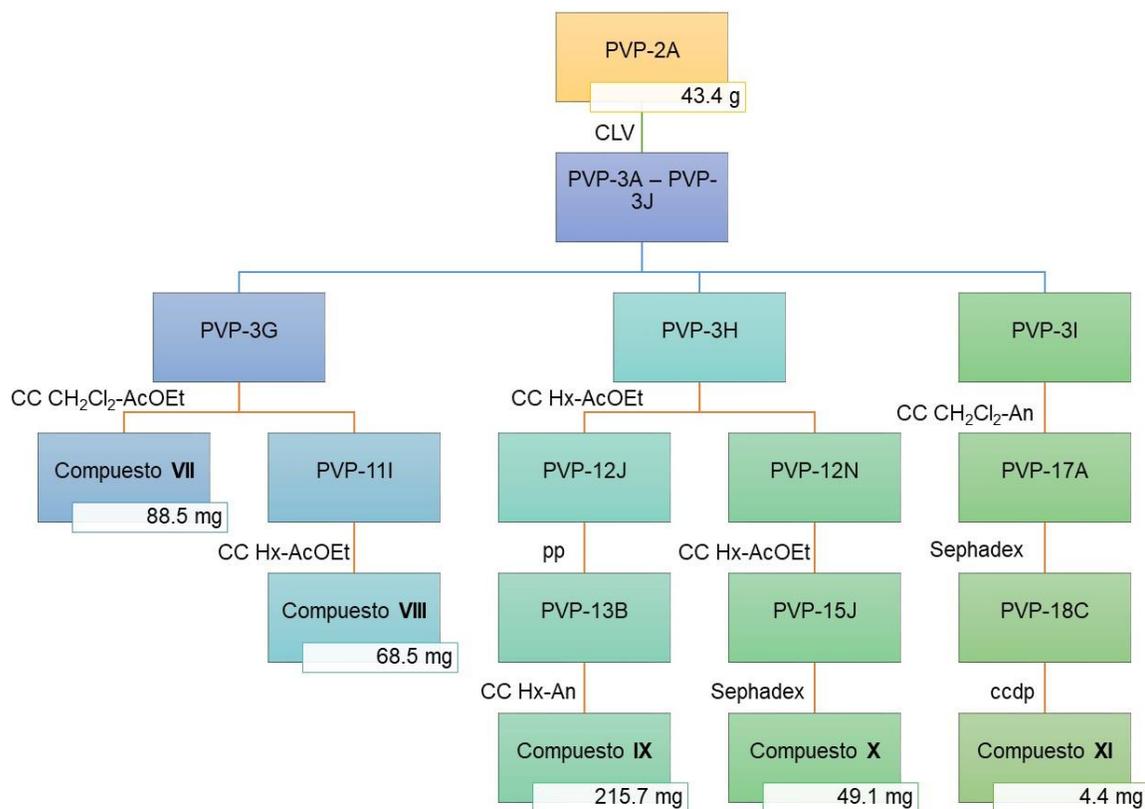


Figura 2.3 Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-3G, PVP-3H y PVP-3I de la fracción hexánica (PVP-2A) de *Phoradendron vernicosum*.

2.2.5 Estudio fitoquímico de la fracción diclorometánica (PVP-2B)

La fracción diclorometánica **PVP-2B** (115.5 g, Figura 2.4), fue fraccionada usando dos columnas, de 40 g cada una, por la técnica de CLV, empacada con gel de sílice para ccd, utilizando como fase móvil Hx, mezclas de Hx-AcOEt (95:5 - 75:25), CHCl_3 -AcOEt (9:1 - 4:6), AcOEt y mezcla de AcOEt-MeOH (6:4). De esta columna se obtuvieron 14 fracciones (PVP-19A – 19N).

Las fracciones primarias obtenidas fueron sometidas a ensayos de citotoxicidad, de las cuales las más activas serán sometidas a fraccionamientos posteriores para la purificación de los metabolitos secundarios que le pudieran conferir dicha actividad.

La fracción primaria **PVP-19F** (8.7 g) presentó un precipitado de color blanco, el cual fue filtrado a vacío, y fue nombrado como **PVP-20A** (1.70 g) y las aguas madres como **PVP-21B** (7.0 g). La fracción PVP-20A fue separada por una cromatografía en columna con sílice para flash cuya fase estacionaria fue Hx-AcOEt en gradiente (9:1 – 1:1), obteniendo 10 fracciones (PVP-21A – PVP-21J). La fracción **PVP-21D** (4.39 mg) fue separada por ccdp con un eluyente de Hx-AcOEt (9:1, 5x), obteniendo así al compuesto **XII** (PVP-22a1, 2.2 mg, 28-*nor*lup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol). La fracción **PVP-21J** (14.7 mg) fue identificada como el compuesto **III** (ácido-3-*epi*-betulínico).

La fracción **PVP-20B** se fraccionó mediante una CLV usando como fase móvil Hx, Hx-AcOEt (95:5 – 1:1) teniendo un total de 10 fracciones; la fracción **PVP-23D** (114.5 mg) fue purificada usando el equipo Sepacore empacada con sílice para ccd y como fase móvil Hx-An (9:1) de manera isocrática por 50 min a un flujo de 15 mL/min, obteniendo así la fracción **PVP-24a1** (35.7 mg, compuesto **XIII**, 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano) y la fracción **PV-24b1** (19.7 mg, compuesto **XIV**, 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo). La fracción **PVP-23E** (422.5 mg) fue separada por cromatografía en columna, con un sistema de eluyente de Hx-CO(CH₃)₂ isocrático (9:1) obteniendo 12 fracciones, de las cuales se obtuvo el compuesto **XV** (PVP-25h1, 2.0 mg, 2-metilpentano-2,3,4-triol), el compuesto **XVI** (PVP-25k1, 2.0 mg, 2-metilpentano-2,3,4-triol) y compuesto **XVII** (PVP-25j1, 3.0 mg, 2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol).

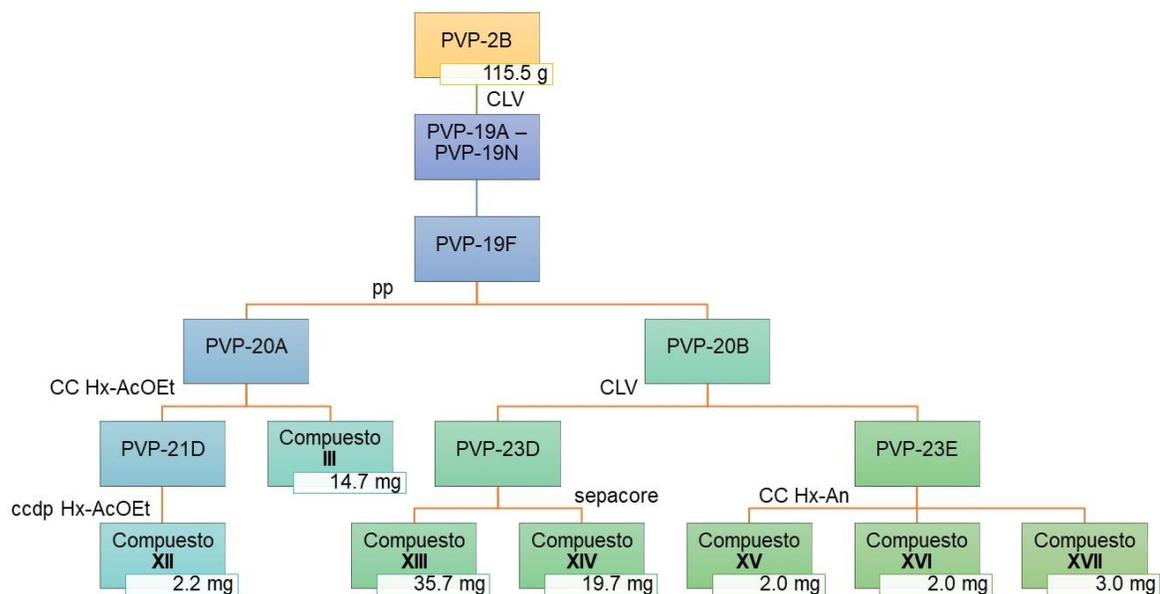


Figura 2.4 Aislamiento de metabolitos de la fracción diclorometánica (PVP-2B) de *Phoradendron vernicosum*.

2.2.6 Estudio fitoquímico de la fracción de acetato de etilo (PVP-2C)

La fracción de acetato de etilo (**PVP-2C**, 71 g, Figura 2.5) fue fraccionada por la técnica de CLV, empacada con gel de sílice para ccd, utilizando como fase móvil mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH (9:1 - 1:1); de esta columna se obtuvieron siete fracciones (PVP-26A – 26G).

La fracción **PVP-26A** (102.3 mg) fue separada por CC utilizando como fase móvil Hx, mezclas de Hx-An (9:1 – 1:1) y An, obteniendo así cuatro fracciones (PVP-27A – 27D), la fracción **PVP-27B** fue separada por ccdp usando como eluyente Hx-An (9:1, 2x), obteniendo tres fracciones (PVP-28A – 28C), en la fracción **PVP-28a1** se obtuvo el compuesto **I** (lupenona, 11.7 mg).

La fracción **PVP-26B** (94.5 mg) fue fraccionada por CC usando el sistema Hx-An (9:1) de forma isocrática, obteniendo cinco fracciones (PVP-29A – 29E); la fracción **PVP-29B** (111 mg) resultó ser una mezcla muy compleja, por lo que se decidió realizar la separación por CCDP, obteniendo nueve fracciones (PVP-30A – 30I). La fracción **PVP-30A** resultó ser el

compuesto **I** (lupenona, 2 mg), de la fracción **PVP-30C1** (7.5 mg) fue obtenido el compuesto **XIX** (28-O-acetil-betulona). De la fracción PVP-30F (10 mg) fue separado por CCDP y como fase móvil Hx-AcOEt (95:5, 6x) obteniendo tres fracciones mayoritarias (PVP-31A – 31C); de las cuales de la fracción **PVP-31B1** se obtuvo el compuesto **XI** (1.5 mg, ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico). Por otra parte, la fracción **PVP-30E** (15 mg) fue separada por CCDP, cuya fase móvil fue Hx-AcOEt (95:5, 7x), obteniendo cuatro fracciones (PVP-32A – 32D); de la fracción **PVP-32A1** (3.3 mg) se obtuvo el compuesto **XVIII** (lupeol).

La fracción **PVP-26C** (6.66 g) fue separada por CLV utilizando el sistema Hx, mezclas de Hx-(CH₃)₂CO (95:5 – 1:1) y (CH₃)₂CO, obteniendo 11 fracciones (PVP-33A – 33K). La fracción **PVP-33E** (641.2 mg) se fraccionó por CC y como fase móvil CH₂Cl₂ y mezclas de CH₂Cl₂-(CH₃)₂CO (99:1 – 66:34), obteniendo 15 fracciones (PVP-34A – 34O). De la fracción **PVP-34D1** (15.9 mg) se obtuvo el compuesto **XX** (naringenina, 5.4 mg) por CCDP y como fase móvil Hx-(CH₃)₂CO (8:2, 2x). La fracción **PVP-34E** (27 mg) fue separada por CCDP usando como fase móvil Hx-AcOEt (8:2) obteniendo el compuesto **XI** (PVP-35A1, 2.2 mg, ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico).

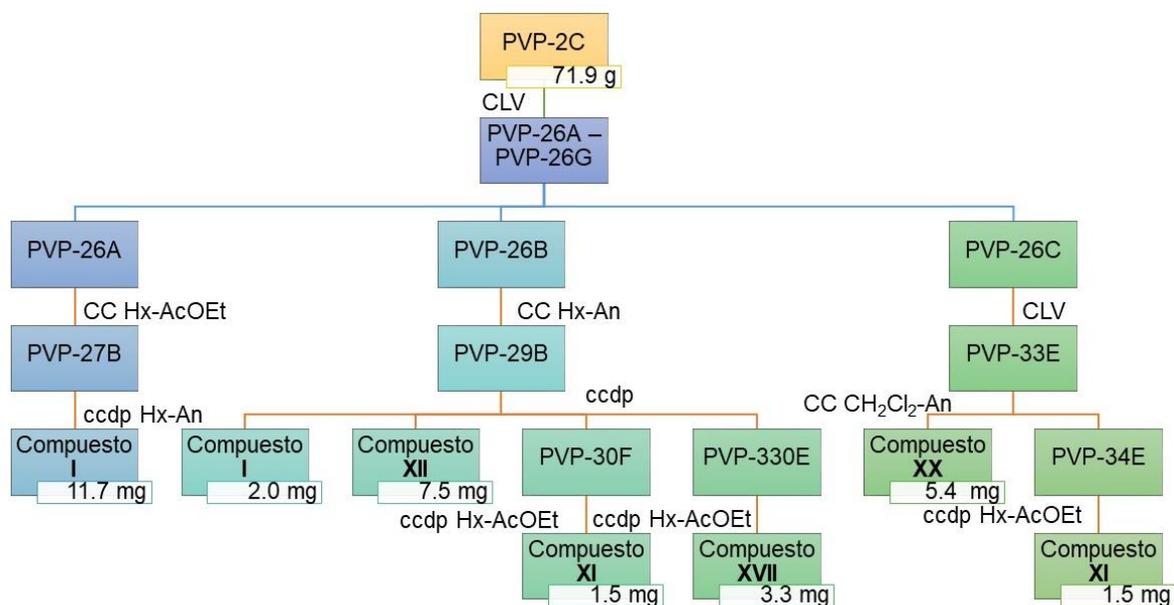


Figura 2.5 Aislamiento de metabolitos de las fracciones primarias PVP-26A y PVP-26B de la fracción de acetato de etilo (PVP-2C) de *Phoradendron vernicosum*.

2.2.7 Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos

Compuesto I (Lupenona): IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3000, 2912, 1702 cm^{-1} . EM (70 eV) 424 (47), 409 (46), 205 (100), 189 (48) m/z . **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ 2.45 (1H, m, H-19 β), 1.06 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-26), 0.78 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, s, H-28), 4.68 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-29a), 4.56 (1H, dd, $J = 2.4, 1.2$ Hz, H-29b), 1.67 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ 218.4 (C, C-3), 43.0 (CH, C-19), 34.0 (CH₃, C-23), 33.7 (CH₃, C-24), 19.4 (CH₃, C-25), 18.1 (CH₃, C-26), 14.6 (CH₃, C-27), 19.8 (CH₃, C-28), 109.5 (CH₂, C-29), 21.1 (CH₃, C-30).

Compuesto II (Ácido betulínico): IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3100, 1687 cm^{-1} . EM [sililado] (70 eV) 600 (2), 189 (73), 73 (100) m/z . **RMN-¹H** (600 MHz, piridina- d_5) δ 3.47 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-3), 3.55 (1H, ddd, $J = 11.4, 11.4, 6.0$ Hz, H-19 β), 1.24 (3H, s, H-23), 1.09 (3H, s, H-24), 1.02 (3H, s, H-25), 1.08 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-27), 4.96 (1H, s, H-29a), 4.78 (1H, s, H-29b), 1.81 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (150 MHz, piridina- d_5) δ 78.5 (C, C-3), 48.2 (CH, C-19), 26.5 (CH₃, C-23), 15.3 (CH₃, C-24), 16.7 (CH₃, C-25), 16.8 (CH₃, C-26), 15.3 (CH₃, C-27), 179.2 (CH₃, C-28), 110.3 (CH₂, C-29), 19.8 (CH₃, C-30).

Compuesto III (Ácido 3-epi-betulínico): IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3444, 1694 cm^{-1} . EM [sililado] (70 eV) 600 (2), 189 (60), 73 (100) m/z . **RMN-¹H** (600 MHz, acetona- d_6) δ 3.30 (1H, pt, $J = 2.8$ Hz, H-3), 3.05 (1H, ddd, $J = 10.8, 5.4, 5.4$ Hz, H-19 β), 1.03 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-26), 0.80 (3H, s, H-27), 4.72 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 1.69 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (150 MHz, Acetona- d_6) δ 75.7 (C, C-3), 47.9 (CH, C-19), 26.4 (CH₃, C-23), 15.0 (CH₃, C-24), 16.4 (CH₃, C-25), 16.5 (CH₃, C-26), 15.0 (CH₃, C-27), 177.5 (CH₃, C-28), 109.9 (CH₂, C-29), 19.4 (CH₃, C-30).

Compuesto IV (Ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico): **RMN-¹H** (600 MHz, CDCl_3) δ 3.67 (1H, pt, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.00 (1H, m, H-19 β), 3.53 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23a), 3.40 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23b), 0.68 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-27), 4.74 (1H, sa, H-29a), 4.61 (1H, sa, H-29b), 1.60 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (150 MHz, CDCl_3) δ 76.6 (C, C-3), 46.9 (CH, C-19), 71.4 (CH₂, C-23), 18.0 (CH₃, C-24), 16.2 (CH₃, C-25), 16.2 (CH₃, C-26), 14.8 (CH₃, C-27), 180.0 (CH₃, C-28), 109.7 (CH₂, C-29), 19.4 (CH₃, C-30).

Compuesto V (Betulona): IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3500, 1702 cm^{-1} . **RMN-¹H** (600 MHz, CDCl_3) δ 1.07 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, d, H-24), 0.92 (3H, s, H-25), 1.06 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-27), 3.79 (1H, s, H-28a), 3.33 (1H, s, H-28b), 4.68 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 1.68 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (150 MHz, CDCl_3) δ 218.2 (C, C-3), 25.4 (CH_3 , C-23), 21.2 (CH_3 , C-24), 15.9 (CH_3 , C-25), 16.1 (CH_3 , C-26), 14.8 (CH_3 , C-27), 60.7 (CH_2 , C-28), 109.9 (CH_2 , C-29), 19.2 (CH_3 , C-30).

Compuesto VI (Ácido betulónico): IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 2942, 1697 cm^{-1} . **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl_3) δ 3.01 (1H, td, $J = 10.8, 4.4$ Hz, H-19 β), 1.06 (3H, s, H-23), 1.01 (3H, s, H-24), 0.92 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 4.73 (1H, s, H-29a), 4.60 (1H, s, H-29b), 1.68 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl_3) δ 218.6 (C, C-3), 47.0 (CH, C-19), 26.7 (CH_3 , C-23), 21.1 (CH_3 , C-24), 16.1 (CH_3 , C-25), 15.9 (CH_3 , C-26), 14.7 (CH_3 , C-27), 181.9 (CH_3 , C-28), 109.9 (CH_2 , C-29), 19.5 (CH_3 , C-30).

Compuesto VII (Ácido oleanólico): R_f 0.51 en $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CO}(\text{CH}_3)_2$ (98:2, 2x). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3500, 3068, 1692 cm^{-1} . EM [sililado] (70 eV) 600 (2), 585 (5), 482 (25), 320 (26), 203 (100), 189 (40), 73 (60) m/z .

Compuesto VIII (Betulina): R_f 0.70 en Hx-AcOEt (8:2), IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3500, 3075, 1684 cm^{-1} . EM [sililado] (70 eV) 586 (5), 496 (30), 393 (30), 203 (80), 189 (90), 73 (100) m/z .

Compuesto IX (Ácido 3 α ,24-dihroxilup-20(29)-en-28-oico): pf 199-200 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -35.0 (c 0.2, CHCl_3). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3500, 3070, 2942, 1699, 1635 cm^{-1} . EM (70 eV) [sililado] 688 (1), 598 (20), 189 (25), 73 (100) m/z . EMAR (FAB) m/z 472.3545 (calcd para $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$, 472.3552). **RMN-¹H** (600 MHz, piridina- d_5) δ 1.79 (1H, m, H-1a), 1.37 (1H, m, H-1b), 1.97 (1H, m, H-2a), 1.76 (1H, m, H-2b), 3.95 (1H, sa, H-3), 2.12 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 1.59 (1H, m, H-6a), 1.39 (1H, m, H-6b), 1.65 (1H, t, $J = 11.4$ Hz, H-9), 1.51 (1H, m, H-11a), 1.22 (1H, m, H-11b), 1.95 (1H, m, H-12a), 1.19 (1H, m, H-12b), 2.74 (1H, t, $J = 12.0$ Hz, H-13), 1.86 (1H, t, $J = 13.2$ Hz, H-15a), 1.21 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-15b), 2.61 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-16), 1.70 (1H, m, H-18), 3.55 (1H, m, H-19), 2.25 (1H, m, H-21a), 1.51 (1H, m, H-21b), 2.25 (1H, m, H-22a), 1.59 (1H, m, H-22b), 0.78 (3H, s, H-23), 3.89 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-24a), 3.70 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-24b), 0.89 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, s, H-26), 1.11 (3H, s, H-27), 4.95 (1H, sa, H-29a), 4.78 (1H, sa, H-29b), 1.79 (3H, s, H-30). **RMN-¹³C** (150 MHz, piridina- d_5) δ 34.2 (CH_2 , C-1), 27.2 (CH_2 , C-2), 76.3 (CH, C-3), 41.4

(C, C-4), 44.2 (CH, C-5), 18.9 (CH₂, C-6), 35.0 (CH₂, C-7), 41.8 (C, C-8), 51.4 (CH, C-9), 38.1 (C, C-10), 21.7 (CH₂, C-11), 26.6 (CH₂, C-12), 39.1 (CH, C-13), 43.4 (C, C-14), 30.7 (CH₂, C-15), 33.3 (CH₂, C-16), 57.1 (C, C-17), 50.2 (CH, C-18), 48.3 (CH, C-19), 151.8 (C, C-20), 31.7 (CH₂, C-21), 38.0 (CH₂, C-22), 18.5 (CH₃, C-23), 71.9 (CH₂, C-24), 17.0 (CH₃, C-25), 15.4 (CH₃, C-26), 17.1 (CH₃, C-27), 179.4 (C, C-28), 110.4 (CH₂, C-29), 19.9 (CH₃, C-30).

Compuesto X (Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico): pf 188-190 °C. $[\alpha]_D^{26}$ -30.9 (c 0.5, CHCl₃-MeOH, 1:1). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3500, 2942, 1692 cm⁻¹. EMAR (FAB) m/z 486.3338 (calcd para C₃₀H₄₆O₅, 486.3345). RMN-¹H (600 MHz, piridina-*d*₅) δ 1.73 (1H, m, H-1a), 1.45 (1H, m, H-1b), 1.93 (1H, m, H-2a), 1.75 (1H, m, H-2b), 3.94 (1H, sa, H-3), 2.10 (1H, m, H-5), 1.58 (1H, m, H-6a), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.60 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-9), 1.44 (1H, m, H-11a), 1.12 (1H, m, H-11b), 1.42 (1H, m, H-12a), 1.02 (1H, m, H-12b), 2.69 (1H, ddd, J = 12.6, 12.6, 2.4 Hz, H-13), 1.85 (1H, m, H-15a), 1.22 (1H, m, H-15b), 2.23 (1H, m, H-16a), 1.55 (1H, m, H-16b), 2.60 (1H, m, H-18), 3.97 (1H, m, H-19), 2.45 (1H, m, H-21a), 1.56 (1H, m, H-21b), 2.24 (1H, m, H-22a), 1.81 (1H, m, H-22b), 3.88 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-23a), 3.69 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-23b), 0.77 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-25), 1.06 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 6.37 (1H, s, H-29a), 6.00 (1H, sa, H-29b), 9.73 (1H, s, H-30). RMN-¹³C (150 MHz, piridina-*d*₅) δ 34.2 (CH₂, C-1), 27.2 (CH₂, C-2), 76.2 (CH, C-3), 41.3 (C, C-4), 56.2 (CH, C-5), 18.9 (CH₂, C-6), 35.0 (CH₂, C-7), 41.7 (C, C-8), 51.3 (CH, C-9), 37.9 (C, C-10), 21.6 (CH₂, C-11), 28.4 (CH₂, C-12), 38.9 (CH, C-13), 43.3 (C, C-14), 30.7 (CH₂, C-15), 33.1 (CH₂, C-16), 57.3 (C, C-17), 51.7 (CH, C-18), 51.2 (CH, C-19), 158.1 (C, C-20), 32.7 (CH₂, C-21), 37.9 (CH₂, C-22), 71.8 (CH₂, C-23), 18.5 (CH₃, C-24), 17.1 (CH₃, C-25), 16.9 (CH₃, C-26), 15.3 (CH₃, C-27), 179.2 (C, C-28), 134.2 (CH₂, C-29), 195.8 (CH, C-30).

Compuesto XI (Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-28-oico): pf 111-113 °C. $[\alpha]_D^{26}$ -14.8 (c 0.5, CHCl₃-MeOH, 1:1). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3068, 2984, 2937, 2870, 1731, 1699, 1650, 1195 cm⁻¹. EMAR (FAB) m/z 512.3841 (calcd para C₃₃H₅₂O₄, 512.3865). RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (1H, m, H-1a), 1.28 (1H, m, H-1b), 1.83 (1H, t, J = 13.5 Hz, H-2a), 1.43 (1H, m, H-2b), 3.61 (1H, sa, H-3), 1.78 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-5), 1.36 (1H, t, J = 7.2 Hz, H-6a), 1.29 (1H, d, J = 13.5 Hz, H-6b), 1.52 (1H, m, H-7a), 1.33 (1H, m, H-7b), 1.46 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-9), 1.46 (1H, m, H-11a), 1.23 (1H, m, H-11b),

1.69 (1H, m, H-12a), 1.06 (1H, dd, $J = 12.6, 3.6$ Hz, H-12b), 2.17 (1H, td, $J = 12.6, 1.8$ Hz, H-13), 1.52 (1H, m, H-15a), 1.19 (1H, m, H-15b), 2.26 (1H, m, H-16a), 1.41 (1H, m, H-16b), 1.61 (1H, t, $J = 11.4$ Hz, H-18), 3.01 (1H, ddd, $J = 10.8, 10.8, 4.8$ Hz, H-19), 1.98 (1H, m, H-21a), 1.40 (1H, m, H-21b), 1.96 (1H, m, H-22a), 1.47 (1H, m, H-22b), 3.66 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23a), 3.23 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23b), 0.68 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-27), 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 1.69 (1H, s, H-30), acetonido 1.41 (3H, s), 1.41 (3H, s). **RMN- ^{13}C** (150 MHz, CDCl_3) δ 33.1 (CH_2 , C-1), 23.6 (CH_2 , C-2), 73.0 (CH, C-3), 35.1 (C, C-4), 43.0 (CH, C-5), 17.7 (CH_2 , C-6), 34.0 (CH_2 , C-7), 40.8 (C, C-8), 50.2 (CH, C-9), 36.9 (C, C-10), 20.6 (CH_2 , C-11), 25.4 (CH_2 , C-12), 38.3 (CH, C-13), 42.4 (C, C-14), 29.6 (CH_2 , C-15), 33.1 (CH_2 , C-16), 56.3 (C, C-17), 49.2 (CH, C-18), 46.9 (CH, C-19), 150.4 (C, C-20), 30.5 (CH_2 , C-21), 37.0 (CH_2 , C-22), 68.3 (CH_2 , C-23), 17.2 (CH_2 , C-24), 16.5 (CH_3 , C-25), 16.1 (CH_3 , C-26), 14.8 (CH_3 , C-27), 182.0 (C, C-28), 109.6 (CH_2 , C-29), 19.3 (CH, C-30), acetonido 29.2 (CH_3), 19.3 (CH_3), 98.0 (C).

Compuesto XII (28-norlup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol): **RMN- ^1H** (600 MHz, CDCl_3) δ 1.60 (1H, m, H-1a), 1.47 (1H, m, H-1b), 1.93 (1H, m, H-2a), 1.53 (1H, m, H-2b), 3.39 (1H, pt, $J = 2.9$ Hz, H-3), 1.20 (1H, m, H-5), 1.39 (1H, m, H-6a), 1.36 (1H, m, H-6b), 1.43 (1H, m, H-7a), 1.39 (1H, m, H-7b), 1.39 (1H, m, H-9), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.23 (1H, m, H-11b), 1.93 (1H, m, H-12a), 1.69 (1H, m, H-12b), 1.82 (1H, m, H-13), 1.39 (1H, m, H-15a), 1.24 (1H, m, H-15b), 1.79 (1H, m, H-16a), 1.09 (1H, m, H-16b), 1.47 (1H, m, H-18), 2.60 (1H, ddd, $J = 10.8, 10.8, 6.1$ Hz, H-19), 2.05 (1H, m, H-21a), 1.40 (1H, m, H-21b), 1.60 (1H, m, H-22a), 1.48 (1H, m, H-22b), 0.94 (1H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 1.04 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 4.73 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-29a), 4.61 (1H, dd, $J = 2.3, 1.4$ Hz, H-29b), 1.68 (1H, s, H-30). **RMN- ^{13}C** (150 MHz, CDCl_3) δ 35.5 (CH_2 , C-1), 25.6 (CH_2 , C-2), 76.4 (CH, C-3), 37.9 (C, C-4), 49.2 (CH, C-5), 18.4 (CH_2 , C-6), 34.4 (CH_2 , C-7), 41.1 (C, C-8), 50.5 (CH, C-9), 37.5 (C, C-10), 21.0 (CH_2 , C-11), 25.3 (CH_2 , C-12), 37.7 (CH, C-13), 42.2 (C, C-14), 29.9 (CH_2 , C-15), 27.0 (CH_2 , C-16), 80.6 (C, C-17), 48.6 (CH, C-18), 48.3 (CH, C-19), 150.2 (C, C-20), 29.6 (CH_2 , C-21), 38.6 (CH_2 , C-22), 28.4 (CH_2 , C-23), 22.3 (CH_2 , C-24), 16.3 (CH_3 , C-25), 16.2 (CH_3 , C-26), 14.1 (CH_3 , C-27), 109.9 (CH_2 , C-29), 19.4 (CH, C-30).

Compuesto XIII (3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano): RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 3.23 (1H, t, *J* = 11.7 Hz, H-1a), 3.02 (1H, d, *J* = 7.2, H-1b), 4.76 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-3), 2.06 (1H, d, *J* = 4.0, 2.9 Hz, H-4), 0.97 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-5), 1.01 (3H, s, CH₃ en C-2), 0.85 (3H, s, CH₃ en C-2), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8, CH₃ en C-5), 2.65 (1H, hept, *J* = 6.9 Hz, H-2'), 1.21 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 2x, isopropilo).

Compuesto XIV (1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo): RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-1a), 3.74 (1H, d, *J* = 13.0, H-1b), 3.23 (1H, sa, H-3), 1.90 (1H, d, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-4), 0.99 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-5), 0.95 (3H, s, CH₃ en C-2), 0.94 (3H, s, CH₃ en C-2), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7, CH₃ en C-5), 2.56 (1H, hept, *J* = 7.1 Hz, H-2'), 1.17 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 2x, isopropilo).

Compuesto XV (2-metilpentano-2,3,4-triol): RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (3H, s, H-1), 3.30 (1H, dd, *J* = 6.0, 0.6 Hz, H-3), 3.92 (1H, cd, *J* = 6.0, 0.6 Hz, H-4), 1.31 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-5), 1.27 (3H, s, H-6). RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃) 25.8 (CH₃, C-1), 73.4 (C, C-2), 80.0 (CH, C-3), 69.3 (CH, C-4), 20.3 (CH₃, C-5), 26.8 (CH₃, C-6).

Compuesto XVI (2-metilpentano-2,3,4-triol): RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (3H, s, H-1), 3.31 (1H, s, H-3), 4.21 (1H, c, *J* = 6.6, H-4), 1.28 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-5), 1.30 (3H, s, H-6). RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃) 26.3 (CH₃, C-1), 74.3 (C, C-2), 77.9 (CH, C-3), 67.4 (CH, C-4), 20.8 (CH₃, C-5), 27.6 (CH₃, C-6).

Compuesto XVII (2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol): RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, H-1a), 3.83 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, H-1b), 1.27 (3H, s, H-4), 1.26 (3H, s, H-5), 1.20 (3H, s, H-6). RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃) 73.2 (CH₂, C-1), 73.2 (C, C-2), 75.3 (C, C-3), 18.4 (CH₃, C-4), 18.0 (CH₃, C-5), 18.0 (CH₃, C-6).

Compuesto XVIII (Lupeol): EM (70 eV) 426 (20), 207 (70), 189 (74), 95 (100) *m/z*.

Compuesto XIX (28-O-acetil-betulona): RMN-¹H (600 MHz, piridina-*d*₅) δ 1.80 (1H, dd, *J* = 11.4, 6.6 Hz, H-1a), 1.35 (1H, m, H-1b), 2.54 (1H, dd, *J* = 6.6, 4.2 Hz, H-2a), 2.50 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2b), 1.34 (1H, m, H-5), 1.39 (2H, m, H-6), 1.37 (2H, m, H-7), 1.36 (2H, m, H-9), 1.33 (1H, m, H-11), 1.72 (2H, m, H-12), 1.71 (2H, m, H-13), 1.03 (2H, m, H-15), 1.76 (2H, m, H-16), 1.69 (2H, m, H-18), 2.58 (1H, m, H-19), 2.00 (1H, m, H-21a), 1.34 (1H, m, H-21b), 1.95 (1H, m, H-22a), 1.19 (1H, m, H-22b), 1.15 (3H, s, H-23), 1.06 (3H, s, H-24),

1.02 (3H, s, H-25), 0.88 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-27), 4.25 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-28a), 4.10 (3H, d, $J = 12.0$ Hz, H-28b), 4.91 (1H, s, H-29a), 4.78 (1H, s, H-29b), 1.76 (3H, s, 30), acetilo 2.14 (3H, s, H-32), **RMN-¹³C** (150 MHz, CDCl₃) δ 40.1 (CH₂, C-1), 34.6 (CH₂, C-2), 217.0 (C, C-3), 48.4 (C, C-4), 55.4 (CH, C-5), 19.7 (CH₂, C-6), 34.2 (CH₂, C-7), 41.4 (C, C-8), 50.4 (CH, C-9), 35.3 (C, C-10), 21.7 (CH₂, C-11), 26.0 (CH₂, C-12), 38.2 (CH, C-13), 43.3 (C, C-14), 27.2 (CH₂, C-15), 27.9 (CH₂, C-16), 47.2 (C, C-17), 49.3 (CH, C-18), 47.9 (CH, C-19), 151.0 (C, C-20), 30.5 (CH₂, C-21), 34.8 (CH₂, C-22), 26.8 (CH₃, C-23), 21.4 (CH₃, C-24), 16.1 (CH₃, C-25), 16.3 (CH₃, C-26), 15.2 (CH₃, C-27), 63.2 (CH₂, C-28), 110.8 (CH₂, C-29), 18.8 (CH, C-30), acetilo 171.1 (C, C-31), 21.4 (CH₃, C-32).

Compuesto XX (Naringenina): **RMN-¹H** (600 MHz, CD₃OD: D₂O 1:1) δ 5.44 (1H, dd, $J = 12.6, 1.8$ Hz, H-2), 2.71 (1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H-3_{ax}), 3.16 (1H, dd, $J = 16.8, 12.6$ Hz, H-3_{eq}), 5.93 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.94 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 7.37 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 6.88 (1H, s, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.37 (1H, s, $J = 8.4$ Hz, H-6').

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de repetidas corridas cromatográficas se aislaron 20 metabolitos de los cuales, cinco han resultado novedosos.

Lupenona (I)

Del compuesto **I** se obtuvo 81.4 mg como un sólido en forma de agujas de color blanco, soluble en diclorometano.

En el espectro de IR (Figura 2.6) se observaron las siguientes señales: a 3000 cm^{-1} una señal atribuible al estiramiento C-H de carbonos sp^2 , a 2912 cm^{-1} una señal característica de estiramiento C-H de alcanos y una señal a 1702 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de un grupo carbonilo de cetona. De igual manera, una muestra del compuesto **I** fue inyectada al CG-EM mostrando un ion molecular de 424 m/z y un pico base de 205 m/z (Figura 2.7).

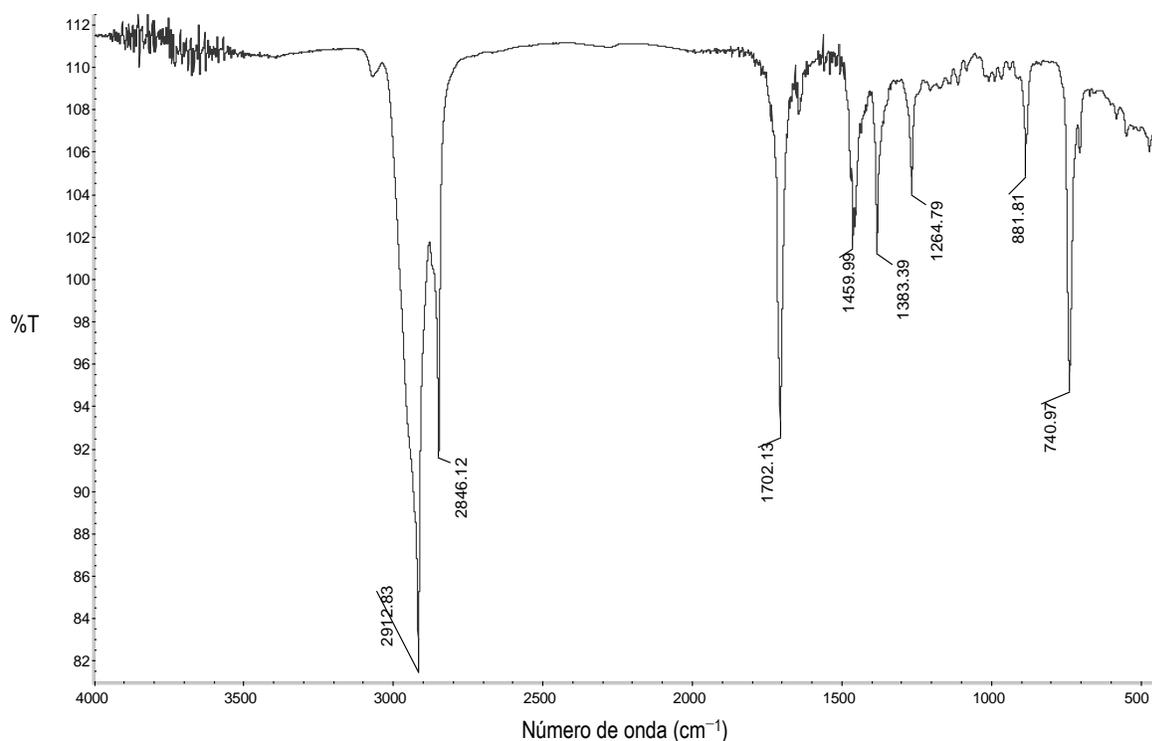


Figura 2.6 Espectro de IR (película) del compuesto I.

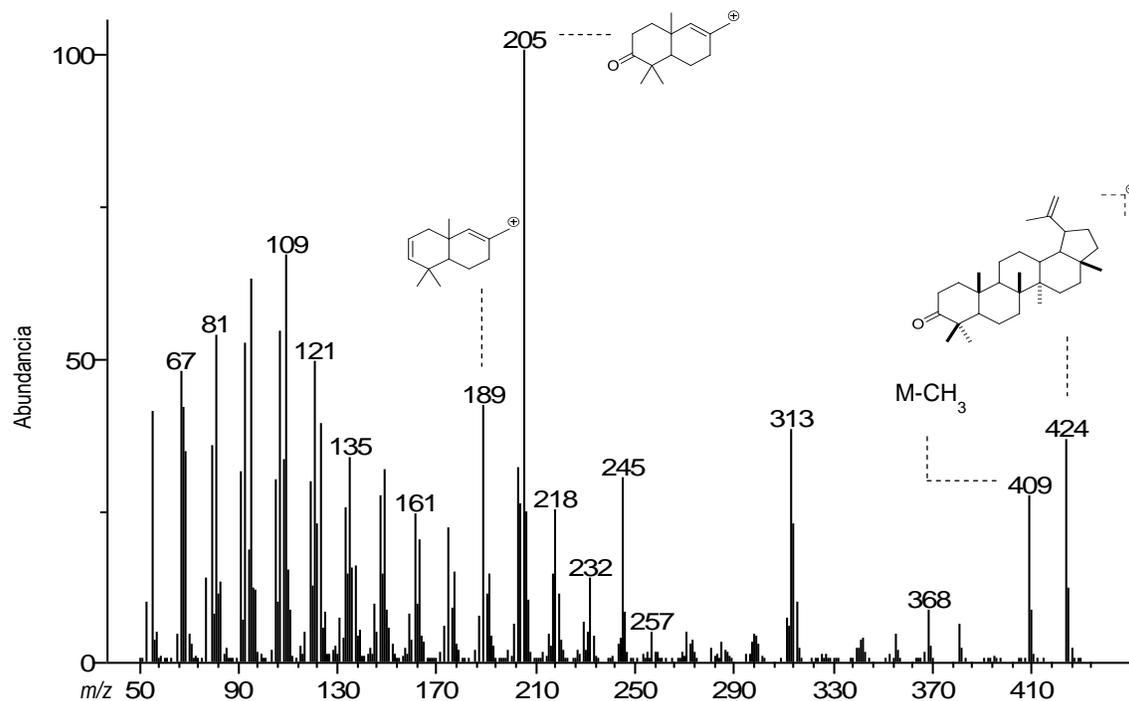


Figura 2.7 Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto I.

El espectro de RMN-¹H (Figura 2.8) del compuesto I presentó siete señales simples correspondientes al mismo número de metilos angulares (δ 1.67, 1.06, 1.05, 1.01, 0.94, 0.92 y 0.78), una señal múltiple a δ 2.40 característica de protones alfa a carbonilo, así también se observaron dos señales, una señal doble a δ 4.68 ($J = 2.4$ Hz) y una señal doble de dobles a δ 4.56 ($J = 2.4, 1.2$ Hz), correspondientes a protones de grupos olefínicos.

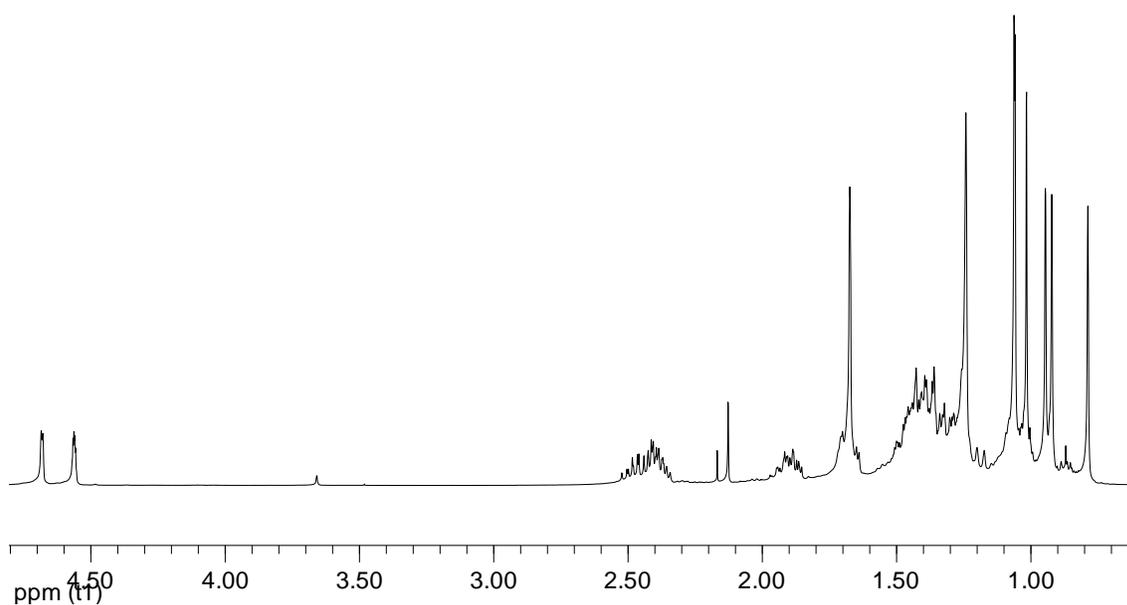


Figura 2.8 Espectro de RMN- ^1H del compuesto I en CDCl_3 a 400 MHz.

En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron señales a δ 218.4, característica de un grupo cetona, y a δ 151.0 y 109.5 de carbonos olefínicos (Figura 2.9), además de las señales de carbonos alifáticos a un menor desplazamiento químico.

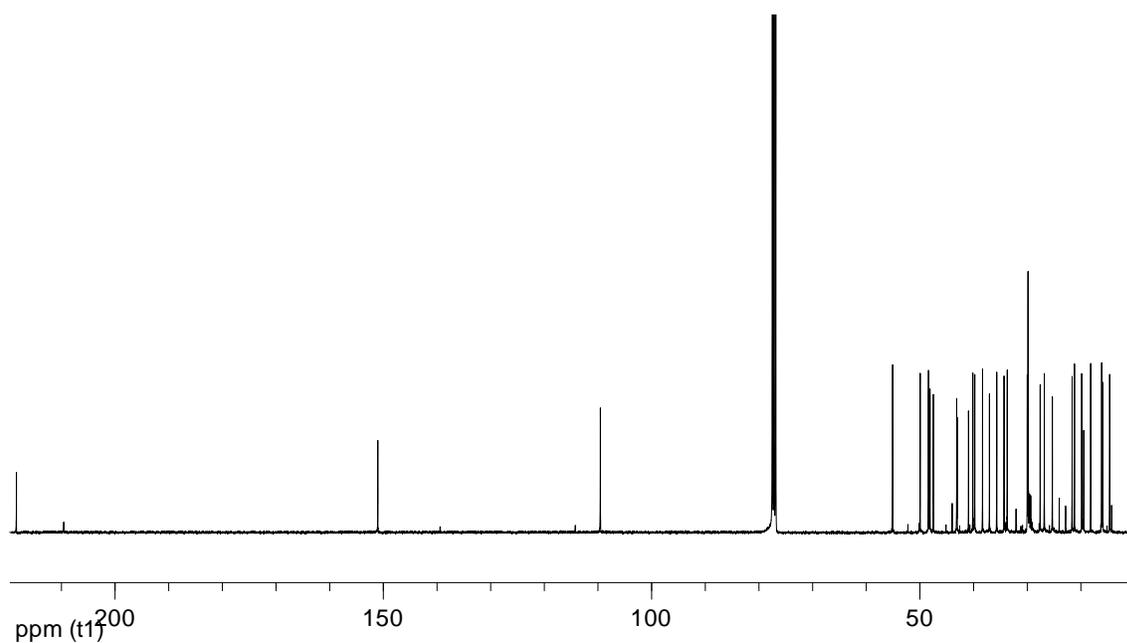


Figura 2.9 Espectro de RMN- ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del compuesto I.

Estas características sugirieron que el esqueleto del **compuesto I** corresponde al de un triterpeno de tipo lupano, posiblemente con un grupo carbonilo en la posición 3. Con base en los datos espectroscópicos obtenidos y de acuerdo a lo descrito en la literatura (Pereira *et al.*, 1996) (Cuadro 2.1) se identificó al **compuesto I** como lupenona (Figura 2.10).

Cuadro 2.1 Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN-¹H (400 MHz) y RMN-¹³C (100 MHz) determinados en CDCl₃ del compuesto **I** con lupenona.

Posición	Lupenona		Compuesto I	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
3	---	218.2	---	218.4
19β	2.48 (sex)	42.6	2.45 (m)	43.0
23	1.12 (s)	32.3	1.06 (s)	34.0
24	1.02 (s)	32.0	1.05 (s)	33.7
25	0.94 (s)	18.9	0.94 (s)	19.4
26	0.98 (s)	18.0	1.01 (s)	18.1
27	0.77 (s)	15.1	0.78 (s)	14.6
28	0.85 (s)	20.2	0.92 (s)	19.8
29	4.91 (d), 4.79 (dd)	108.8	4.68 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz), 4.56 (dd, <i>J</i> = 2.4, 1.2 Hz)	109.5
30	1.75 (s)	21.0	1.67 (s)	21.1

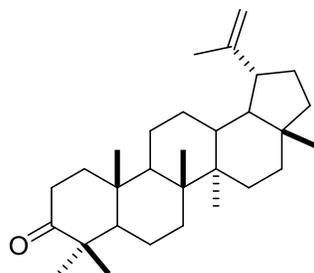


Figura 2.10 Estructura del compuesto **I** (lupenona) (Pereira *et al.*, 1996).

La lupenona es un compuesto ampliamente distribuido en las plantas; fue aislada por primera vez de la corteza de *Albus incana* en 1961 (Pereira *et al.*, 1996).

Ácido betulínico (II)

El compuesto **II** (16.0 mg) se obtuvo como un sólido en forma de agujas de color blanco, soluble en CHCl₃-MeOH (1:1). En el espectro de IR se puede observar una señal ancha a aproximadamente 3100 cm⁻¹, característica de oxhidrilos, y una señal aguda a 1687 cm⁻¹ correspondiente a carbonilo de tipo ácido (Figura 2.11).

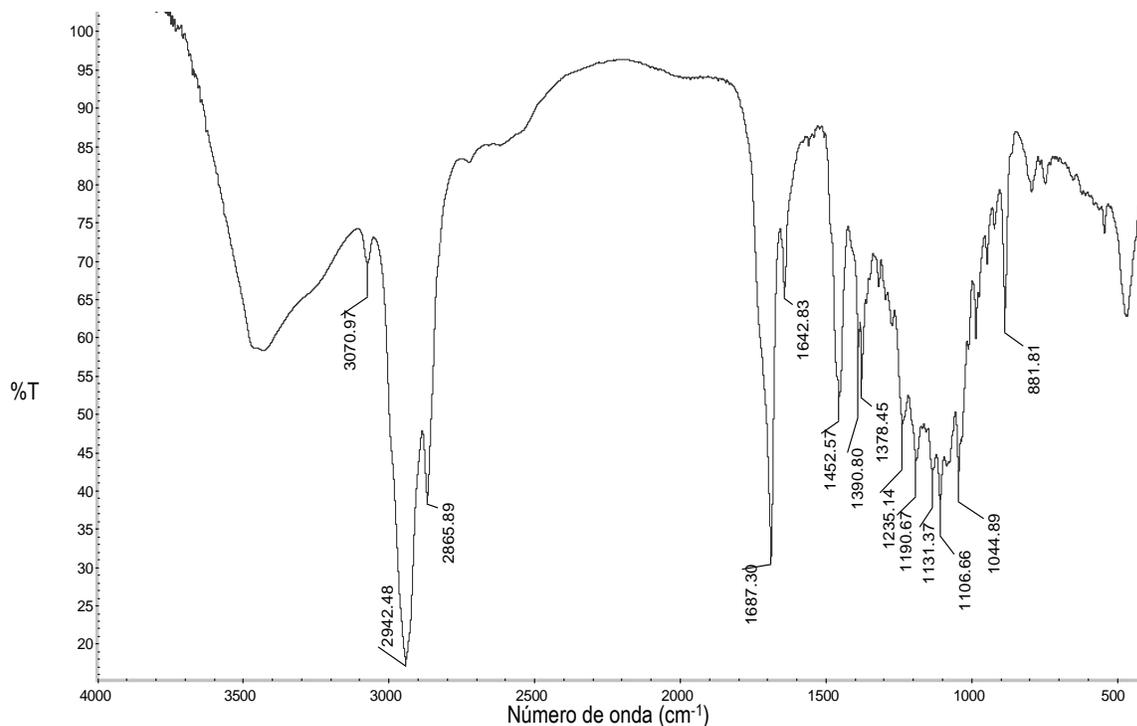


Figura 2.11 Espectro de IR (pastilla KBr) del compuesto II.

Adicionalmente, el compuesto II fue derivatizado por medio de una sililación para poder ser inyectado en el CG-EM, en cuyo cromatograma se observó una señal con tiempo de retención (t_R) de 17.44 min (Figura 2.12) y se obtuvo en el espectro de masas (Figura 2.13) un ion molecular de 600 m/z correspondiente a la masa molecular del compuesto derivatizado, así como un pico base de 73 m/z característica del grupo trimetilsilil. Estos fragmentos fueron comparados con lo reportado en la literatura (Moldoveanu, 2014; Caligiani *et al.*, 2013; Ayatollahi *et al.*, 2011) y con los espectros de masas de estándares de la biblioteca NIST del equipo, observándose un alto porcentaje (98%) de coincidencia con el ácido betulínico, por lo cual es posible que se trate del mismo compuesto.

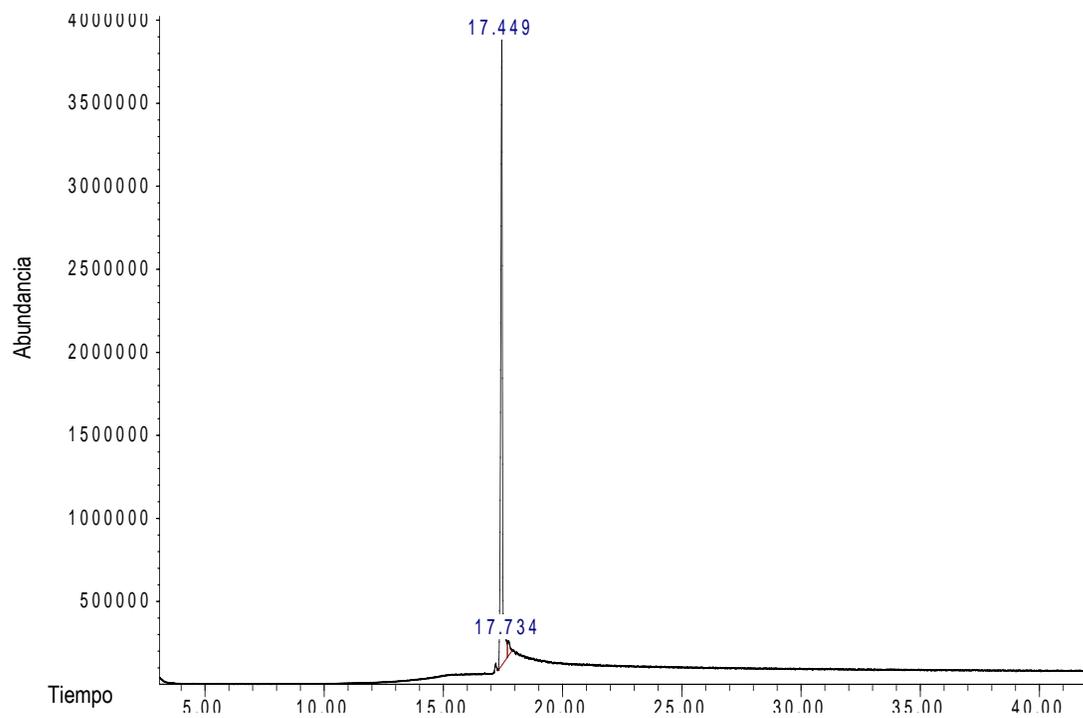


Figura 2.12 Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto II.

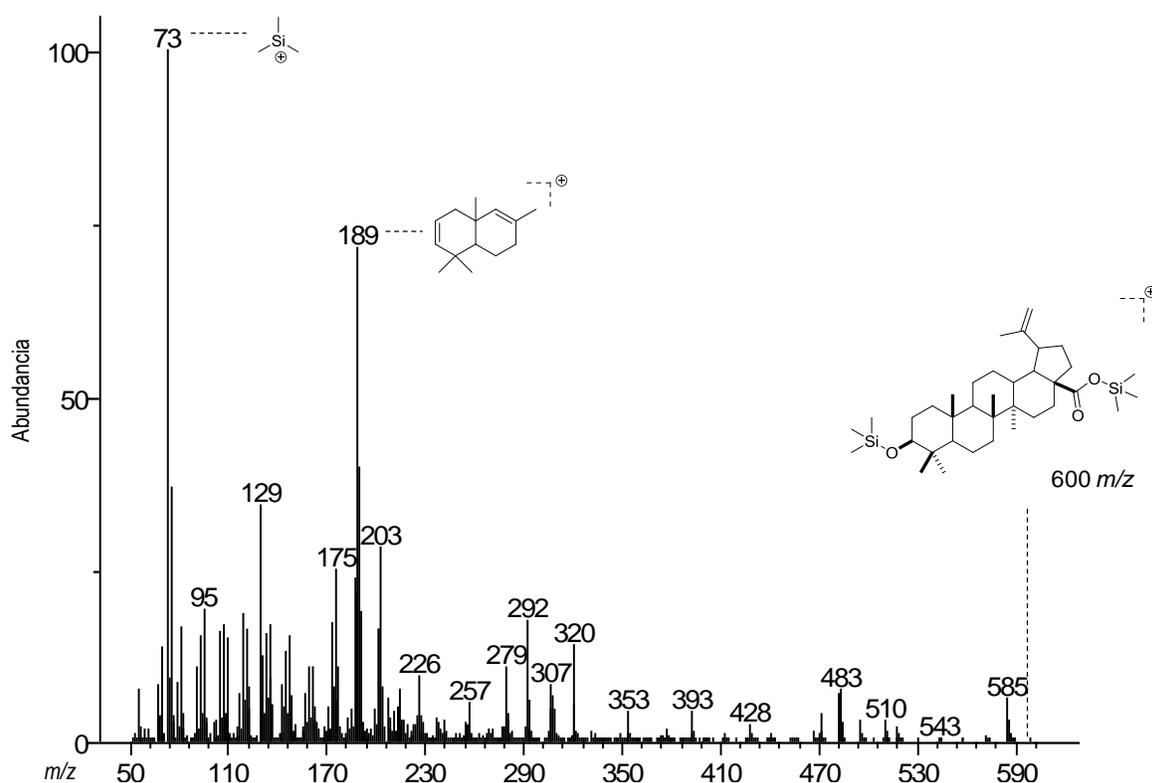


Figura 2.13 Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto II.

En el espectro de RMN- ^1H se observaron señales características de un triterpeno de esqueleto de tipo lupano (Figura 2.14), lo cual concuerda con lo observado en el espectro de masas.

Las señales observadas fueron: dos señales simples a δ 4.96 y 4.78 características de protones olefínicos; en la región de protones geminales a hidroxilos se observó una señal triple a δ 3.47 ($J = 7.8$ Hz), adicionalmente se observó una señal doble de doble de dobles a δ 3.55 ($J = 11.4, 11.4, 6.0$ Hz) correspondiente al H-19, y en la región de metilos se observaron seis señales simples a δ 1.81, 1.24, 1.09, 1.08, 1.02 y 0.84, cada una con una integral de tres.

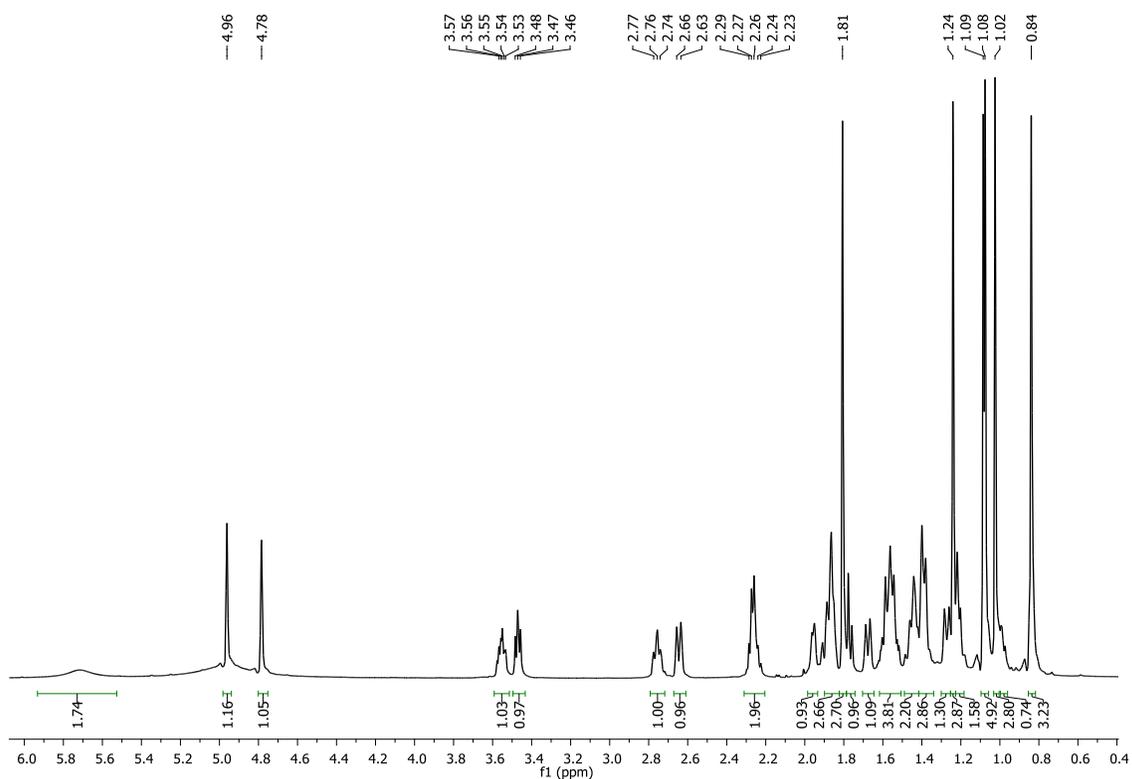


Figura 2.14 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **II** en piridina- d_5 a 600 MHz.

Por otra parte, en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.15) se observó un total de 30 carbonos, de los cuales, la señal a δ 179.2 es característica de un carbono de ácido carboxílico, y las dos señales a δ 151.7 y 110.3 son características de carbonos olefínicos. Estas señales concuerdan con lo observado en el espectro de IR y en el espectro de EM, indicando que el compuesto **II** corresponde al ácido betulínico (Figura 2.15).

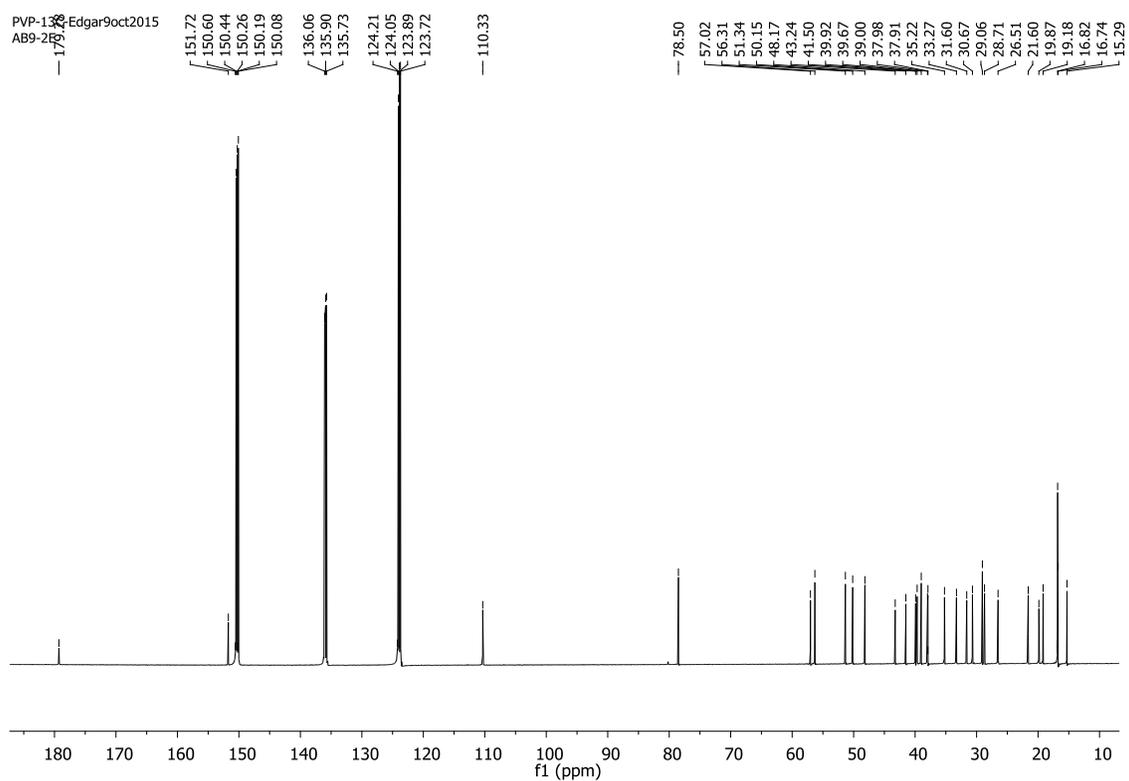


Figura 2.15 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto II en piridina- d_5 a 150 MHz.

Estas señales fueron comparadas con la de espectros publicados en la literatura (Peng *et al*, 1998), observándose que se trataba del ácido betulínico (Figura 2.16, Cuadro 2.2).

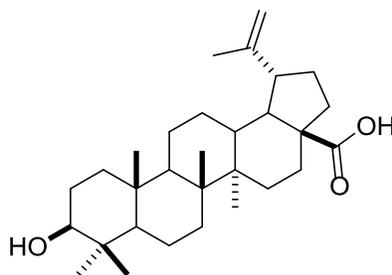


Figura 2.16 Estructura del compuesto II (ácido betulínico) (Peng *et al*, 1998).

Cuadro 2.2. Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) determinados en piridina-*d*₅ del **compuesto II** con el ácido betulínico.

Posición	Ácido betulínico		Compuesto II	
	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
3	3.46 (t, <i>J</i> = 8 Hz)	78.9	3.47 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz)	78.5
19 β	3.55 (m)	49.2	3.55 (ddd, <i>J</i> = 11.4, 11.4, 6.0 Hz)	48.2
23	1.23 (s)	27.9	1.24 (s)	26.5
24	1.08 (s)	15.3	1.09 (s)	15.3
25	1.02 (s)	16.0	1.02 (s)	16.7
26	1.07 (s)	16.1	1.08 (s)	16.8
27	0.83 (s)	14.7	0.84 (s)	15.3
28	---	180.5	---	179.2
29	4.95 (d, <i>J</i> = 2 Hz), 4.78 (s)	109.6	4.96 (s), 4.78 (s)	110.3
30	1.80 (s)	19.4	1.81 (s)	19.8

El ácido betulínico fue aislado por primera vez de *Betula alba* en 1788. Este metabolito se encuentra en la corteza de varias especies de plantas, principalmente en *Betula* spp. (Fulda, 2008).

Ácido 3-*epi*-betulínico (III)

El compuesto **III** fue aislado como un sólido blanco en forma de agujas, solubles en acetona; de este compuesto se obtuvieron 198.2 mg.

En el espectro de IR (Figura 2.17) se observó una señal ancha a 3444 cm⁻¹ correspondiente a grupos oxhidrilos, así como también una señal aguda a 1694 cm⁻¹, indicando la presencia de grupo carbonilo de ácido carboxílico.

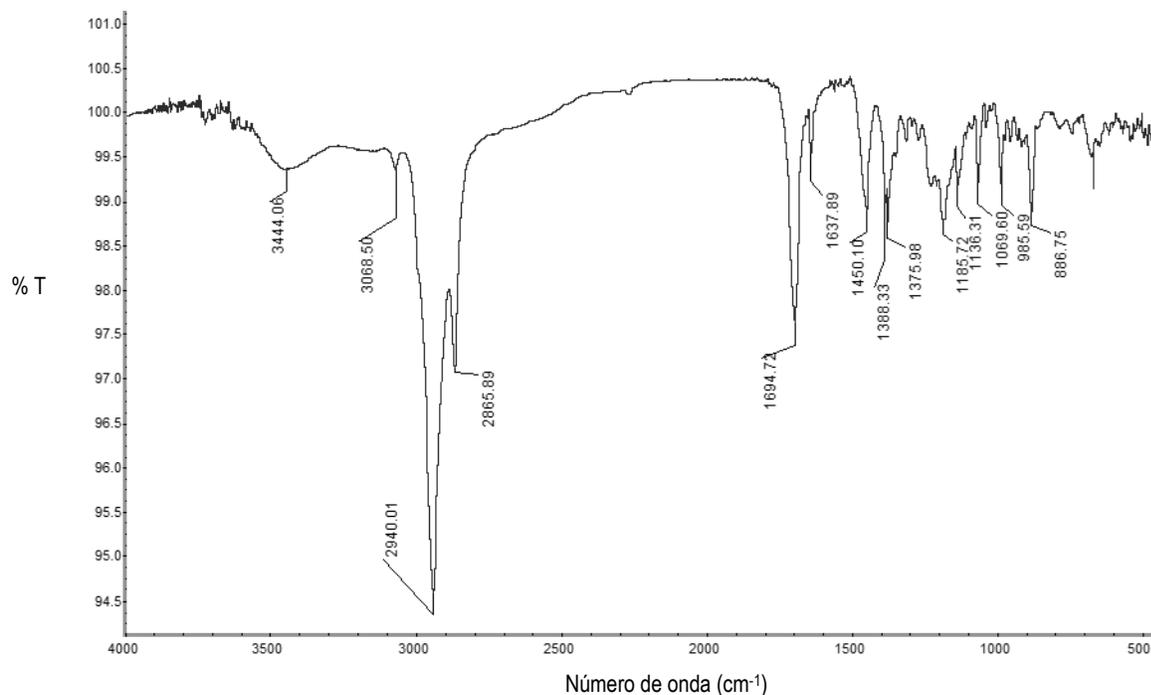


Figura 2.17 Espectro de IR (película) del compuesto **III**.

El compuesto **III** fue modificado químicamente por medio de una sililación para inyectarse en el CG-EM; en el cromatograma se observó su presencia a un t_R de 20.7 min (Figura 2.18). Por otro lado, en el espectro de masas (Figura 2.19) se observó un patrón de señales similares a las observadas para el compuesto **II** derivatizado, siendo éstas un ion molecular de 600 m/z , un pico a 189 m/z con intensidad similar para el ácido betulínico sililado y un pico base de 73 m/z correspondiente al fragmento del grupo trimetilsilil; debido a la similitud entre las señales e intensidades de los espectros, se propone que el compuesto **III** sea un isómero del ácido betulínico.

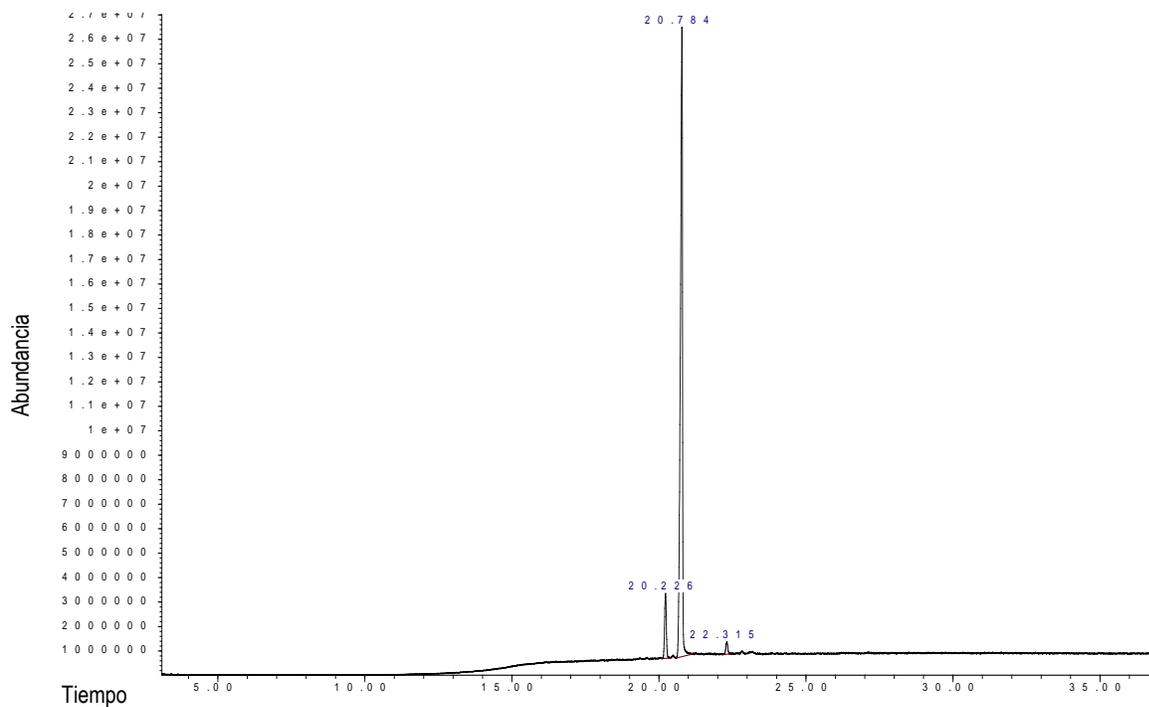


Figura 2.18 Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto III.

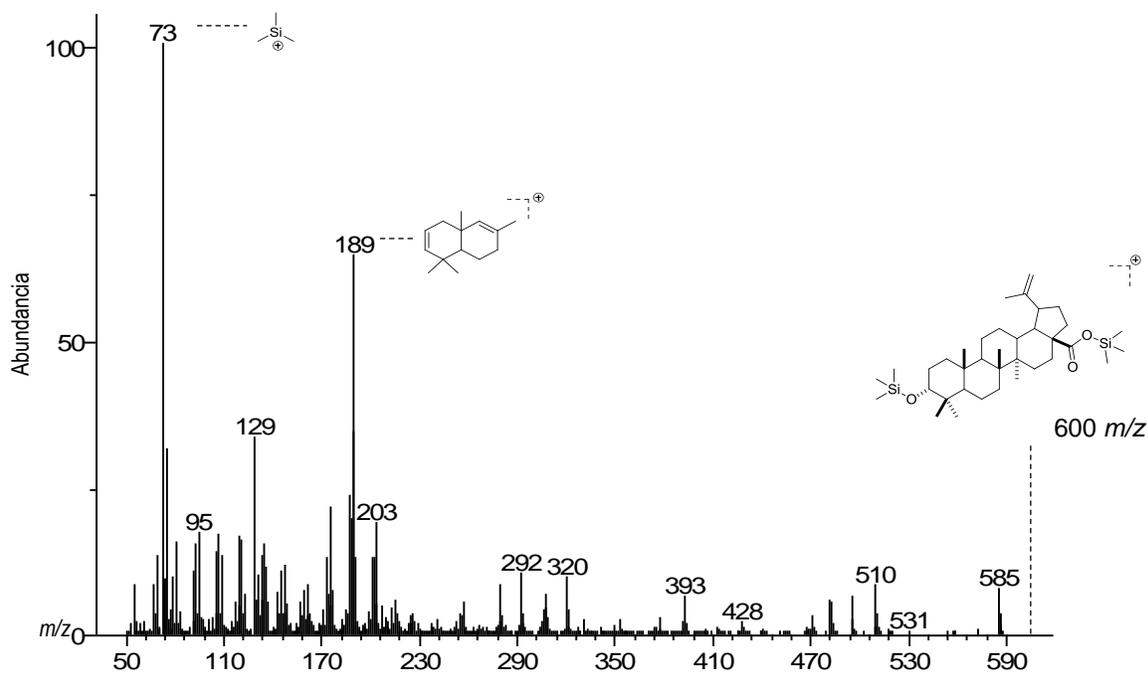


Figura 2.19 Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto III.

En el espectro de RMN-¹H (Figura 2.20) se observaron seis señales simples (δ 0.80, 0.86, 0.91, 0.95, 1.03 y 1.69), correspondientes a un número igual de metilos angulares, cada una integrando para tres protones. Asimismo, se observó una señal pseudo triple a δ 3.30 ($J = 2.8$ Hz), cuyo desplazamiento químico indica la presencia de un protón de metino base de un grupo oxhidrilo, una señal doble de doble de dobles a δ 3.05 ($J = 5.2, 5.2$ y 10.8 Hz) correspondiente al H-19 de un triterpeno de esqueleto lupano; adicionalmente, se observó una señal doble a δ 4.72 (d, $J = 2.0$ Hz) y una señal simple ancha a δ 4.58, correspondientes a protones de grupos olefínicos.

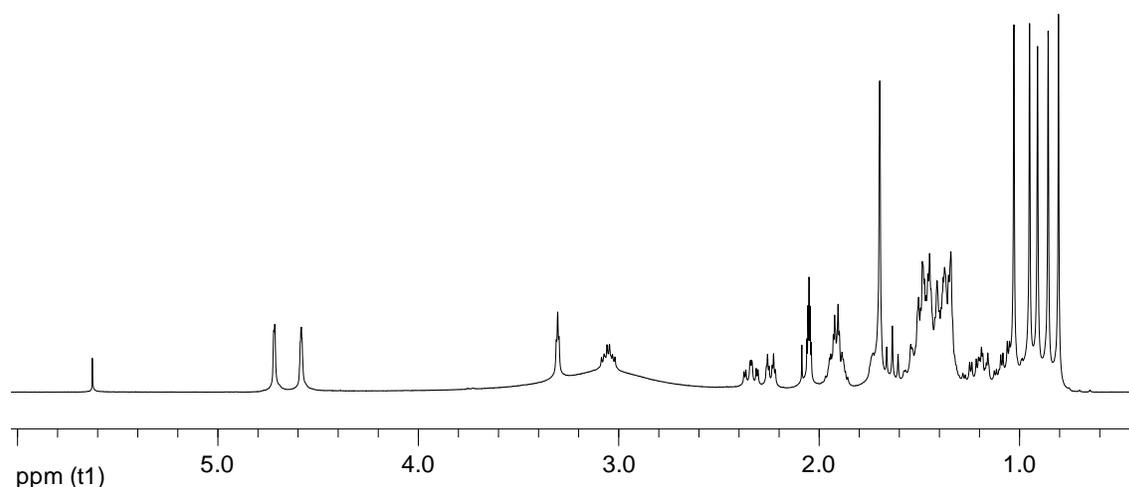


Figura 2.20 Espectro de RMN-¹H del compuesto **III** en (CD₃)₂CO a 400 MHz.

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.21) se observó un total de 30 señales, de las cuales sobresalen una señal a δ 176.6, característica de un carbono de ácido carboxílico, y dos señales a δ 150.6 y 109.0, las cuales son características de carbonos olefínicos.

Como se puede observar, las señales presentadas tanto en el espectro de RMN-¹H y ¹³C son similares para el ácido betulínico (compuesto **II**), a excepción de la señal a δ 3.30 (t, $J = 2.8$ Hz), lo cual indica que el compuesto **III** corresponde a un epímero del ácido betulínico en posición tres, es decir, el ácido 3-*epi*-betulínico (Figura 2.22); esto datos fueron comparados (Cuadro 2.3) con lo reportado en la literatura (Wang *et al.*, 2014).

El ácido 3-*epi*-betulínico fue aislado por primera vez de *Canthium dicoccum* en 1972 (Herz, 1972).

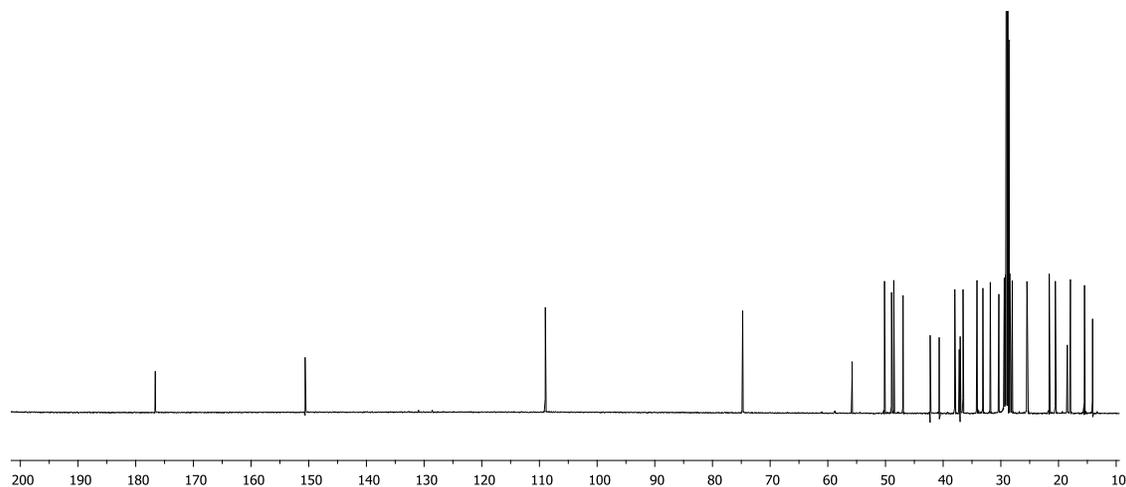


Figura 2.21 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto III en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ a 150 MHz.

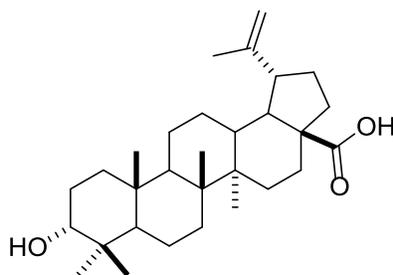


Figura 2.22 Estructura del compuesto III (ácido 3-*epi*-betulínico) (Herz, 1972).

Cuadro 2.3 Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) del compuesto **III** con el ácido 3-*epi*-betulínico.

Posición	Ácido 3- <i>epi</i> -betulínico		Compuesto III ^c	
	δ ¹ H ^a (m)	δ ¹³ C ^b	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
3	3.39 (s)	76.1	3.30 (pt, <i>J</i> = 2.8 Hz)	75.7
19β	3.02-2.96 (m)	49.4	3.05 (ddd, <i>J</i> = 10.8, 5.2, 5.2 Hz)	47.9
23	1.00 (s)	27.2	1.03 (s)	26.4
24	0.94 (s)	14.7	0.95 (s)	15.0
25	0.87 (s)	18.4	0.86 (s)	16.4
26	0.91 (s)	16.1	0.91 (s)	16.5
27	0.84 (s)	14.6	0.80 (s)	15.0
28	---	179.3	---	177.5
29	4.73 (s), 4.60 (s)	109.5	4.72 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz), 4.58 (s)	109.9
30	1.68 (s)	19.3	1.69 (s)	19.4

^a determinado en CDCl₃

^b determinado en CDCl₃ + CD₃OD

^c determinado en (CD₃)₂CO

Ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (**IV**)

El compuesto **IV** se obtuvo como un sólido en forma de agujas (11.0 mg) de color blanco soluble en CH₂Cl₂. En su espectro de RMN-¹H (Figura 2.23) se observaron señales similares a las observadas en los espectros de RMN-¹H para los compuestos anteriores, indicando la presencia de un triterpeno de esqueleto lupano, con cinco señales cada una generada por tres protones, debido a su integral, características de grupos metilo (δ 1.69 – 0.68), una señal múltiple a δ 3.00 característica del H-19, dos señales dobles a δ 3.52 (*J* = 11.4 Hz) y 3.39 (*J* = 11.4 Hz), características de un grupo hidroximetileno; de igual manera, se observó una señal pseudo triple con δ 3.67 (*J* = 2.4 Hz) correspondiente al H-3, así como también dos señales simples anchas a δ 4.74 y 4.61 característica de los protones en H-29.

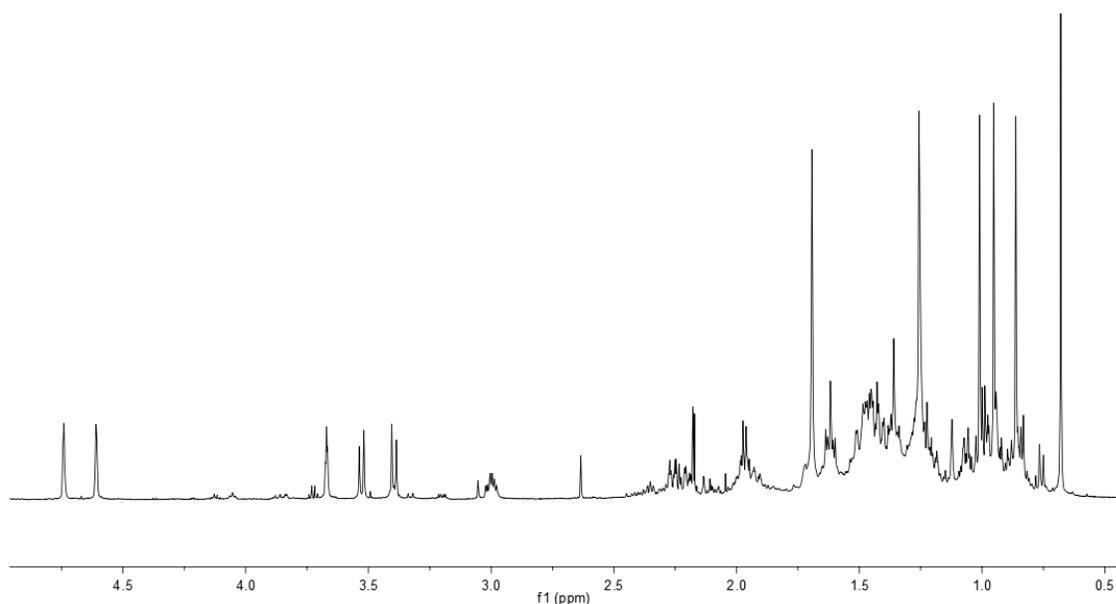


Figura 2.23 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **IV** en CDCl_3 a 600 MHz.

En el espectro de RMN- ^{13}C , se observó un total de 30 señales, de las cuales las más características son: una señal a δ 180.0 correspondiente a un grupo carbonilo, dos señales correspondientes a los C-20 y C-29 a δ 150.4 y 109.7, respectivamente; y dos señales a δ 76.6 y 71.4 indicando la presencia de dos carbonos unidos a oxígeno (Figura 2.24).

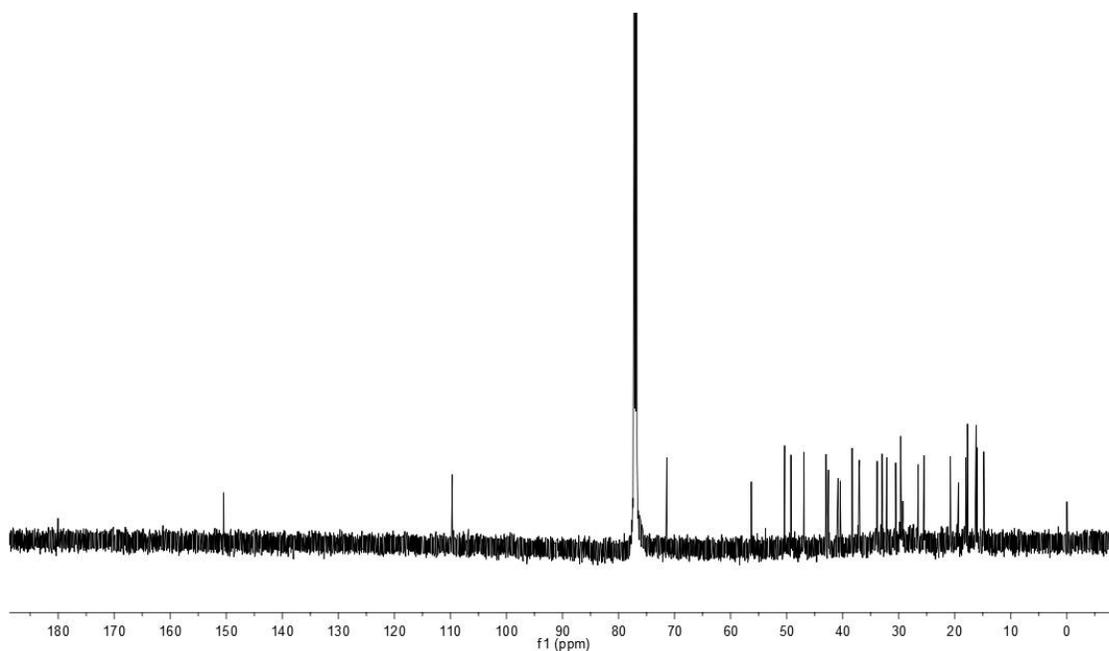


Figura 2.24 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **IV** con CDCl_3 a 150 MHz.

Para determinar la posición del grupo hidroximetileno se recurrió al experimento NOESY (Figura 2.25), en donde se observó la interacción entre el H-3 con el CH_3 -24 (δ 0.68); y el CH_3 -24 con la señal del grupo hidroximetileno H-23 (δ 3.86, 3.66) y con el CH_3 -25 (δ 0.86).

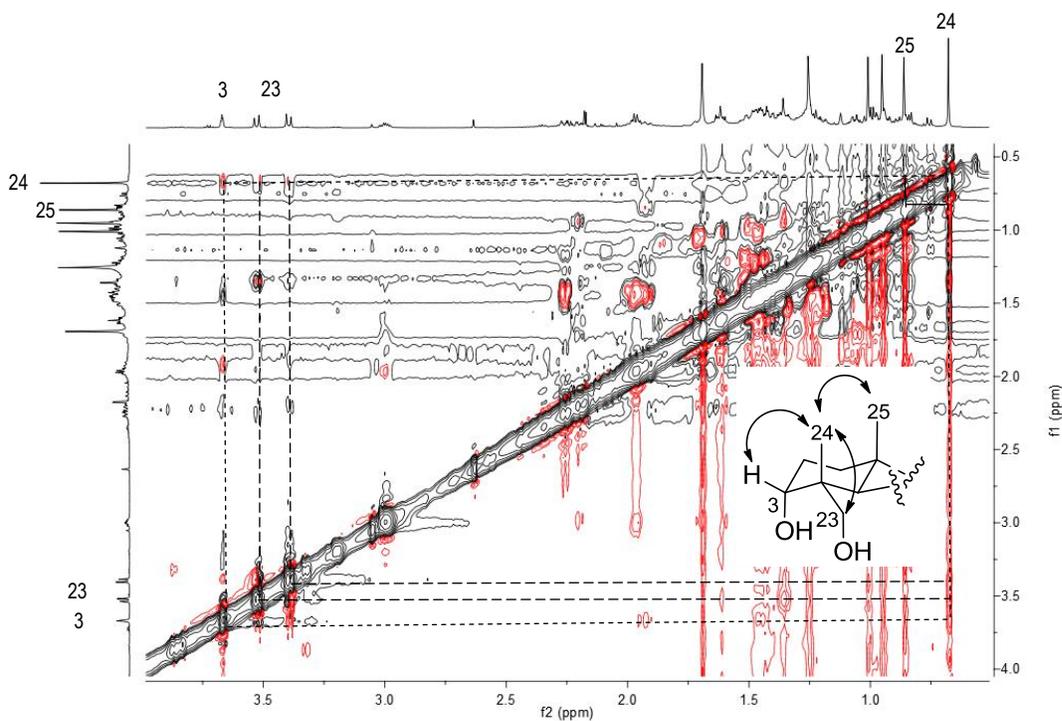


Figura 2.25 Experimento NOESY del compuesto **IV** con CDCl_3 .

Estas señales indicaron la identidad del compuesto **IV** como ácido $3\alpha,23$ -dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (Figura 2.26), el cual ya se encuentra reportado en la literatura (Yook *et al*, 2002) (Cuadro 2.4).

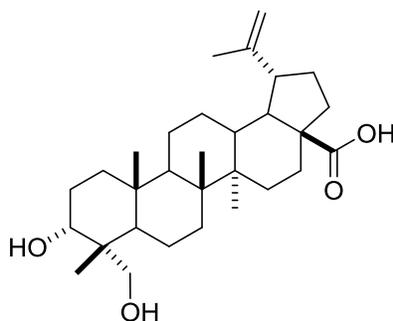


Figura 2.26 Estructura del compuesto **IV** (ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico) (Yook *et al*, 2002).

Cuadro 2.4 Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) del compuesto **IV** con el ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico.

Posición	Ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico ^a		Compuesto IV ^b	
	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
3	3.92 (s)	75.8	3.67 (pt, $J = 2.4$ Hz)	76.6
19 β	3.39 (m)	47.5	3.00 (m)	46.9
23	3.86 (d, $J = 11.2$ Hz), 3.66 (d, $J = 11.2$ Hz)	71.4	3.53 (d, $J = 11.4$ Hz), 3.40 (d, $J = 11.4$ Hz)	71.4
24	0.79 (s)	18.0	0.68 (s)	18.0
25	1.19 (s)	16.7	0.86 (s)	16.2
26	0.86 (s)	16.5	0.95 (s)	16.2
27	0.95 (s)	14.9	1.01 (s)	14.8
28	---	179.3	---	180.0
29	4.85 (sa), 4.73 (sa)	110.0	4.74 (sa), 4.61 (sa)	109.7
30	1.65 (s)	19.4	1.69 (s)	19.4

^a determinado en Py-*d*₅

^b determinado en CDCl₃

Betulona (V)

El compuesto **V** fue aislado como sólido blanco soluble en CHCl₃, obteniéndose de éste 8 mg. Este compuesto fue analizado por espectroscopía de IR en el cual se observaron señales similares a las de los compuestos anteriores, tales como una señal ancha a 3500 cm⁻¹ característica del estiramiento O-H de grupos oxhidrilos, a 1702 cm⁻¹ una señal correspondiente al estiramiento C=O de cetona (Figura 2.27).

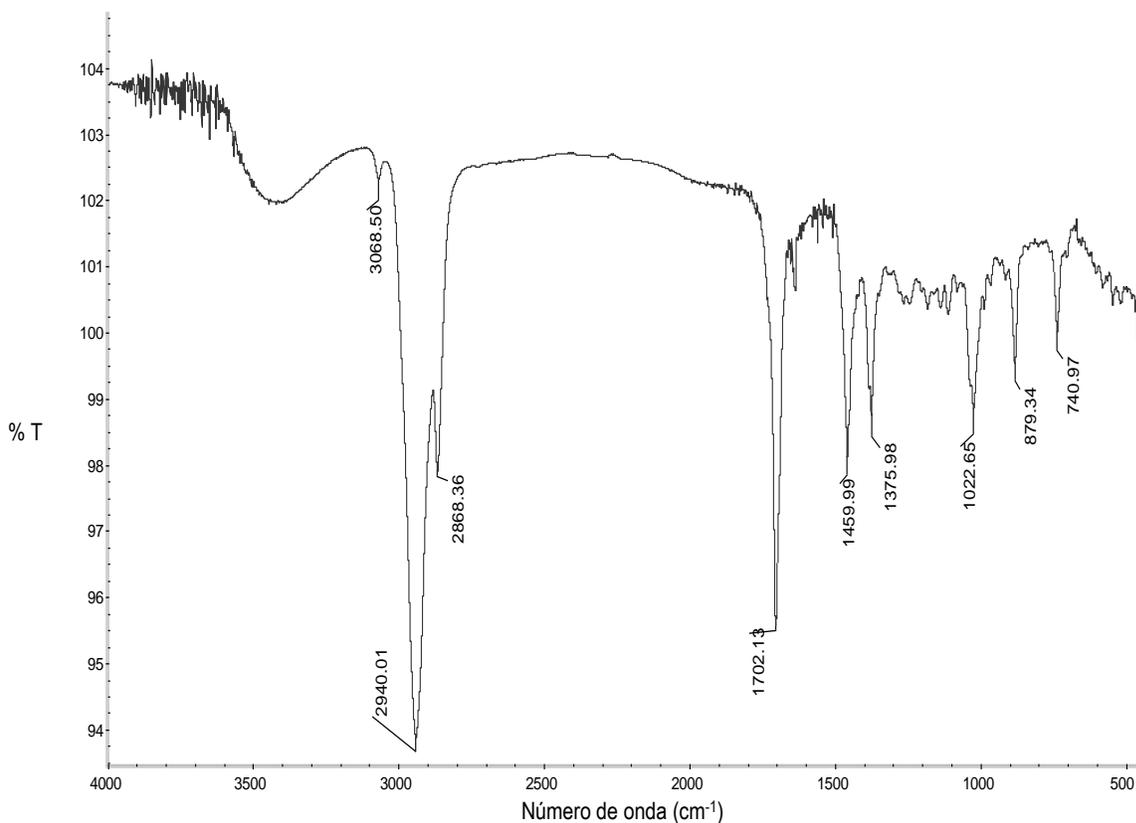


Figura 2.27 Espectro de IR (película) del compuesto **V**.

En el espectro de RMN-¹H (Figura 2.28) se puede observar la presencia de seis señales simples en la región de grupos metilos, cada una integrando para tres protones (δ 1.68, 1.07, 1.06, 1.02, 0.99 y 0.92); a δ 2.50 se observó una señal múltiple correspondiente a un metileno α a carbonilo; en la región de protones de metinos base de grupos oxhidrilo se observaron dos señales dobles de un sistema AX a δ 3.79 y 3.33 ($J = 10.8$ Hz); y a δ 4.68 una señal doble ($J = 1.6$ Hz) y una señal simple a δ 4.58 correspondientes a los protones olefínicos característicos de los triterpenos de esqueleto lupano.

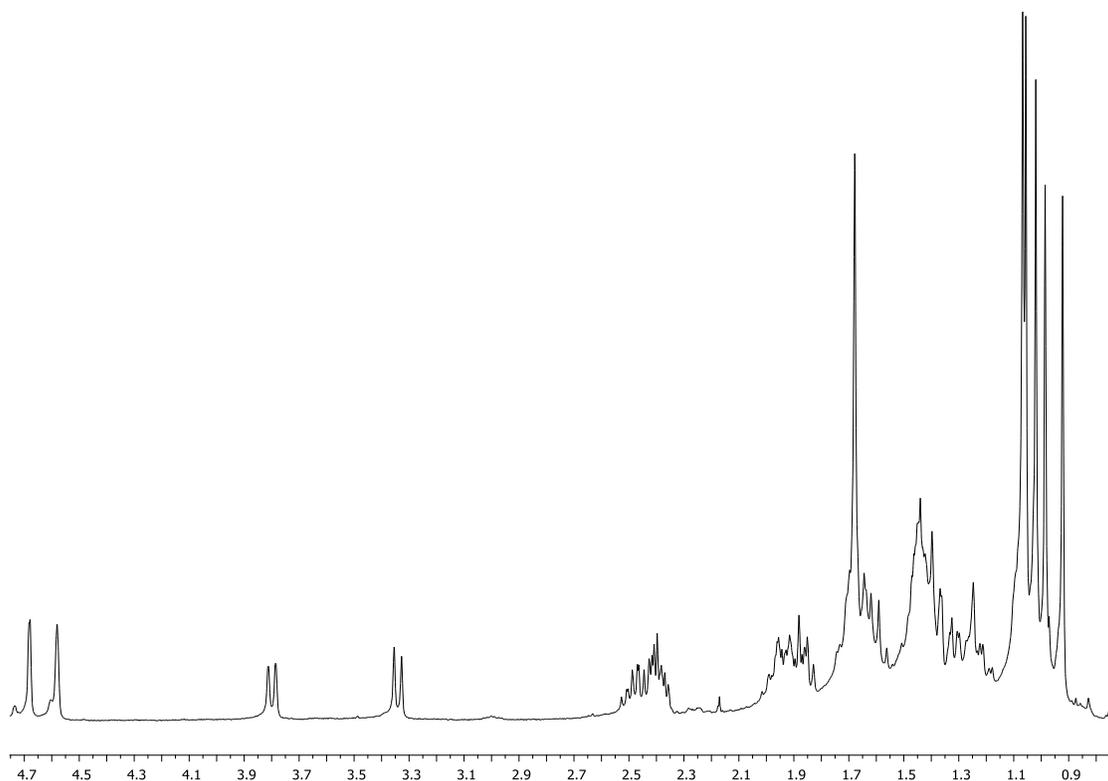


Figura 2.28 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **V** a 600 MHz en CDCl_3 .

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.29) se observó un total de 30 señales, de las cuales una señal a δ 218.2 indica la presencia de cetona, lo cual confirma lo observado en el espectro de IR, así como dos señales características de carbonos sp^2 a δ 150.6 y 109.9 correspondiente a los C-20 y C-29 de un triterpeno de esqueleto lupano.

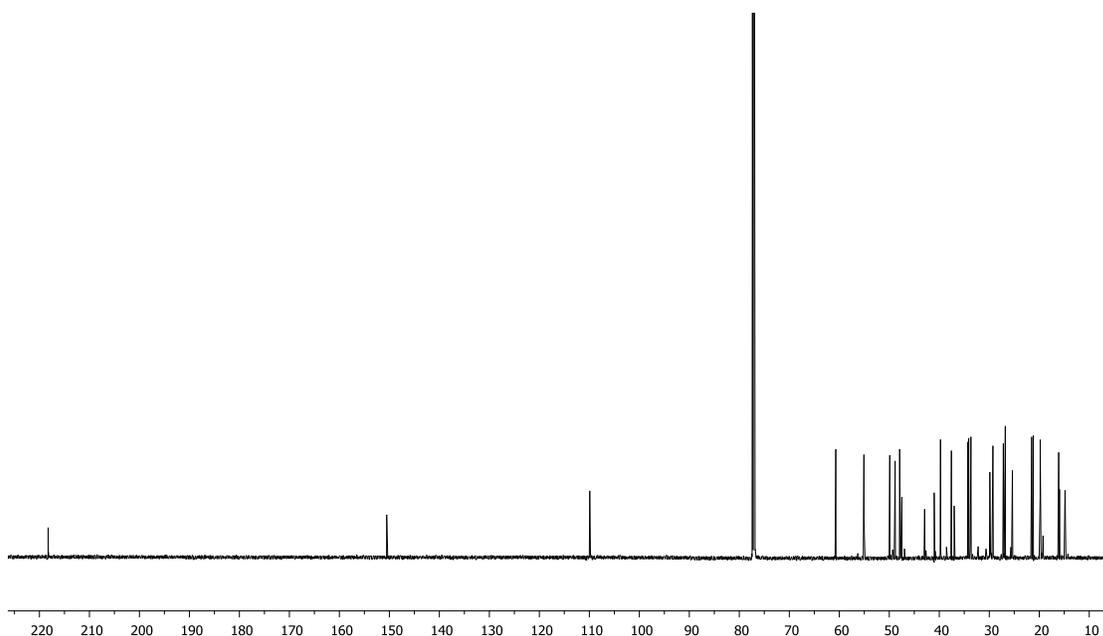


Figura 2.29 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **V** a 150 MHz en CDCl_3 .

Con base en las señales observadas en el espectro de RMN- ^1H y ^{13}C y con lo comparado en la literatura (Satiraphan *et al.*, 2012) (Cuadro 2.5) se identificó al compuesto **V** como betulona (Figura 2.30).

Cuadro 2.5 Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN- ^1H (600 MHz) determinados en CDCl_3 del compuesto **V** con la betulona.

Posición	Betulona		Compuesto V	
	δ ^1H (m)	δ ^{13}C	δ ^1H (m)	δ ^{13}C
3	---	218.3	---	218.2
23	1.08 (s)	26.6	1.07 (s)	25.4
24	1.03 (s)	21.1	1.02 (s)	21.2
25	0.93 (s)	15.8	0.92 (s)	15.9
26	1.07 (s)	16.0	1.06 (s)	16.1
27	1.00 (s)	14.7	0.99 (s)	14.8
28	3.81 (d), 3.36 (d)	60.5	3.79 (s), 3.33 (d, $J = 10.8$ Hz)	60.7
29	4.69 (s), 4.59 (s)	109.8	4.68 (d, $J = 1.6$ Hz), 4.58 (s)	109.9
30	1.70 (s)	19.1	1.68 (s)	19.2

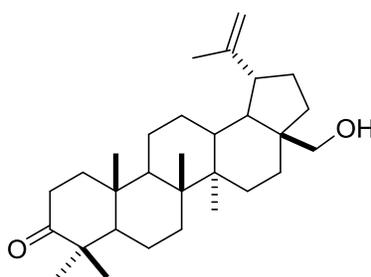


Figura 2.30 Estructura del compuesto V (betulona) (Satiraphan *et al.*, 2012).

Ácido betulónico (VI)

El compuesto VI fue aislado como un sólido blanco, soluble en CHCl_3 (10 mg). En el espectro de IR (Figura 2.31) se observó una señal intensa a 1697 cm^{-1} , la cual es característica de grupo cetona.

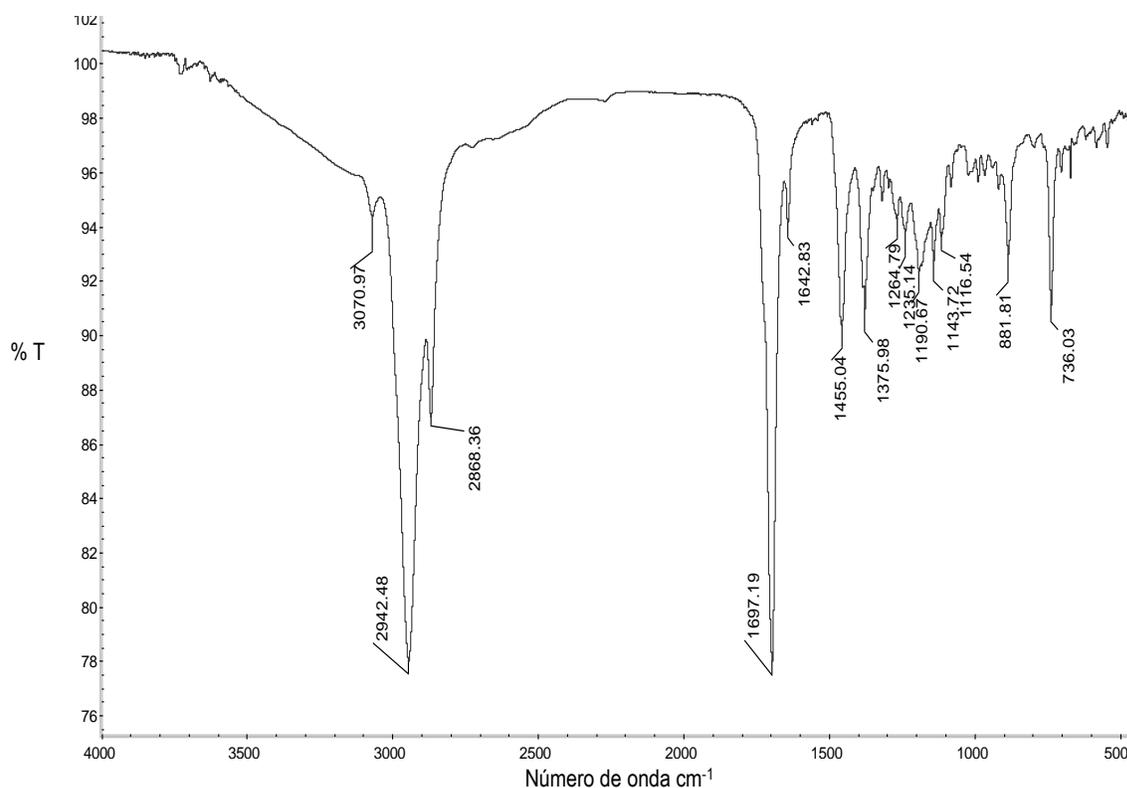


Figura 2.31 Espectro de IR (película) del compuesto VI.

El espectro de RMN^{-1}H (Figura 2.32) mostró las siguientes señales: en la región de metilos se observaron seis señales simples, cada una integrando para tres protones a δ

1.68, 1.06, 1.01, 0.98, 0.96 y 0.92; de igual manera a δ 2.44 se observó una señal múltiple correspondiente a protones α a carbonilo; a δ 3.01 ($J = 10.8, 4.4$ Hz) se observó una señal triple de dobles correspondiente al H-19; por último, se ven dos señales simples a δ 4.73 y 4.60 correspondientes a los protones olefínicos H-29 característicos de triterpenos de esqueleto lupano.

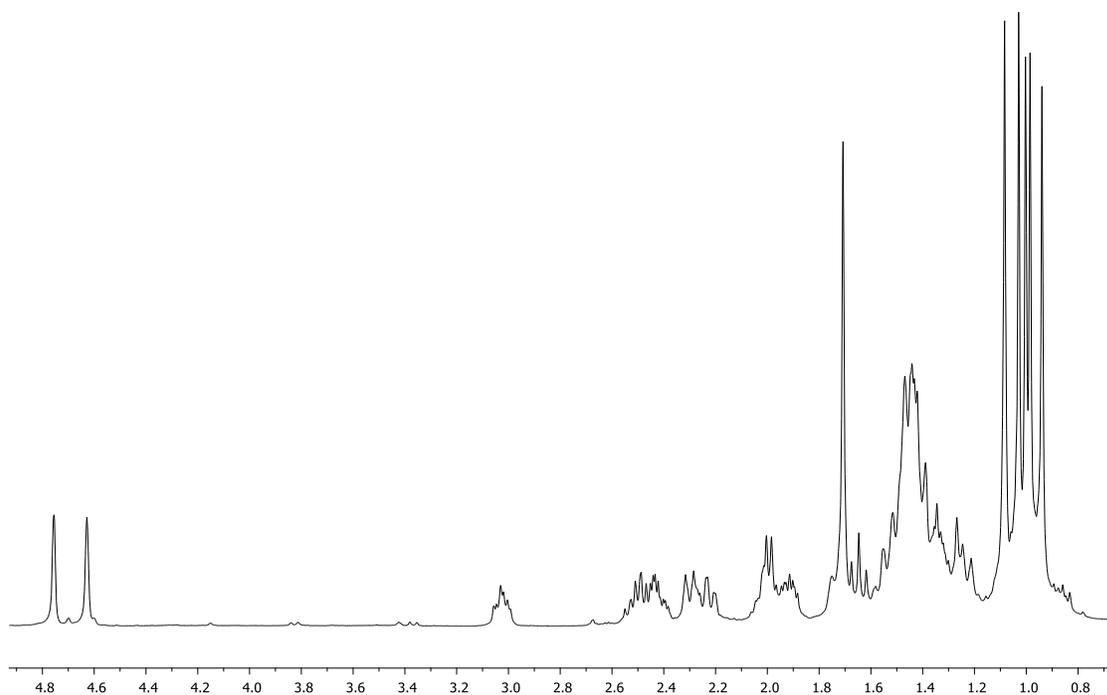


Figura 2.32 Espectro de RMN-¹H del compuesto **VI** en CDCl₃ (400 MHz).

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.33) se observó un total de 30 señales, sobresaliendo las siguientes señales: a δ 218.6 correspondiente a una señal de carbono sp^2 de cetona, a δ 181.9 una señal de carbono sp^2 de ácido carboxílico, a δ 150.5 y δ 109.9 señales correspondientes a carbonos olefínicos.

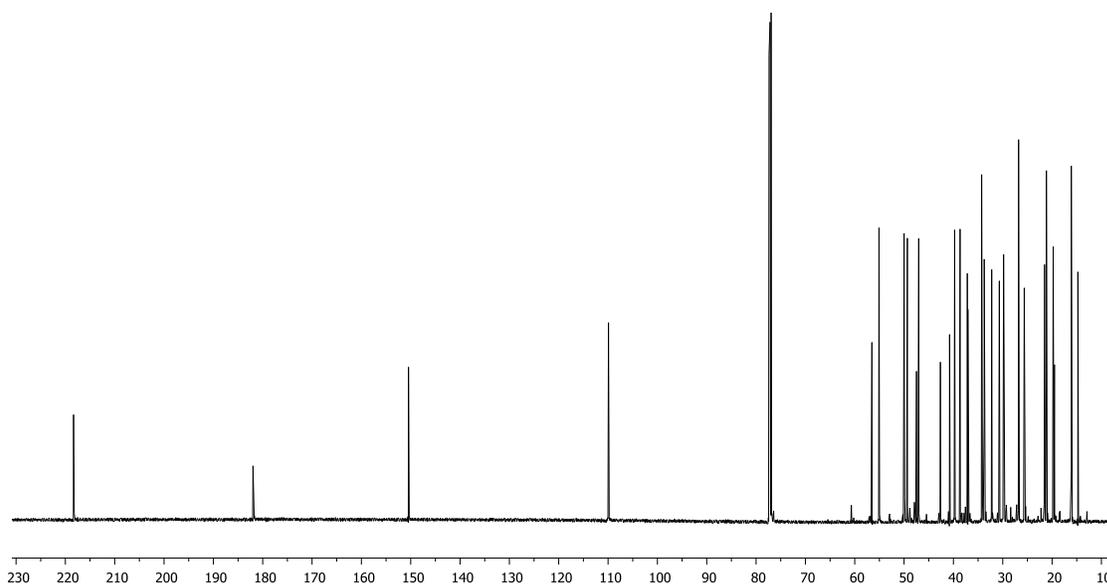


Figura 2.33 Espectro de RMN-¹³C del compuesto **VI** en CDCl₃ (150 MHz).

Con base en los datos observados y lo reportado en la literatura (Satiraphan *et al.*, 2012) (Cuadro 2.6) se identificó al compuesto **VI** como ácido betulónico (Figura 2.34).

Cuadro 2.6 Comparación de los datos espectroscópicos parciales de RMN-¹H (400 MHz) determinado en CDCl₃ del compuesto **VI** con los del ácido betulónico.

Posición	Ácido betulónico		Compuesto VI	
	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
3	---	218.2	---	218.6
19	3.02 (td, <i>J</i> = 10.7; 4.8 Hz)	46.9	3.01 (td, <i>J</i> = 10.8, 4.4 Hz)	47.0
23	1.08 (s)	26.6	1.06 (s)	26.7
24	1.03 (s)	21.0	1.01 (s)	21.1
25	0.94 (s)	16.0	0.92 (s)	16.1
26	0.99 (s)	15.8	0.96 (s)	15.9
27	1.00 (s)	14.6	0.98 (s)	14.7
28	---	180.8	---	181.9
29	4.75 (s), 4.62 (s)	109.8	4.73 (s), 4.60 (s)	109.9
30	1.70 (s)	19.4	1.68 (s)	19.5

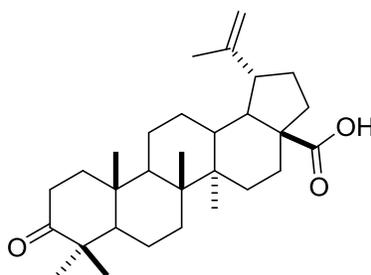


Figura 2.34 Estructura del compuesto **VI** (ácido betulónico) (Satiraphan *et al.*, 2012).

Ácido oleanólico (VII)

El compuesto **VII** (88.5 mg) se obtuvo como un sólido blanco, soluble en CHCl_3 -MeOH (1:1). Este compuesto fue comparado en ccd con estándar del ácido oleanólico en un sistema de elución de CH_2Cl_2 - $\text{CO}(\text{CH}_3)_2$ (98:2, 2x); ambos presentaron un $R_f = 0.51$, lo que apoya de que posiblemente el compuesto **VII** se trate de éste (Figura 2.35).



Figura 2.35 Placa cromatográfica del compuesto **VII** comparado con ácido oleanólico.

En el espectro de IR se observaron las siguientes señales: a 3500 cm^{-1} una señal ancha característica del estiramiento O-H de grupos oxhidrilos, a 3068 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-H de un carbono sp^2 , a 1692 cm^{-1} una señal correspondiente a estiramiento C-C de carbonos sp^2 (Figura 2.36).

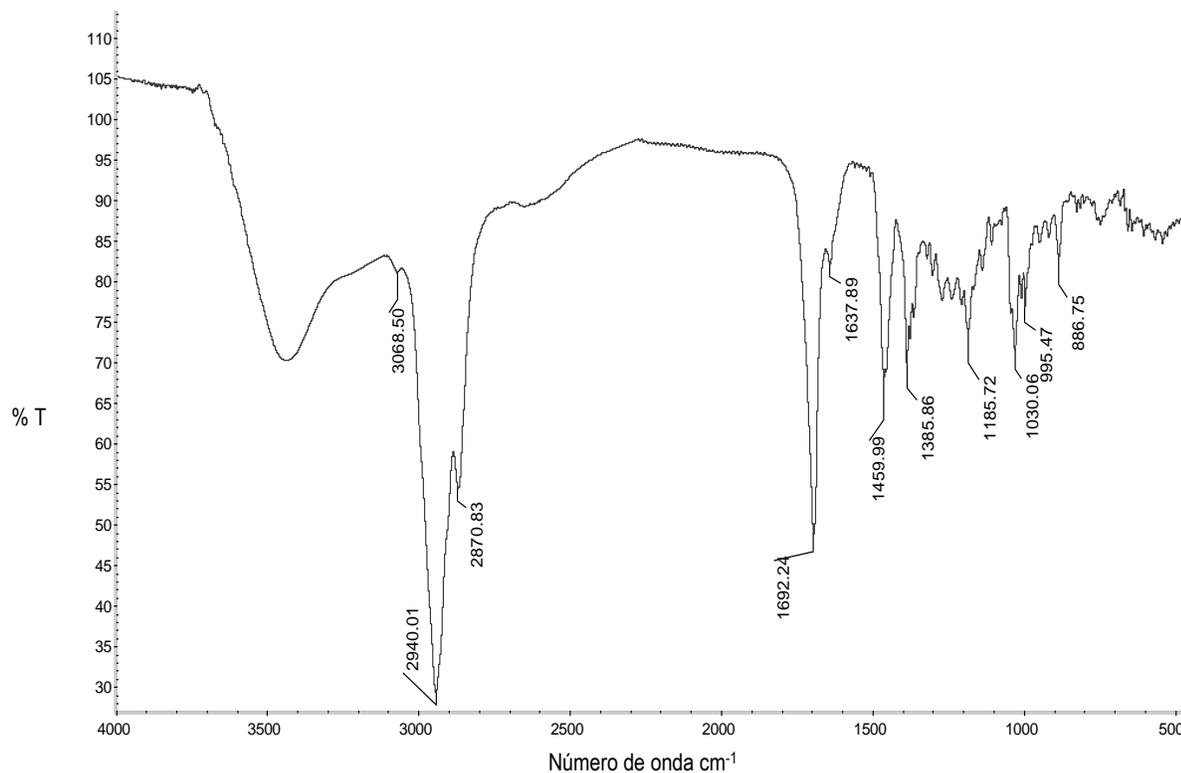


Figura 2.36 Espectro de IR (pastilla KBr) del compuesto VII.

De igual manera, este compuesto fue sometido a una siliación para poder ser detectado en el equipo CG-EM, en cuyo cromatograma se observó una señal a $t_R = 17.25$ min (Figura 2.37). Asimismo, se obtuvo en el espectro de masas (Figura 2.38) un ion molecular de $600 m/z$ correspondiente a la masa molecular del compuesto derivatizado, así como un pico base de $203 m/z$ característico de una ruptura retro Diels-Alder. Estos fragmentos fueron comparados con lo reportado en la literatura (Moldoveanu, 2014; Caligiani *et al.*, 2013; Ayatollahi *et al.*, 2011) y los espectros de masas de estándares de la biblioteca NIST del equipo, observándose un alto porcentaje de coincidencia (99%), por lo cual es posible que se trate del mismo compuesto.

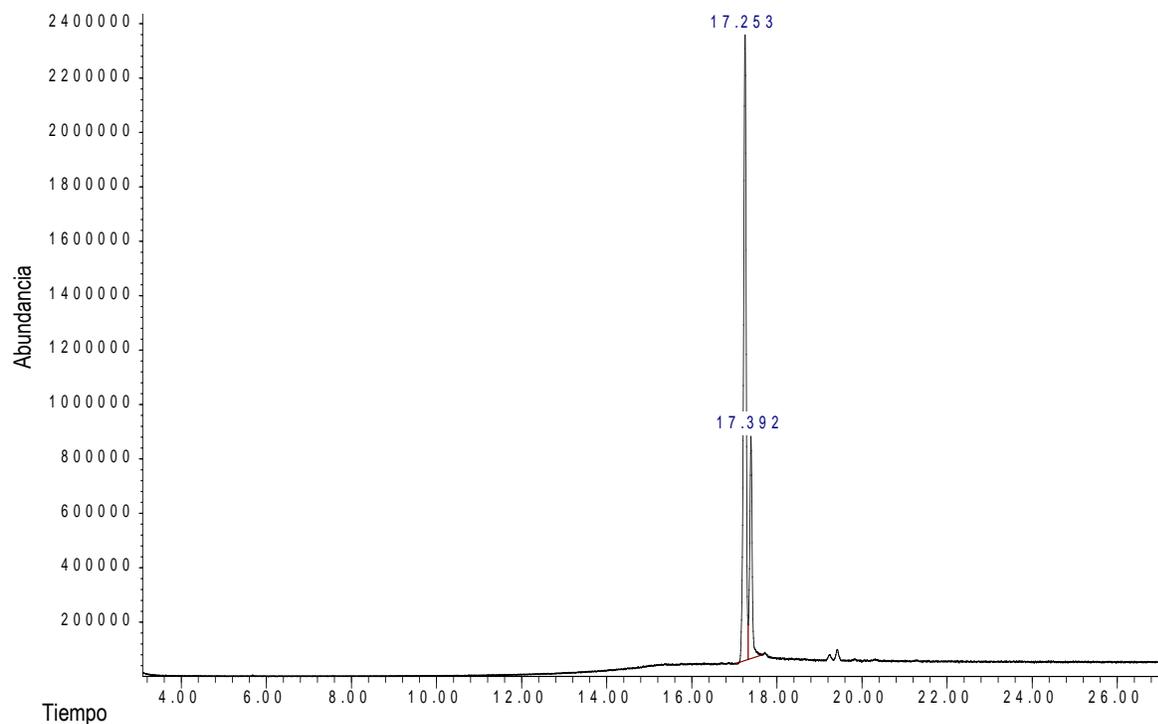


Figura 2.37 Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto VII.

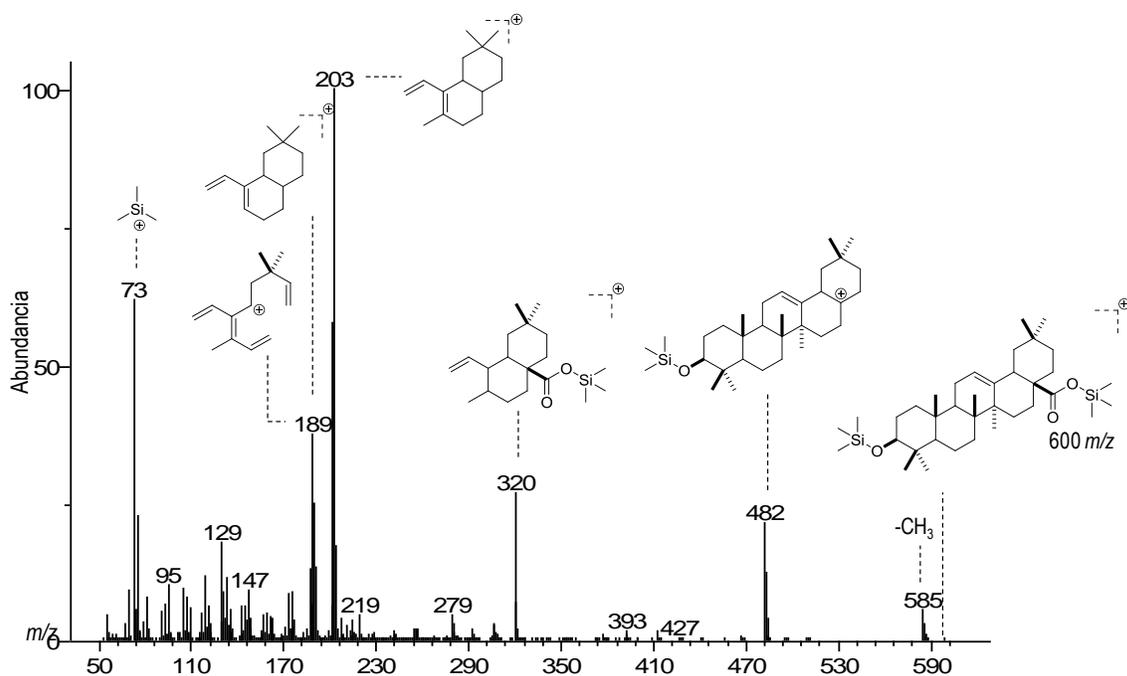


Figura 2.38 Espectro de masas obtenido por CG-EM y propuestas de fragmentos del compuesto VII.

Con base en lo anterior, el compuesto **VII** se identificó como ácido oleanólico (Figura 2.39).

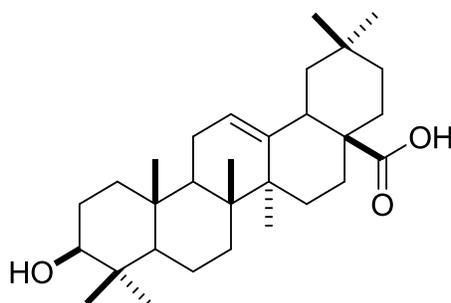


Figura 2.39 Estructura del compuesto **VII** (ácido oleanólico) (Moldoveanu, 2014).

Betulina (VIII)

El compuesto **VIII** fue obtenido como un sólido blanco. Este compuesto, al igual que el compuesto anterior (**VII**), fue comparado con estándares por medio de ccd (Figura 2.40), mostrando un $R_f = 0.70$ en un sistema de elución de Hx-AcOEt (8:2) y observándose que posiblemente corresponda a la betulina.

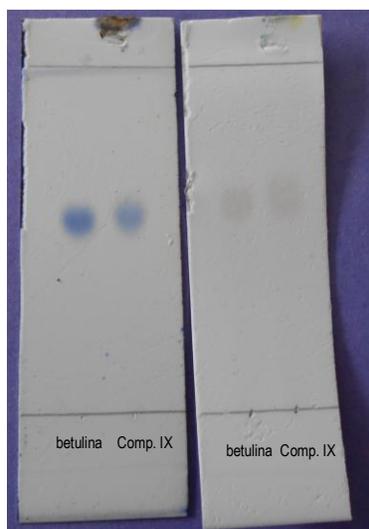


Figura 2.40 Placa cromatográfica del compuesto **VIII** comparado con betulina.

En el espectro de IR (Figura 2.41) se observó una señal fuerte ancha a 3500 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H de grupos oxhidrilos, a 3075 cm^{-1} una señal característica del estiramiento C-H de carbonos sp^2 , así como una señal a 1684 cm^{-1} de carbonos sp^2 de grupos olefínicos.

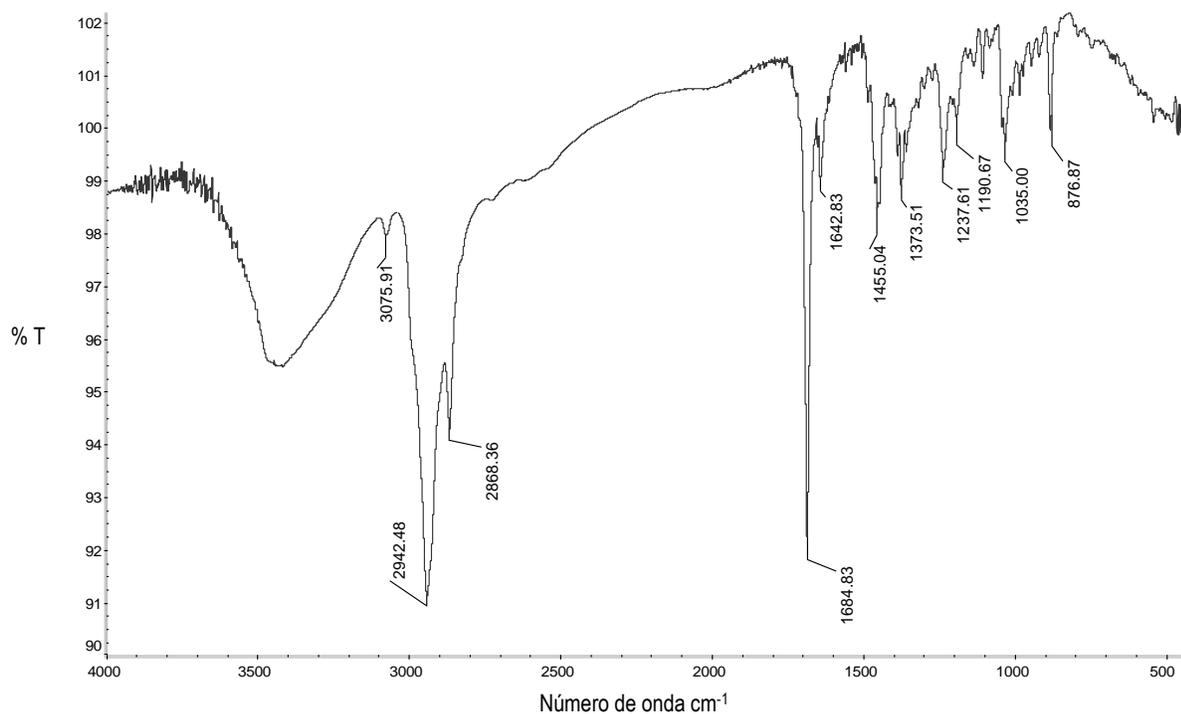


Figura 2.41 Espectro de IR (película) del compuesto VIII.

De igual manera, este compuesto fue sililado para poder ser inyectado al equipo CG-EM, en el cual se obtuvo un cromatograma que muestra un pico a $t_R = 17.28\text{ min}$ (Figura 2.42).

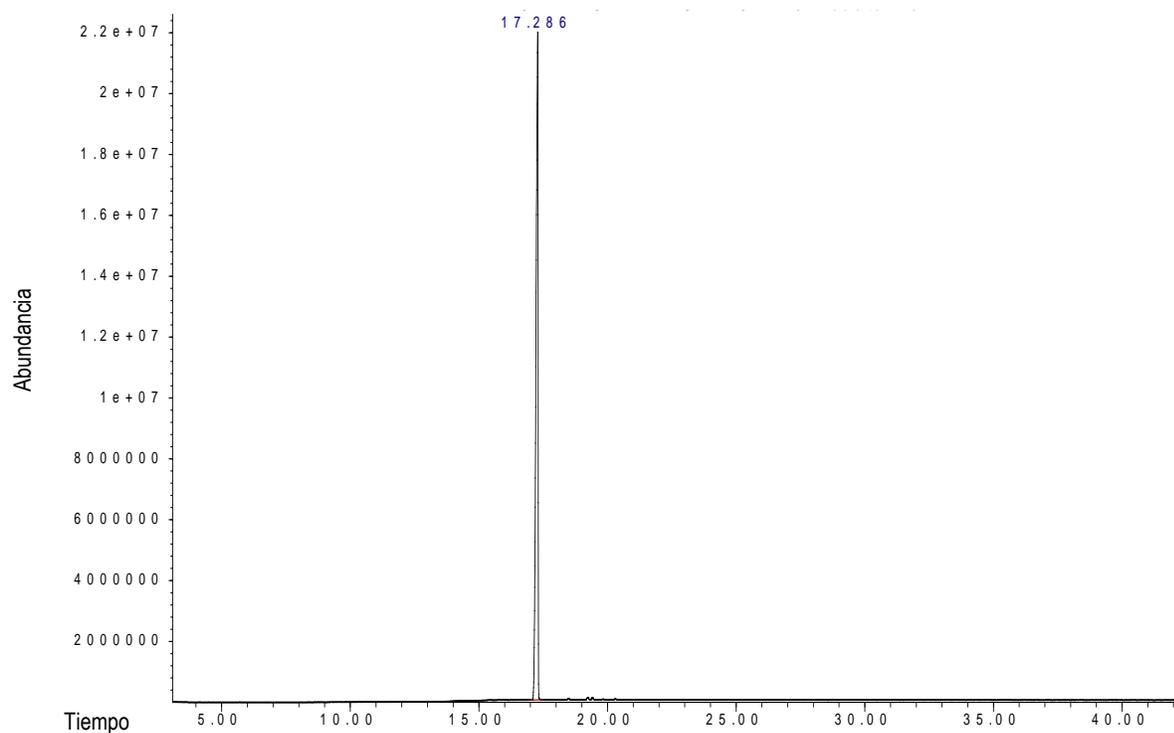


Figura 2.42 Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto **VIII**.

Por otro lado, en el espectro de masas del compuesto **VIII** (Figura 2.43) se observó un ion molecular de 586 m/z atribuible al peso molecular de la betulina sililada, así como un pico base de 73 m/z correspondiente al grupo trimetilsilil. En la Figura 2.43 se muestran propuestas de fragmentos que generan los picos del espectro de masas del compuesto **VIII** derivatizado.

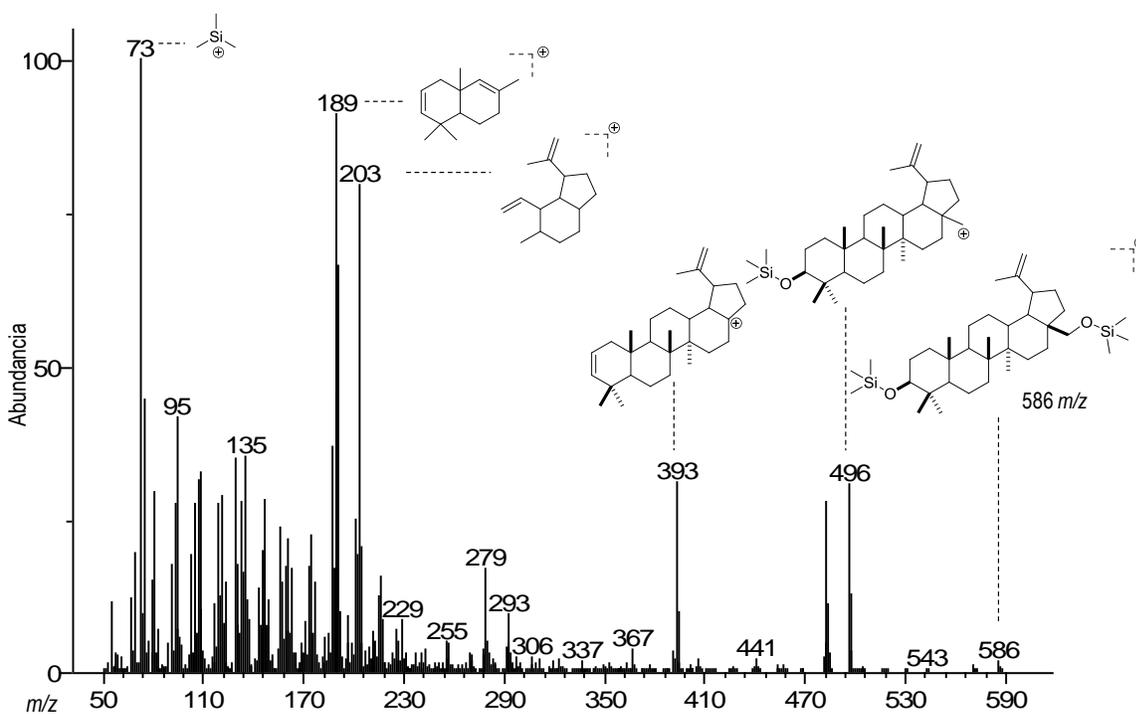


Figura 2.43 Espectro de masas y propuestas de fragmentos del compuesto VIII.

Este metabolito fue comparado con lo reportado en la biblioteca NIST del equipo CG-EM, así como con lo reportado en la literatura (Tijjani *et al.*, 2012), observándose un gran porcentaje de coincidencia (98%), por lo cual el compuesto VIII fue identificado como betulina (Figura 2.44).

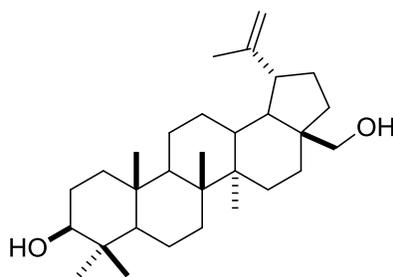


Figura 2.44 Estructura del compuesto VIII (betulina) (Tijjani *et al.*, 2012).

Ácido 3 α ,24-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (IX)

El compuesto **IX** (215.7 mg) fue obtenido como un sólido cristalino en forma de agujas de color blanco, soluble en CH₂Cl₂. Éste fue sililado e inyectado al CG-EM, en el cual se obtuvo un cromatograma con un pico a un t_R de 24.4 min (Figura 2.45); de igual manera se obtuvo su espectro de masas (Figura 2.46), en el cual se determinó un ion molecular de 688 m/z , así como un pico base de 73 m/z , correspondiente al grupo trimetilsilil.

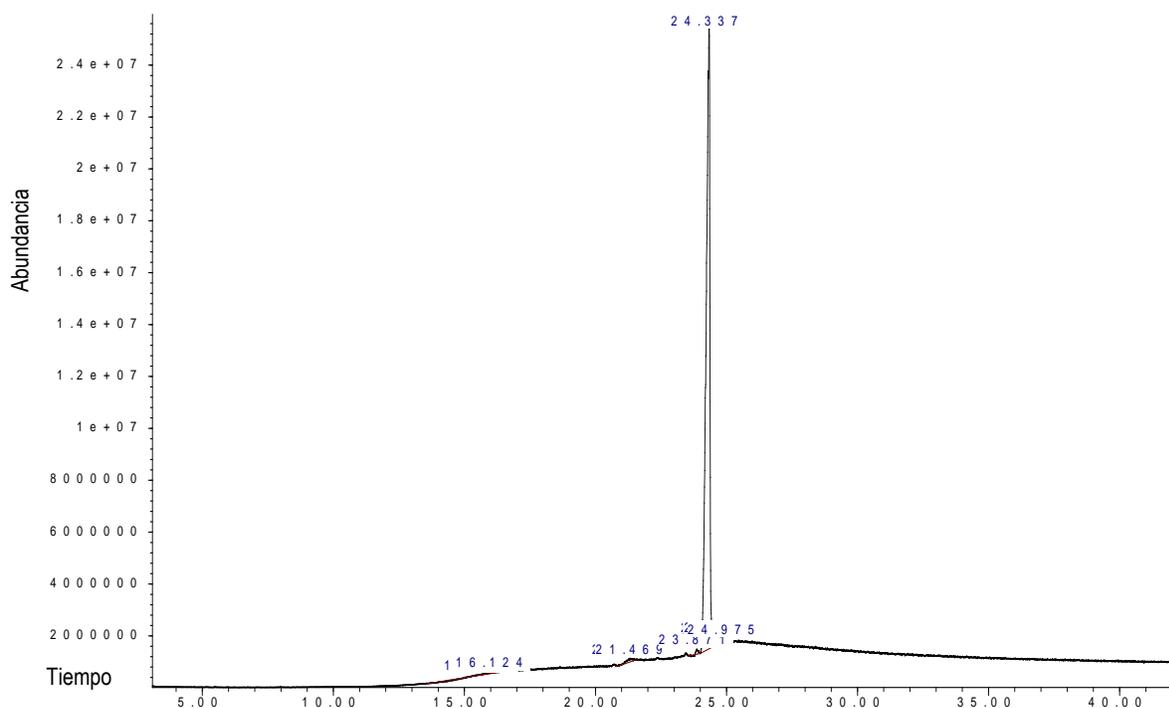


Figura 2.45 Cromatograma obtenido por CG-EM del compuesto **IX**.

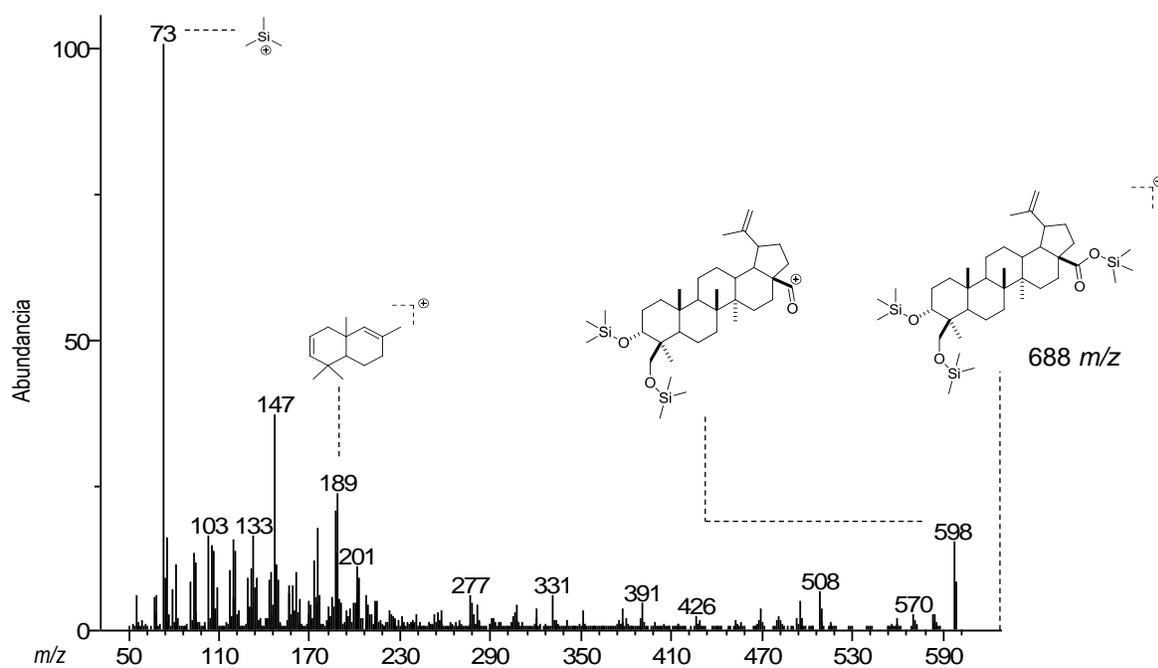


Figura 2.46 Espectro de masas y propuestas de fragmentos del compuesto IX.

Por otra parte, en el análisis por espectrometría de masas de alta resolución por bombardeo de átomos rápidos (FAB), en el espectro se observó un ion molecular de 472.3545 m/z con una fórmula molecular correspondiente a $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ (Figura 2.47).

Page 1

UNIVERSIDAD DE YUCATAN
23/10/2017 12:20:20 p.m.File: pvp-35d-2AR
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Probe

Date Run: 10-20-2017 (Time Run: 13:02:30)

Ionization mode: FAB+

Run By: UADY

Base: m/z 61; 4.3%FS TIC: 167005 (Max Inten : 44726)

R.T.: .8

#Ions: 2098

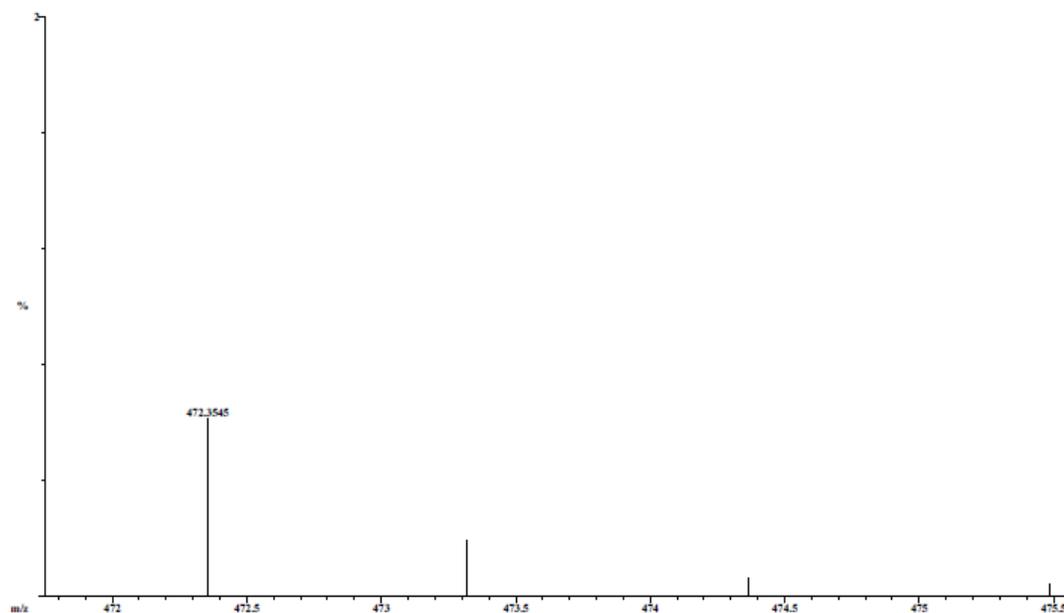


Figura 2.47 Espectro de masas de alta resolución del compuesto **IX**.

En el espectro de IR (Figura 2.48) se observaron señales similares a las observadas para los compuestos anteriores, una señal a 3500 cm^{-1} característico del estiramiento O-H, una señal a 3070 cm^{-1} atribuible al estiramiento C-H de carbonos sp^2 , a 1699 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O de un grupo ácido y una señal de carbonos olefínicos a 1635 cm^{-1} .

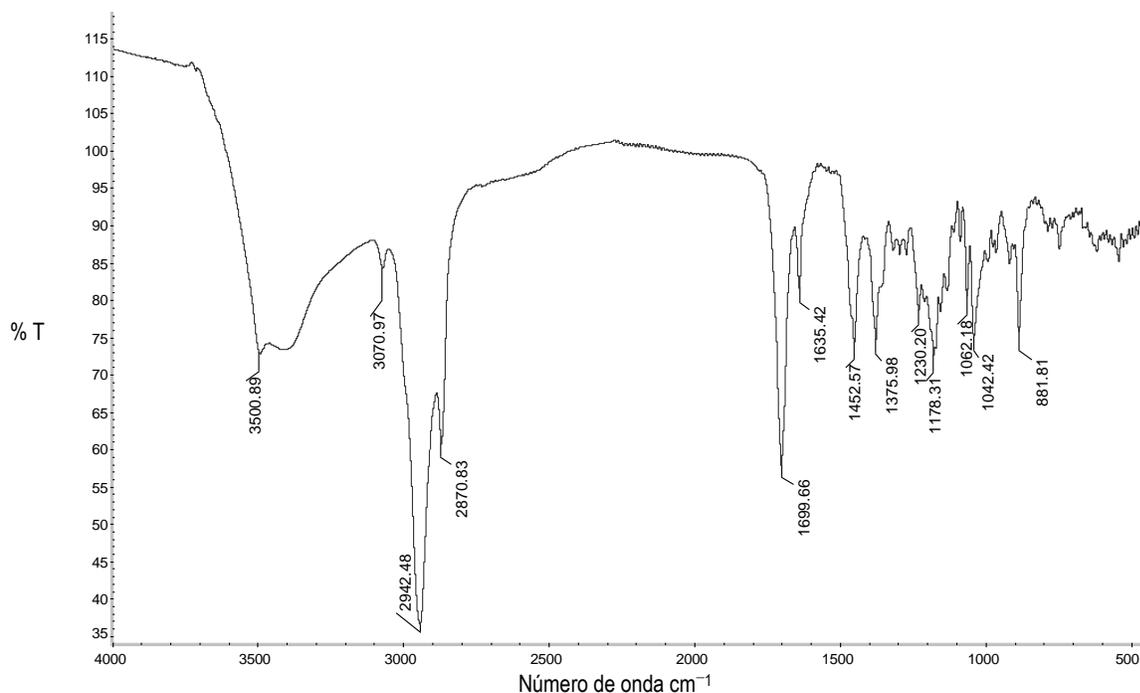


Figura 2.48 Espectro de IR (película) del compuesto IX.

En el espectro de RMN-¹H (Figura 2.49) se observaron dos señales simples a δ 4.95 y 4.77 indicando la presencia de protones olefínicos; entre δ 4.00 y 3.50 se observaron cuatro señales con integral de un protón; a δ 3.95 una señal simple ancha correspondiente a un protón de grupo metino base de oxhidrilo; a δ 3.87 y 3.70 dos señales dobles, cada una con una J de 11.4 Hz, lo cual se deduce por la presencia de un metileno unido directamente a oxígeno; y una señal múltiple a δ 3.55 característica del H-19 de un triterpeno pentacíclico de tipo lupano; por último, se observaron cinco señales, cada una integrando para tres protones, correspondiente a un número igual de metilos angulares, a δ 1.79, 1.11, 0.99, 0.89 y 0.76.

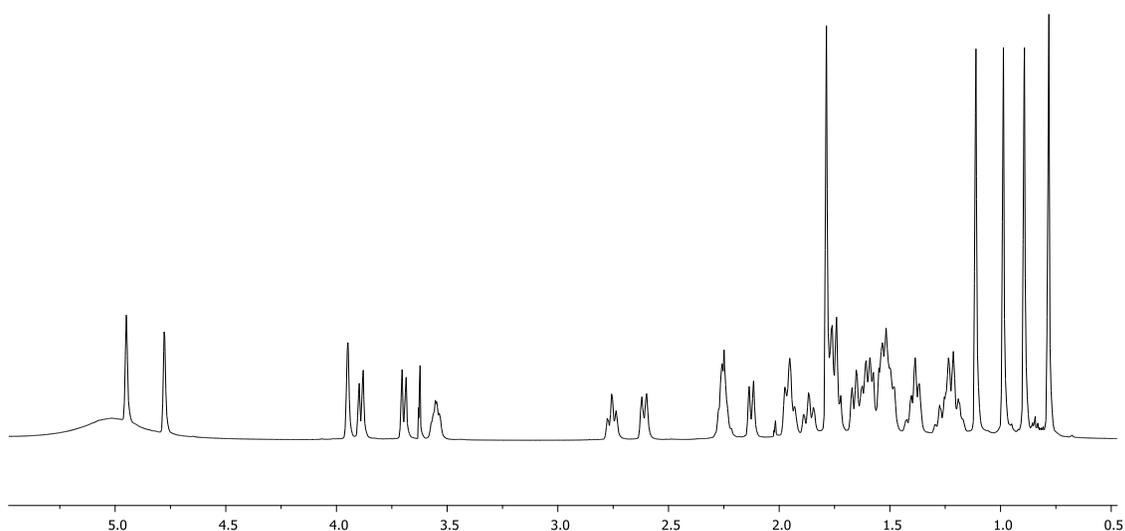


Figura 2.49 Espectro de RMN-¹H del compuesto **IX** en piridina-*d*₅ (600 MHz).

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto **IX** (Figura 2.50) se observaron 30 señales. Se determinó la presencia de un carbono de ácido carboxílico debido a una señal a δ 179.4, lo cual concuerda con lo observado en el espectro de IR. Por otro lado, se observaron señales a δ 151.8 y δ 110.4, pertenecientes a carbonos olefínicos, corroborando la presencia de un radical isopropenilo, característico de triterpenos de esqueleto lupano. Finalmente, fue posible observar dos señales a δ 72.0 y 76.5, correspondientes a carbonos unidos directamente a oxígeno, las cuales pertenecen a un metileno y a un metino, sugiriendo la presencia de un alcohol primario y un alcohol secundario, respectivamente.

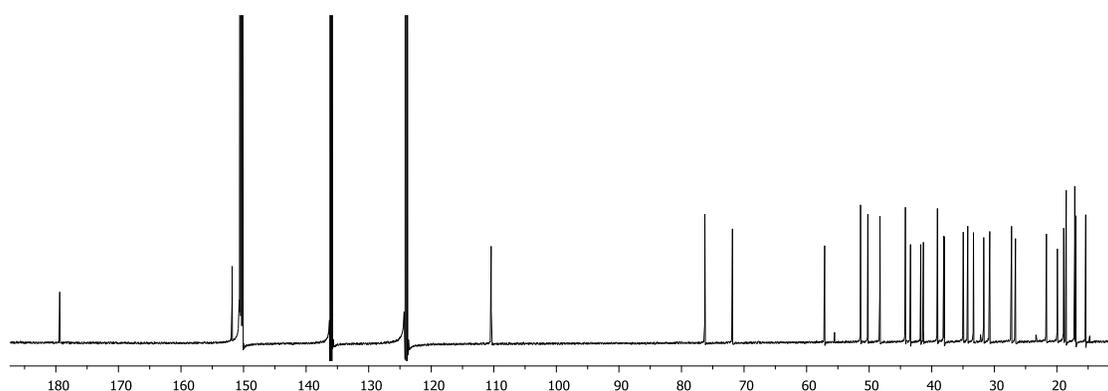


Figura 2.50 Espectro de RMN-¹³C del compuesto **IX** a 150 MHz en piridina-*d*₅.

Las señales observadas se compararon y se observaron similares con las reportadas previamente del ácido 24-hidroxibetulínico, triterpeno aislado del extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. vernicosum* (García-Cámara, 2014); sin embargo, en este trabajo se corrobora la orientación del H-3 en β , ya que se observa en el espectro de RMN- ^1H una señal pseudo simple, indicando la orientación del grupo oxhidrilo en orientación α (Figura 2.51).

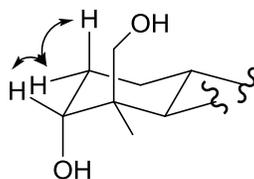


Figura 2.51 Orientación del anillo A del compuesto **IX**.

La posición del alcohol primario se determinó por medio del experimento NOESY (Figura 2.52), en el cual se observa el acoplamiento entre el H-24 con el metilo en posición 25; debido a los experimentos obtenidos y con lo reportado previamente, se determinó que el compuesto **IX** es el ácido 3 α ,24-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico, no reportado previamente en la literatura (Figura 2.53, Cuadro 2.7).

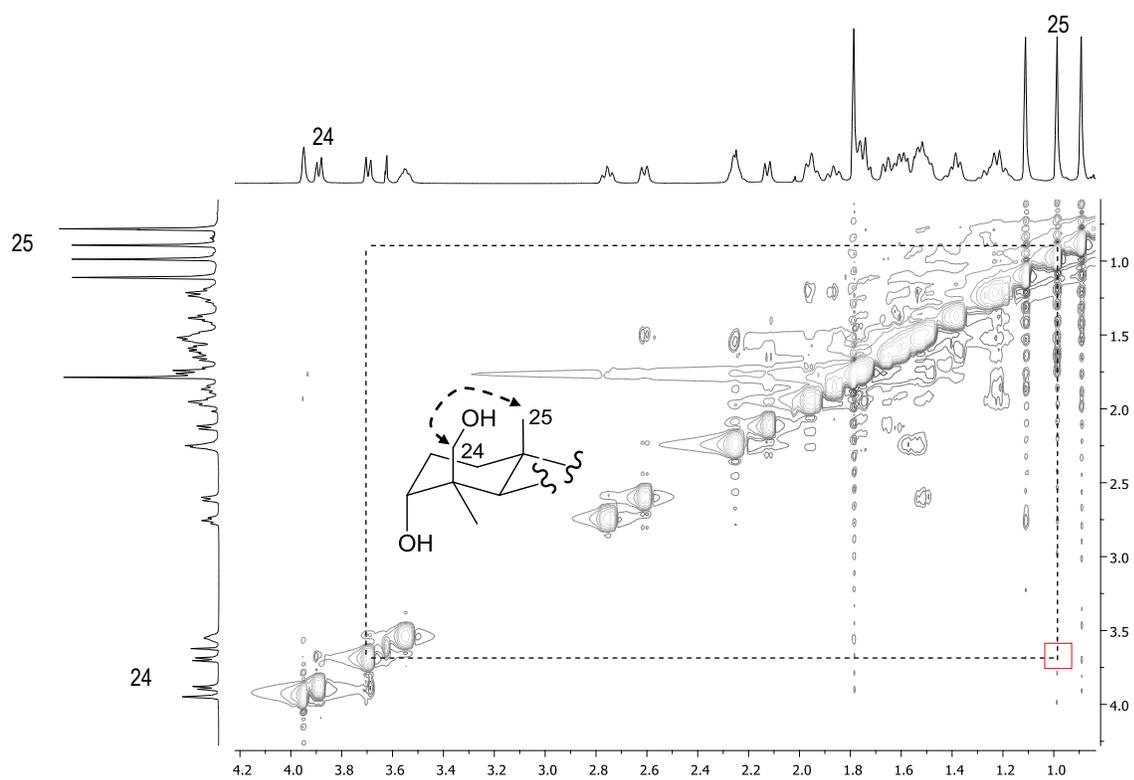


Figura 2.52 Ampliación del experimento NOESY del compuesto IX.

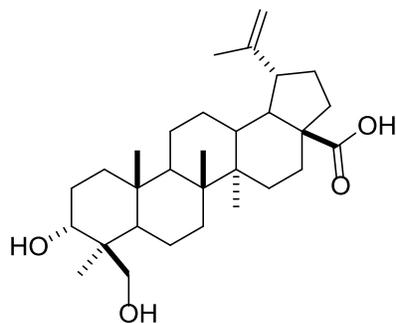


Figura 2.53 Estructura del compuesto IX (ácido 3 α ,24-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico).

Cuadro 2.7 Asignación completa de los datos espectroscópicos de RMN-¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz) determinado en piridina-*d*₅ del compuesto **IX**.

Posición	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	Posición	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
1	1.79 (m), 1.37 (m)	34.2	16	2.61 (d, <i>J</i> = 12.6 Hz), 1.48 (m)	33.3
2	1.97 (m), 1.76 (m)	27.2	17	---	57.1
3	3.95 (sa)	76.3	18	1.70 (m)	50.2
4	---	41.3	19	3.55 (m)	48.3
5	2.12 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz)	44.2	20	---	151.8
6	1.59 (m), 1.39 (m)	18.9	21	2.25 (m), 1.51 (m)	31.7
7	1.63 (m), 1.35 (m)	35.0	22	2.25 (m), 1.59 (m)	38.0
8	---	41.8	23	0.78 (s)	18.5
9	1.65 (t, <i>J</i> = 11.4 Hz)	51.3	24	3.89 (d, <i>J</i> = 11.4 Hz), 3.70 (d, <i>J</i> = 11.4 Hz)	71.9
10	---	37.9	25	0.89 (s)	17.0
11	1.51 (m), 1.22 (m)	21.7	26	0.99 (s)	15.4
12	1.95 (m), 1.19 (m)	26.6	27	1.11 (s)	17.1
13	2.74 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz)	39.1	28	---	179.4
14	---	43.4	29	4.95 (sa), 4.78 (sa)	110.4
15	1.86 (t, <i>J</i> = 13.2 Hz), 1.21 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz)	30.7	30	1.79 (s)	19.9

Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (X)

El compuesto **X** fue aislado como un sólido de apariencia cristalina de color blanco, obteniéndose 49.1 mg, el cual fue analizado por espectroscopía de IR (Figura 2.54) y en el espectro se observó una señal a 3500 cm⁻¹ de estiramiento O-H, a 1692 cm⁻¹ una señal intensa característica al estiramiento C=O de aldehído α,β -insaturado. En el experimento por espectrometría de masas de alta resolución (modo FAB) mostró un ion molecular de 486.3338 *m/z* el cual corresponde a una fórmula molecular de C₃₀H₄₆O₅ (Figura 2.55).

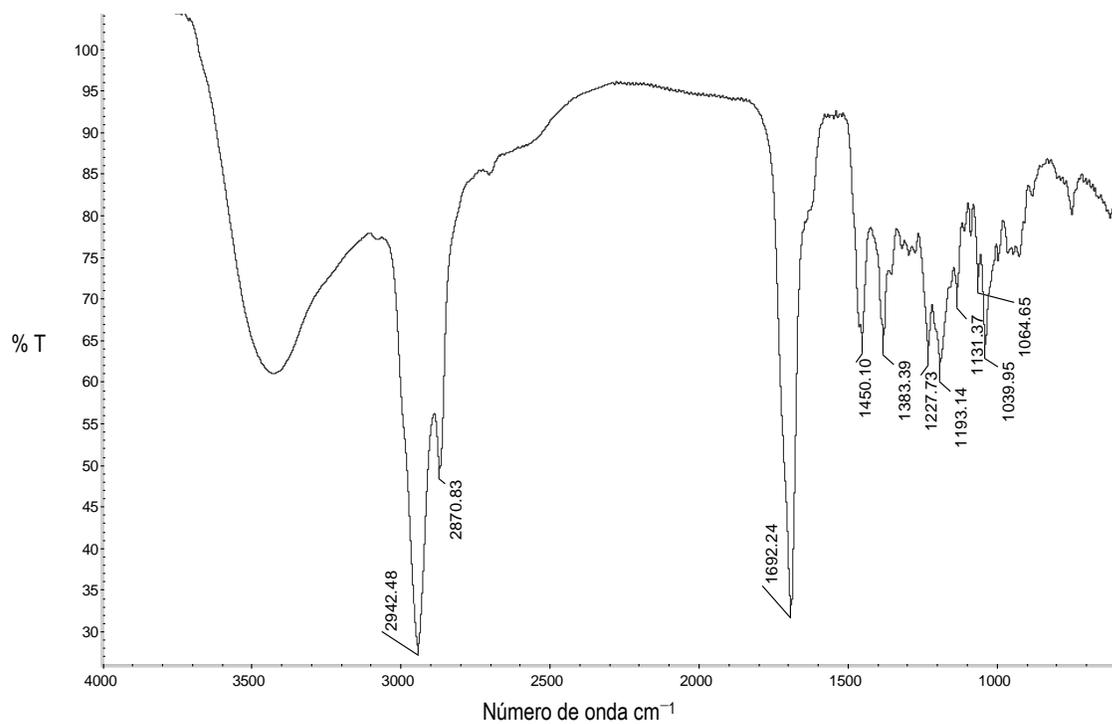


Figura 2.54 Espectro de IR (pastila KBr) del compuesto X.

UNIVERSIDAD DE YUCATAN
30/06/2016

Page 1

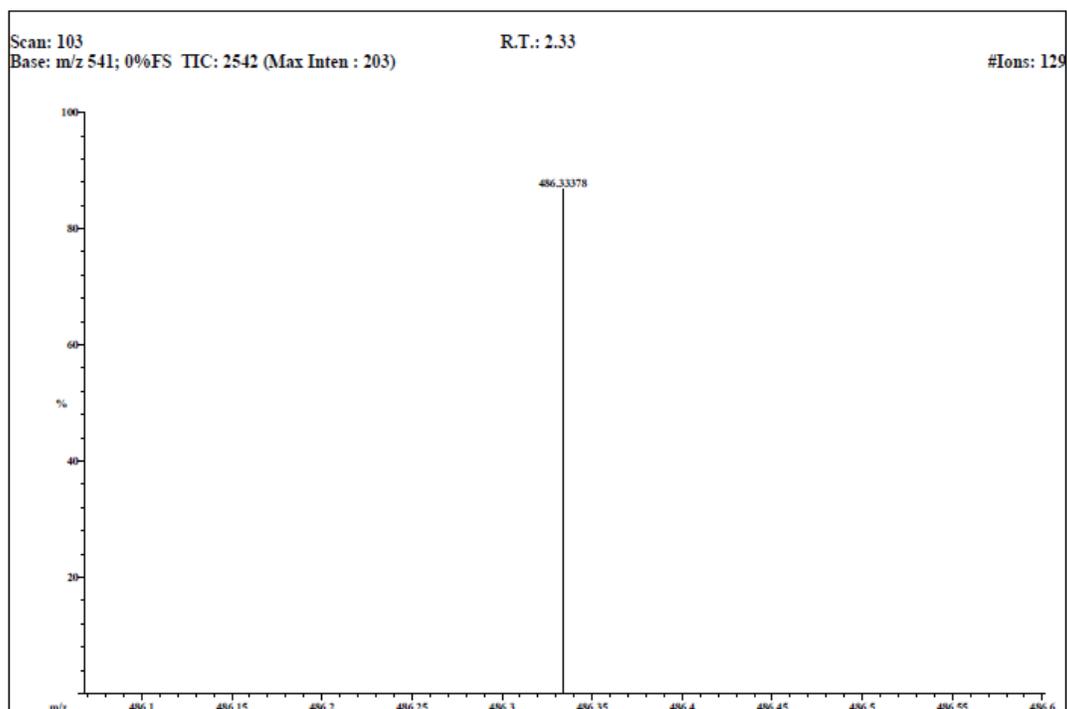
File: PVP-37C
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Probe
Date Run: 06-30-2016 (Time Run: 14:23:18)
Ionization mode: FAB+

Figura 2.55 Espectro de masas de alta resolución del compuesto **X**.

En su espectro de RMN-¹H (Figura 2.56) se observaron señales similares a las observadas anteriormente para el compuesto **IX**, tales como la presencia de dos señales simples a δ 6.37 y 6.00, correspondientes a los protones olefínicos característicos de H-29 de un triterpeno con esqueleto lupano; a δ 3.94 se observó una señal simple ancha de un protón de metileno base de grupo oxhidrilo (H-3); a δ 3.97 se observó una señal múltiple, indicando la presencia de H-19; en la región de grupos metilo se observaron cuatro señales simples, cada una integrando para tres protones; a δ 9.73 una señal característica de un protón de aldehído; por último, a δ 3.88 ($J = 10.8$ Hz) y δ 3.68 ($J = 10.8$ Hz) dos señales dobles, características de protones de metileno base de oxhidrilo.

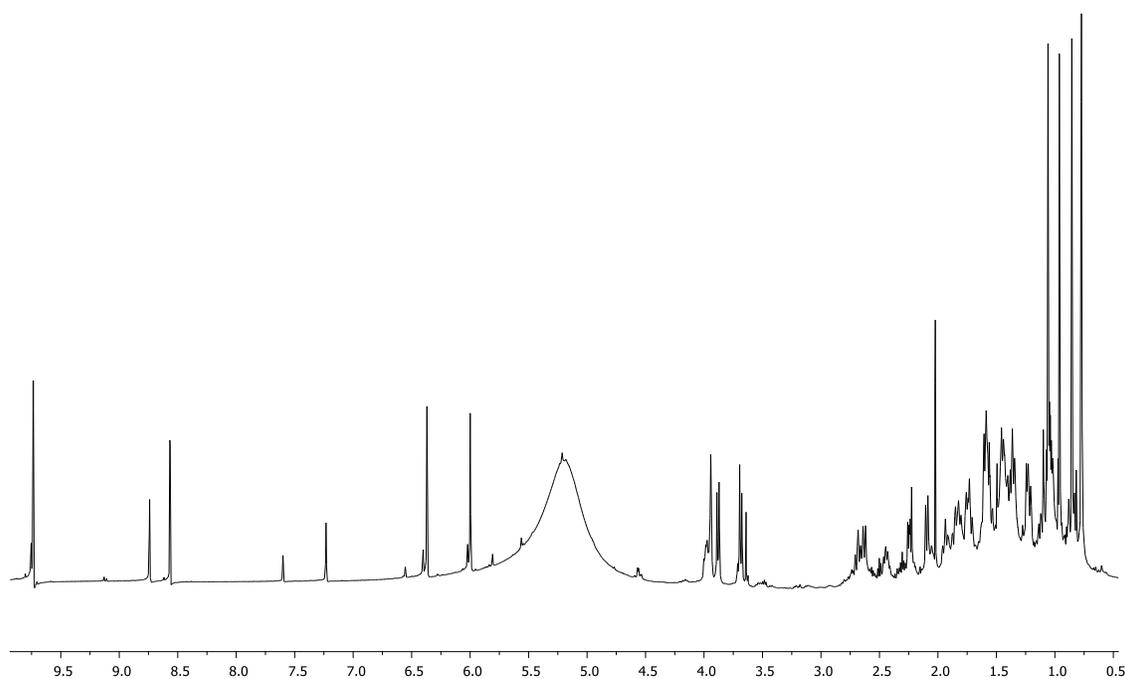


Figura 2.56 Espectro de RMN-¹H del compuesto **X** en piridina-*d*₅ (600 MHz).

Estas señales sugirieron que el compuesto **X** es un triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano con cuatro metilos; por lo anterior, de los siete metilos correspondientes al esqueleto base de lupano, tres se encuentran oxidados: como ácido carboxílico, aldehído y alcohol primario, respectivamente.

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.57) se observó un total de 30 señales, de las cuales una señal a δ 195.8 corresponde a un carbono sp^2 de grupo aldehído; a δ 179.2, una señal de carbono sp^2 de ácido carboxílico; a δ 158.2 y δ 134.2, dos señales de carbonos sp^2 de un grupo olefínico característico de los carbonos C-20 y C-29, respectivamente; a δ 76.2, una señal de carbono base de grupo oxhidrilo; y a δ 71.8, señal correspondiente a un metileno base de grupo oxhidrilo.

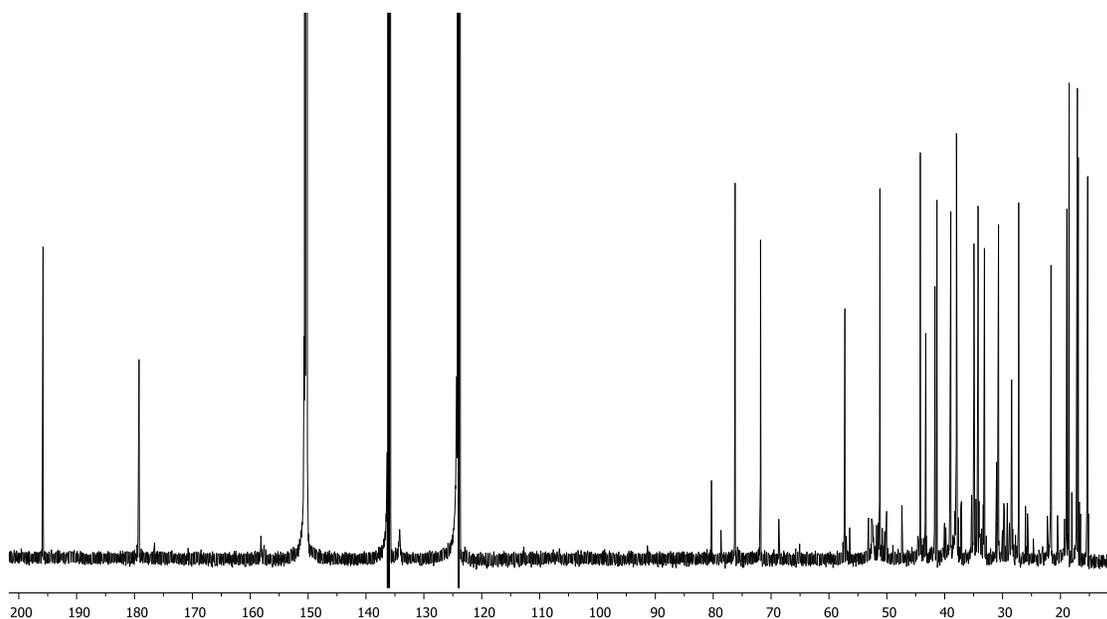


Figura 2.57 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **XI** en piridina- d_5 (150 MHz).

Debido a que la señal del protón en posición 3 se observó como una señal simple ancha, se determinó que la posición del grupo oxhidrilo se encuentra con orientación α .

Para determinar la posición de los grupos funcionales se obtuvieron experimentos bidimensionales de RMN, tales como HMBC, en donde se observó el acoplamiento entre los protones en posición 16 (δ 2.23 y 1.55) con el carbono de grupo ácido (δ 179.2) (Figura 2.58), determinándose que el carbono de ácido carboxílico se encuentra en la posición 28.

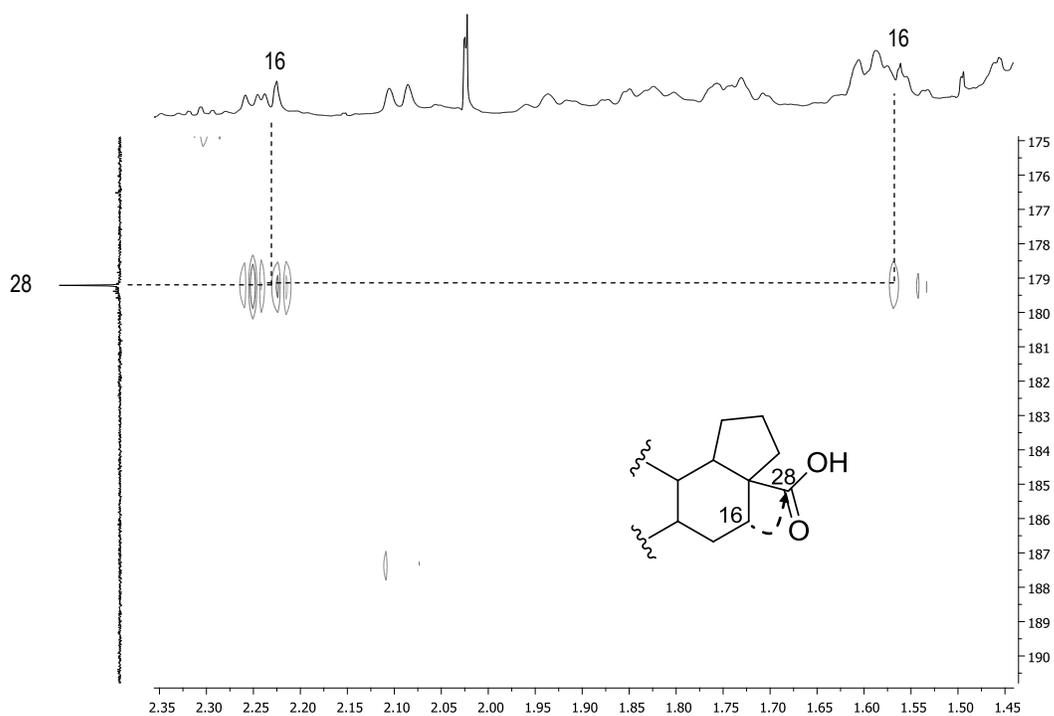


Figura 2.58 Ampliación del experimento HMBC del compuesto **X**.

Por su parte, el protón del grupo formilo (δ 9.73) muestra un acoplamiento en el experimento COSY con los protones H-29, así como con el H-19 (Figura 2.59), esto de igual manera se confirma con el acoplamiento entre el protón del aldehído con C-20 y C-29 mostrado en el experimento HMBC (Figura 2.60), asignando al grupo formilo en el C-30.

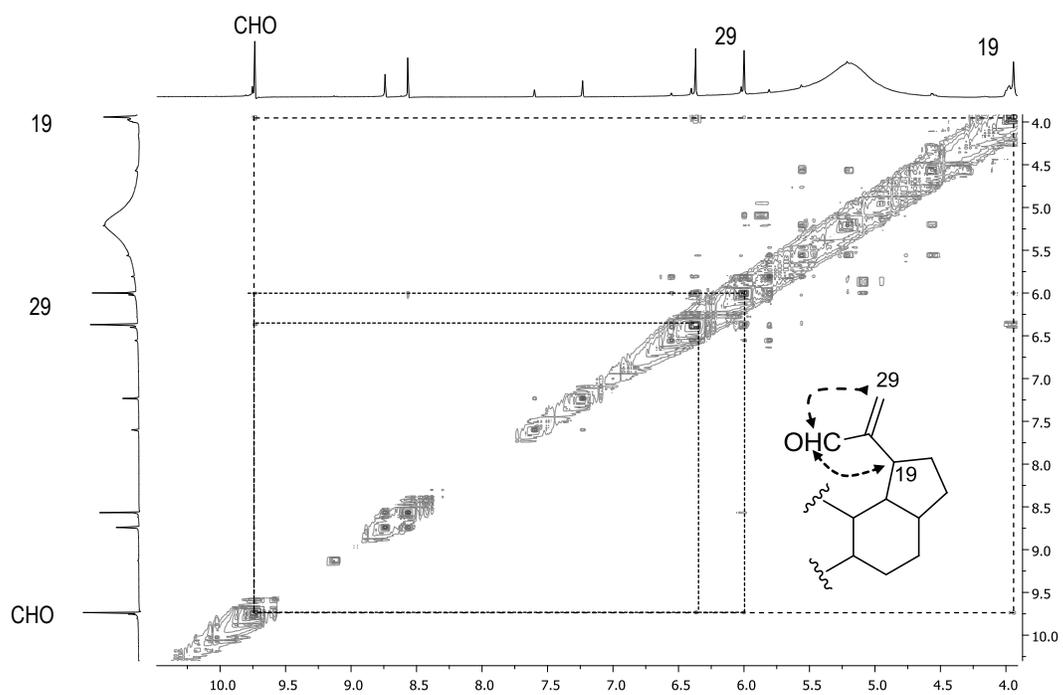


Figura 2.59 Ampliación del experimento COSY del compuesto X.

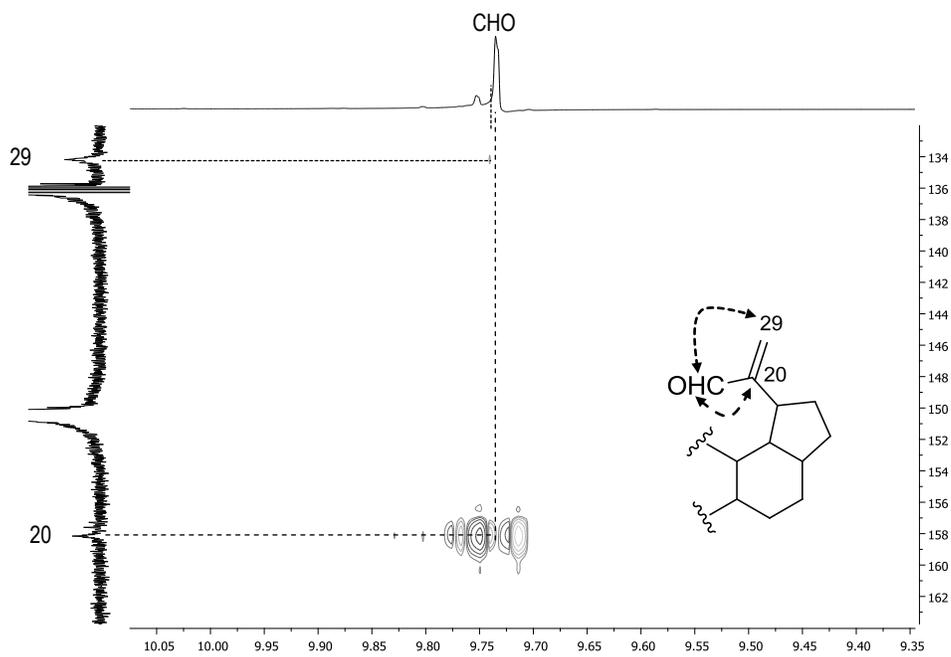


Figura 2.60 Ampliación del experimento HMBC del compuesto X.

Se determinó la posición del hidroximetileno (δ 3.88, $J = 10.8$ Hz y δ 3.68, $J = 10.8$ Hz) con base en el acoplamiento observado en HMBC con el C-3, así como con un metilo a δ 18.5 (Figura 2.61); de igual manera, esto se confirmó al observarse por medio del experimento COSY el acoplamiento entre los protones del hidroximetileno con el H-3 y los protones del metilo a δ 0.77 (Figura 2.61). De esta manera, se comprobó que el grupo hidroximetileno se encuentra en el anillo A.

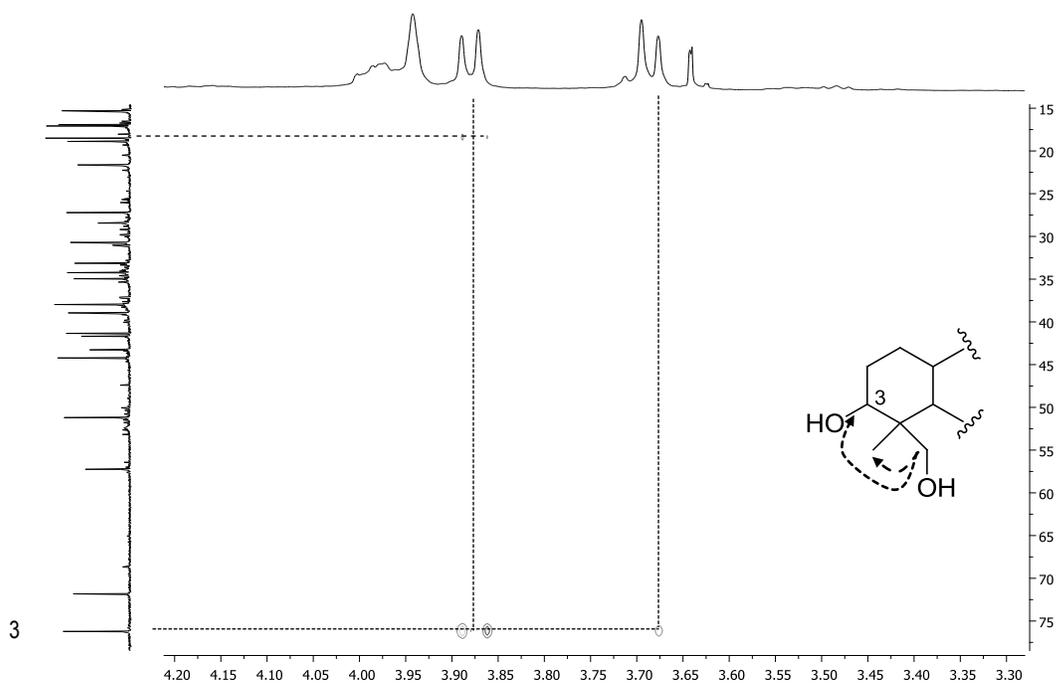


Figura 2.61 Ampliación del experimento HMBC del compuesto X.

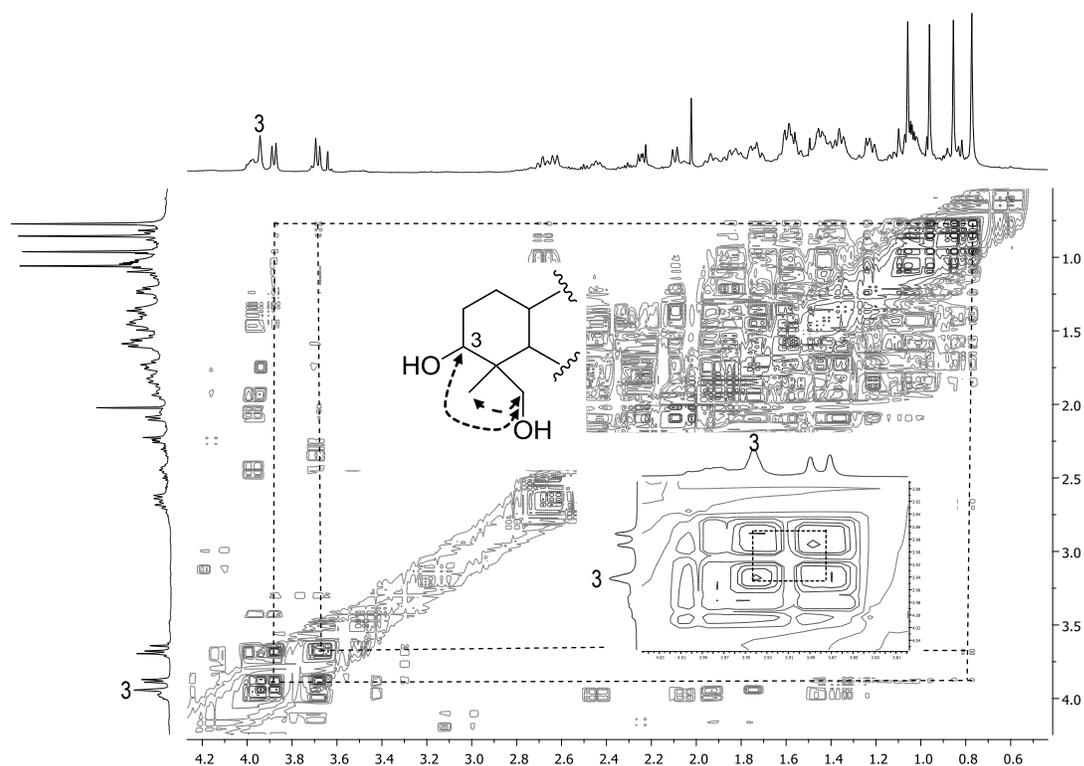


Figura 2.62 Ampliación del experimento COSY del compuesto **X**.

La determinación de la posición del grupo hidroximetileno, se realizó por medio del experimento NOESY-1D (Figura 2.63), que consistió en irradiar al metilo a δ 0.77 a una frecuencia de 463.95 Hz con un tiempo de mezclado de 500 milisegundos (ms) (128 scans), observando la presencia del H-3 (δ 3.95) con el grupo hidroximetileno (δ 3.88 y 3.68) y el CH₃-25 (δ 0.89); debido a la correlación entre el CH₃ a δ 0.77 y el CH₃-25, se determinó que el grupo hidroximetileno se encuentra en posición 23. Con base en los espectros obtenidos, se determinó que el compuesto **X** corresponde al ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico, el cual es nuevo para la literatura (Figura 2.64). En la Cuadro 2.8 se encuentra la asignación completa del compuesto **X**.

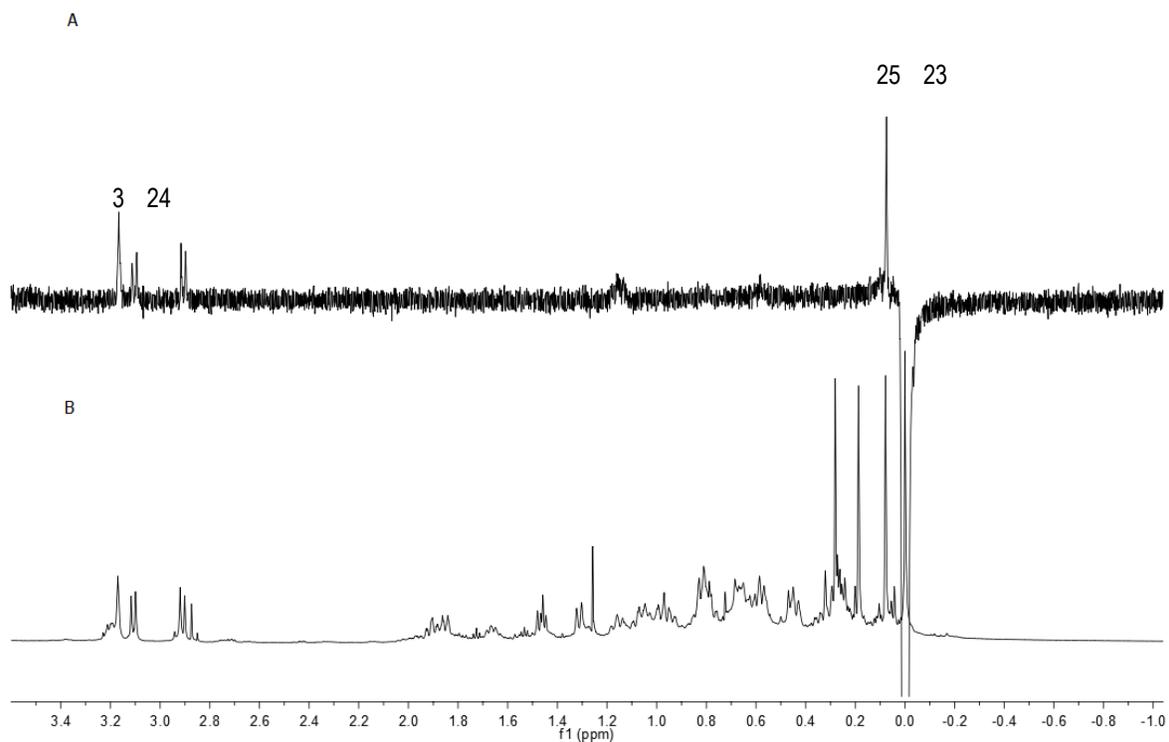


Figura 2.63 Espectro selectivo NOESY-1D del compuesto **X** (A). RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **X** (B).

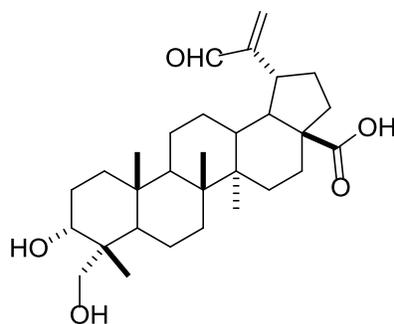


Figura 2.64 Estructura del compuesto **X** (ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxo-lup-20(29)-en-28-oico).

Cuadro 2.8 Asignación completa de los datos espectroscópicos de RMN-¹H (600 MHz) y -¹³C (150 MHz) determinado en piridina-*d*₅ del compuesto **X**.

Posición	$\delta^1\text{H}$ (m)	$\delta^{13}\text{C}$	Posición	$\delta^1\text{H}$ (m)	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.73 (m), 1.45 (m)	34.2	16	2.23 (m), 1.55 (m)	33.1
2	1.93 (m), 1.75 (m)	27.2	17	---	57.3
3	3.94 (sa)	76.2	18	2.06 (m)	51.7
4	---	41.3	19	3.97 (m)	51.2
5	2.10 (m)	56.2	20	---	158.1
6	1.58 (m), 1.37 (m)	18.9	21	2.45 (m), 1.56 (m)	32.7
7	1.61 (m), 1.35 (m)	35.0	22	2.24 (m), 1.81 (m)	37.9
8	---	41.7	23	3.88 (d, $J = 10.8$ Hz), 3.69 (d, $J = 10.8$ Hz)	71.8
9	1.60 (d, $J = 10.8$ Hz)	51.3	24	0.77 (s)	18.5
10	---	37.9	25	0.86 (s)	17.1
11	1.44 (m), 1.12 (m)	21.6	26	1.06 (s)	16.9
12	1.42 (m), 1.02 (m)	28.4	27	0.96 (s)	15.3
13	2.69 (ddd, $J = 12.6, 12.6, 2.4$ Hz)	38.9	28	---	179.2
14	---	43.3	29	6.37 (s), 6.00 (s)	134.2
15	1.85 (m), 1.22 (m)	30.7	30	9.73	195.8

Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroilup-20(29)-28-oico (XI)

El compuesto **XI** se obtuvo como un sólido blanco, soluble en CH₂Cl₂. El compuesto fue analizado por medio de espectrometría de masas de alta resolución (Figura 2.65) determinando para éste una fórmula molecular de C₃₃H₅₂O₄ con una masa molecular de 512.3841 *m/z* (calculada para 512.3865).

File: lvc-pvp15alELAR
Sample:
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Probe

Date Run: 05-07-2017 (Time Run: 14:16:38)

Ionization mode: EI+

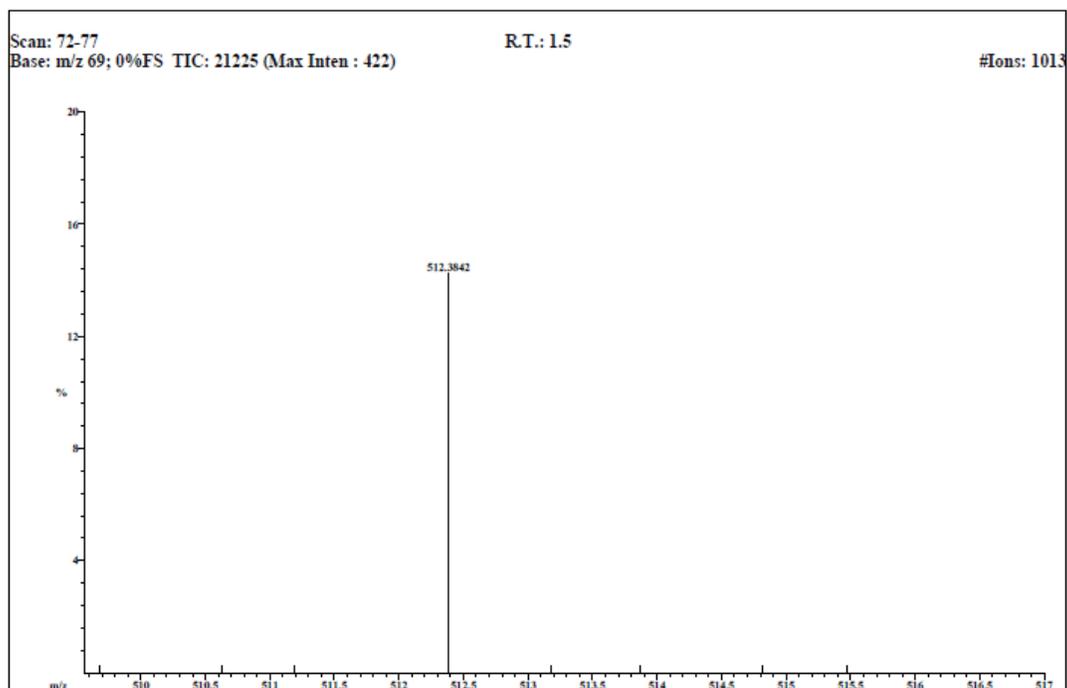


Figura 2.65 Espectro de masas de alta resolución del compuesto **XI**.

En su espectro de RMN-¹H (Figura 2.66) se observaron señales características de un triterpeno de esqueleto lupano, tales como una señal doble de doble de dobles a δ 3.01 ($J = 10.8, 10.8, 4.8$ Hz) de H-19 y dos señales simples a δ 4.61 y 4.74, pertenecientes a dos protones vinílicos de H-29. En la región de metilos se observaron seis señales simples correspondientes a siete metilos (δ 0.68, 0.85, 0.93, 1.01, 1.41 \times 2, 1.69); dos señales dobles a δ 3.23 ($J = 11.4$ Hz) y δ 3.66 ($J = 11.4$ Hz), las cuales sugieren la presencia de un metileno unido directamente a oxígeno; una señal simple ancha a δ 3.61, la cual pertenece a un protón base de alcohol con orientación β .

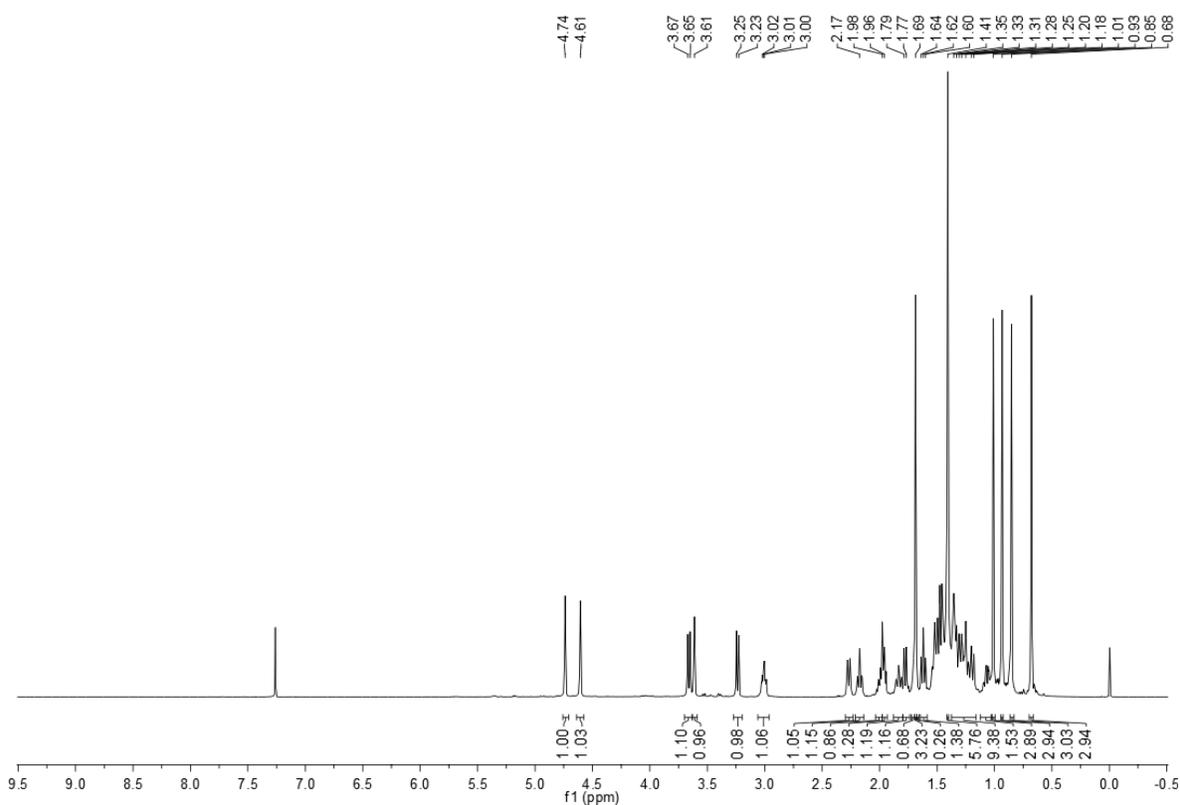


Figura 2.66 Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del compuesto **XI**.

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.67) se observaron 33 señales, de las cuales se observó una señal a δ 182.0 indicando la presencia de un grupo carbonilo de ácido carboxílico; de igual manera, se observaron señales a δ 150.4 y δ 109.6, pertenecientes a los carbonos olefínicos C-29 y C-20; así mismo, se observaron dos señales a δ 68.3 y 73.0, correspondientes a carbonos unidos directamente a oxígeno, las cuales pertenecen a un metileno y a un metino unidos a oxígeno cada uno. Finalmente, se observó una señal a δ 98.1, correspondiente a un carbono cuaternario, cuyo desplazamiento indica que éste se encuentra unido directamente a dos oxígenos.

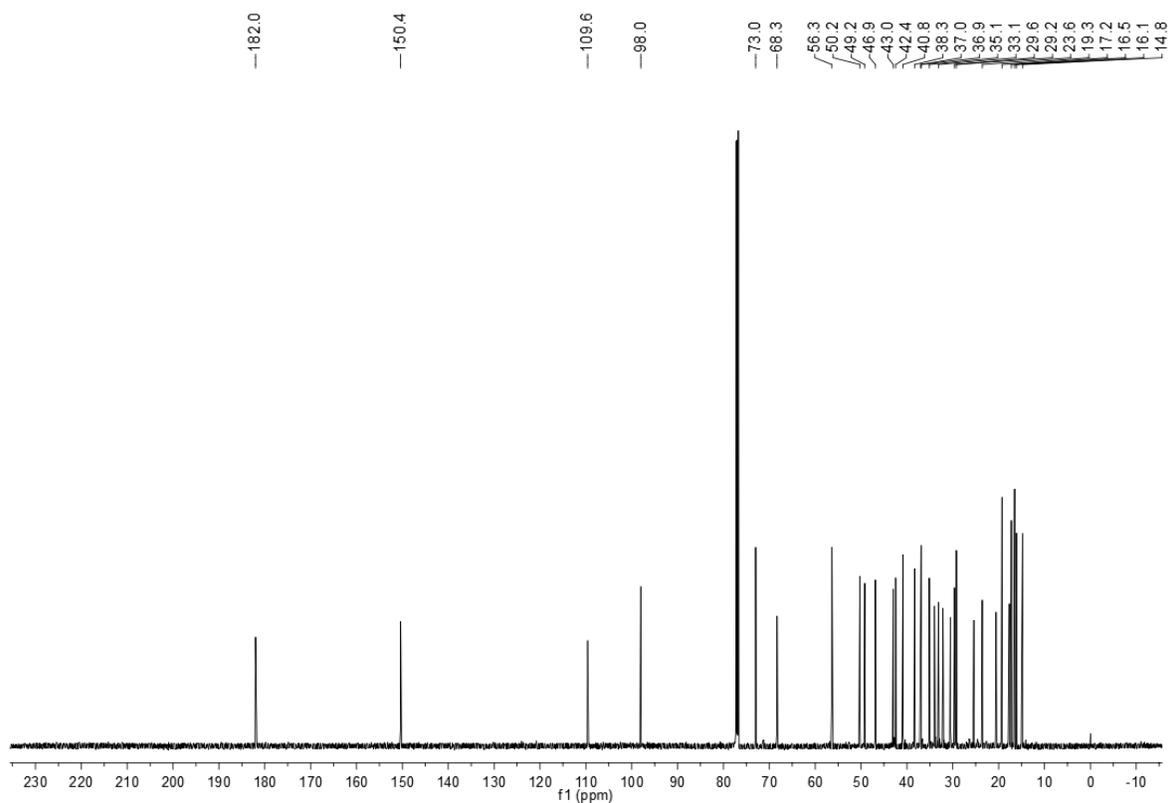


Figura 2.67 Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **XI** a 100 MHz con CDCl_3 .

Estas señales fueron comparadas con los del compuesto **IX**, encontrándose que el compuesto **XI** tiene un anillo adicional formado por un isopropilideno (δ_{C} 98.0, 29.2, 19.3) unido a los oxígenos de alcohol primario y de alcohol secundario.

Los protones de metileno oxigenado H-23 (δ 3.66, d, $J = 11.4$ Hz; 3.23, d, $J = 11.4$ Hz) mostró las correlaciones en el experimento HMBC con el carbono cuaternario a δ_{C} 98.0, así como con los carbonos C-2 (δ_{C} 23.6), C-3 (δ_{C} 73.0), C-4 (δ_{C} 35.1), C-5 (δ_{C} 43.0) y C-24 (δ_{C} 17.2), de esta manera se determinó que el carbono cuaternario (δ_{C} 98.0) se encuentra unido entre C-3 y C-23 como un grupo acetónido que forma un grupo 1,3-dioxano (Figura 2.68).

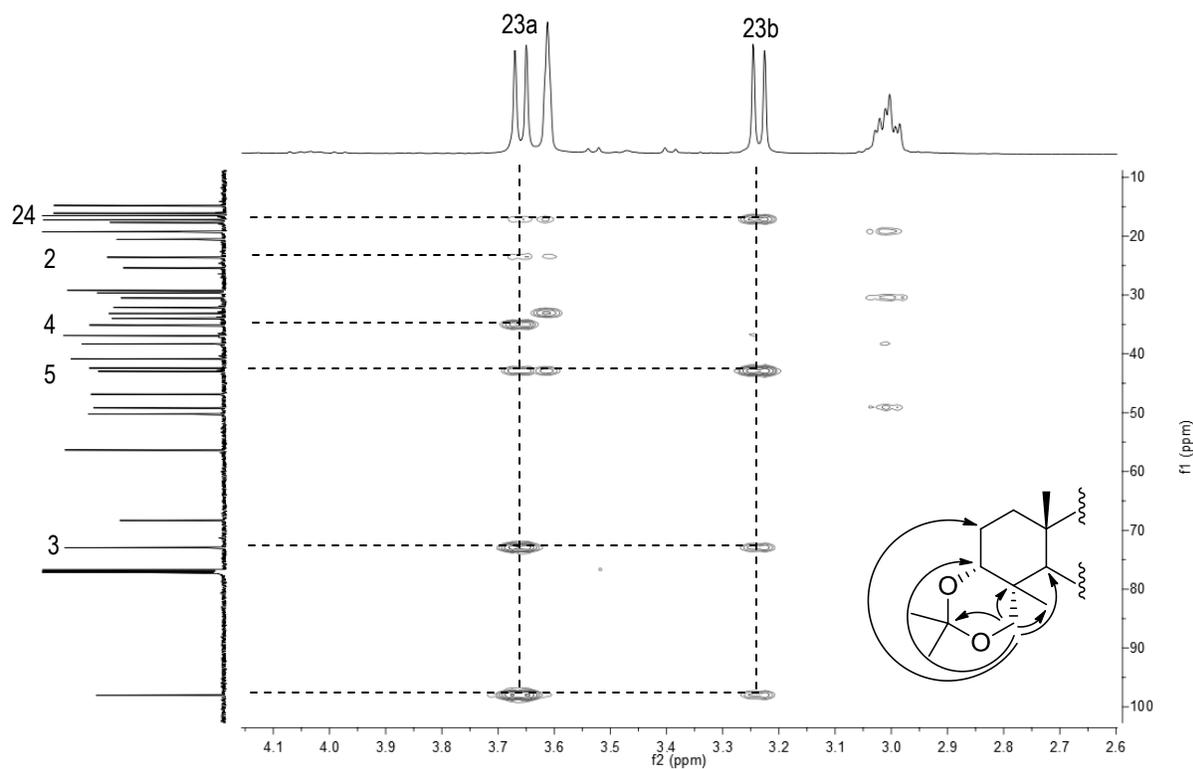


Figura 2.68 Ampliación del espectro HMBC del compuesto **XI**.

Para poder determinar la orientación del grupo 1,3-dioxano se realizó el experimento ROESY, observando una interacción entre H-23 y H-5 (Figura 2.69), mientras que un experimento NOESY-1D selectivo confirmó correlación espacial entre CH₃-24 y CH₃-25 (Figura 2.70); para el experimento selectivo se irradió a 396.91 Hz (0.68 ppm) el CH₃-24 a un tiempo de mezclado de 250 ms (32 scans).

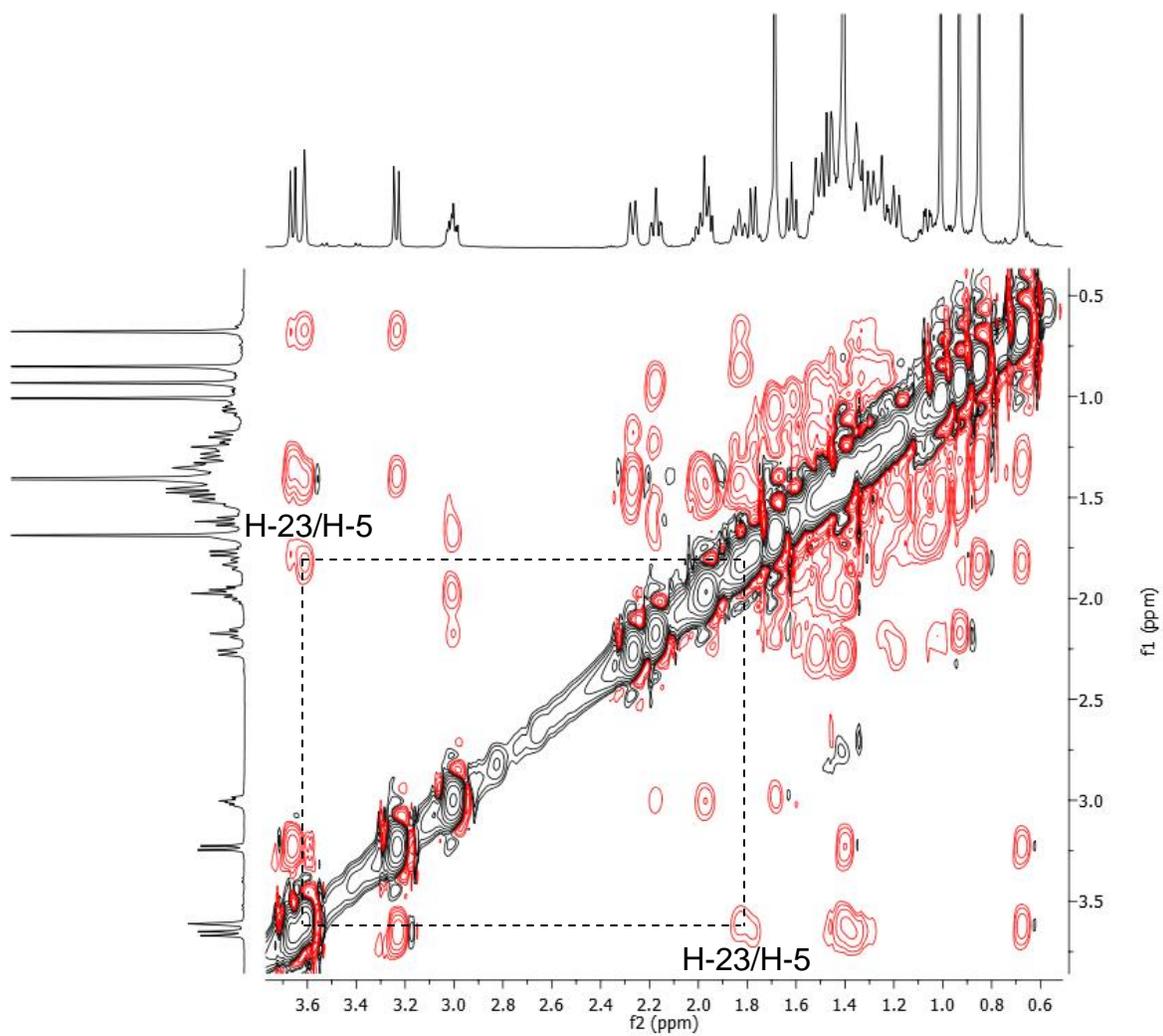


Figura 2.69 Ampliación del espectro ROESY del compuesto XI.

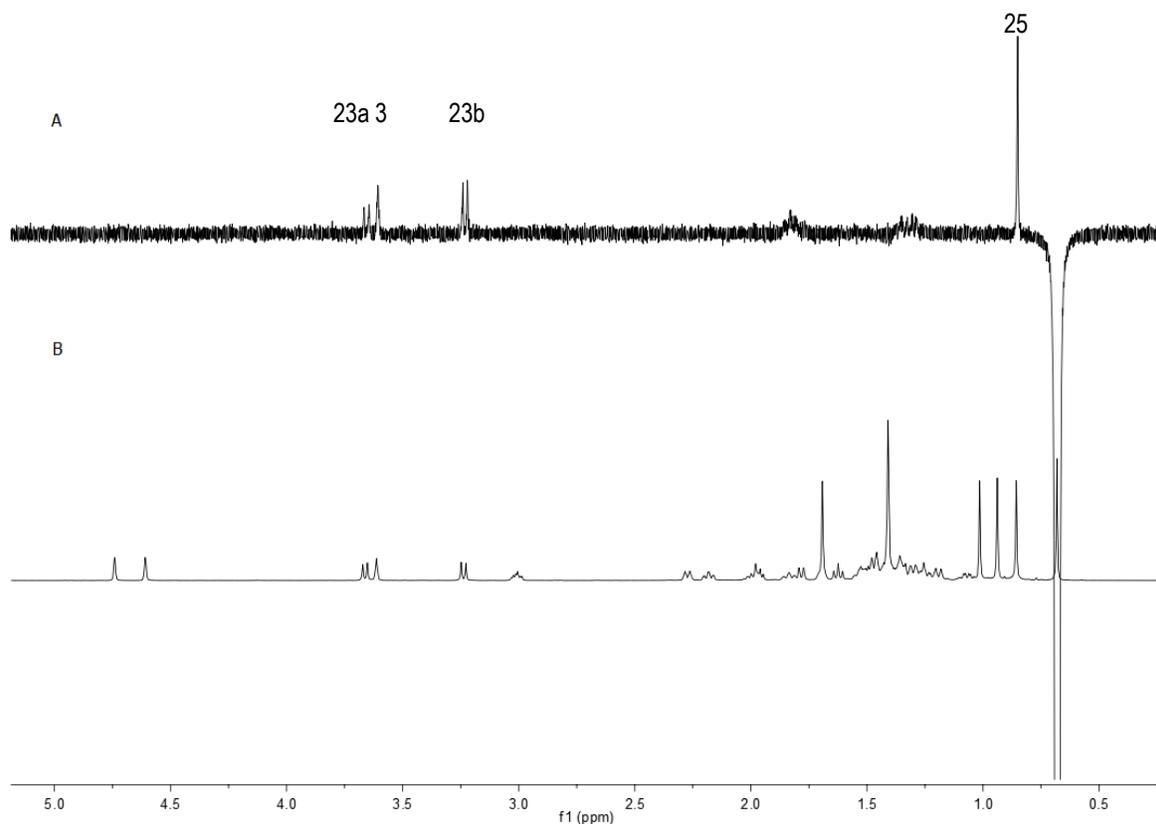


Figura 2.70 A) Espectro del experimento selectivo NOESY-1D del compuesto **XI**. B) Espectro de RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **XI**.

Estos dos experimentos ^1H - ^1H RMN ayudaron en la asignación del grupo acetónido a una orientación α -cis. Además, se compararon las señales para el grupo acetónido con los reportados en la literatura para tales análogos por Tsuda *et al.* (1974), ayudando a establecer que el grupo *O,O*-isopropilideno y el anillo A tienen una conformación *cis*-decalina (tipo D). Con base en esta evidencia, la estructura del nuevo compuesto **XI** se elucidó como ácido 3 α ,23-*O*-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-28-oico (Figura 2.71). Este compuesto fue aislado anteriormente del extracto metanólico de esta especie (García-Cámara, 2014) e identificado como ácido 2,24-epoxi-2,3-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (Figura 2.72), sin embargo, en el presente trabajo se identifica y corrobora la identidad del compuesto como el ácido 3 α ,23-*O*-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-28-oico debido a los datos espectroscópicos anteriormente mencionados, el cual no ha sido reportado previamente en la literatura (Cuadro 2.9).

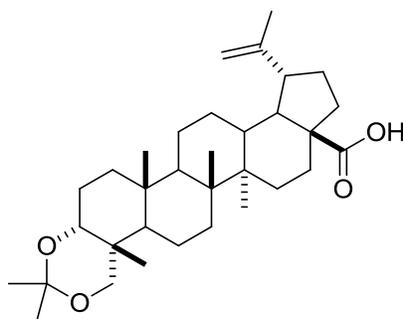


Figura 2.71 Estructura del compuesto **XI** (ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-28-oico).

Cuadro 2.9 Asignación completa de los datos espectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150 MHz) determinado en CDCl_3 del compuesto **XI**.

Posición	δ ^1H (m)	δ ^{13}C	Posición	δ ^1H (m)	δ ^{13}C
1	1.32 (m), 1.28 (m)	323.1	18	1.61 (t, $J = 11.4$ Hz)	49.2
2	1.83 (t, $J = 13.3$ Hz), 1.43 (m)	23.6	19	3.01 (ddd, $J = 10.8, 10.8, 4.8$ Hz)	46.9
3	3.61, sa	73.0	20	---	150.4
4	---	35.1	21	1.98 (m), 1.48 (m)	30.5
5	1.78 (d, $J = 12.6$ Hz)	43.0	22	1.96 (m), 1.47 (m)	37.0
6	1.36 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.29 (d, $J = 13.5$ Hz)	17.7	23	3.66 (d, $J = 11.4$ Hz), 3.23 (d, $J = 11.4$ Hz)	68.3
7	1.52 (m), 1.33 (m)	34.0	24	0.68 (s)	17.2
8	---	40.8	25	0.85 (s)	16.5
9	1.46 (d, $J = 11.4$ Hz)	50.2	26	0.93 (s)	16.1
10	---	36.9	27	1.01 (s)	14.8
11	1.46 (m), 1.23 (m)	20.6	28	---	182.0
12	1.69 (m), 1.06 (dd, $J = 12.6, 3.6$ Hz)	25.4	29	4.74 (s), 4.61 (s)	109.6
13	2.17 (td, $J = 12.6, 1.8$ Hz)	38.3	30	1.69 (s)	19.3
14	---	42.4	(CH_3) $_2\text{C}$	1.41 (s)	29.2
15	1.52 (m), 1.19 (d, $J = 12.6$ Hz)	29.6	(CH_3) $_2\text{C}$	1.41 (s)	19.3
16	2.26 (m), 1.41 (m)	33.1	(CH_3) $_2\text{C}$	---	98.0
17	---	56.3			

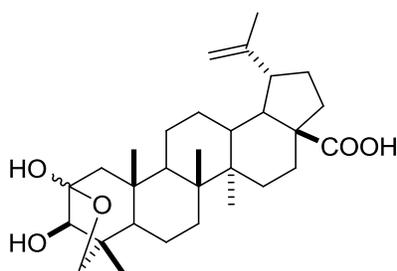


Figura 2.72 Estructura propuesta por García-Cámara (2014), para el compuesto **XI** (ácido 2,24-epoxi-2,3-dihidroxi-20(29)-en-28-oico).

28-norlup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol (XII)

El compuesto **XII** fue analizado por RMN- ^1H (Figura 2.73) en donde se observaron las siguientes señales características de un triterpeno de esqueleto lupano: a δ 4.73 una señal doble ($J = 2.3$ Hz), a δ 4.60 una señal doble de doble ($J = 2.3, 1.4$ Hz) correspondientes a los protones en posición H-29; a δ 3.39 se observó una señal pseudo triple del protón base de grupo oxhidrilo en posición H-3, que debido a la multiplicidad observada se determinó que debería estar el protón en orientación β , y por lo tanto con el grupo oxhidrilo en α ; de igual forma, se observó una señal doble de doble de dobles a δ 2.60 ($J = 10.8, 10.8, 6.2$ Hz) asignada al H-19; por último, en la región de grupos metilo se observó un total de seis señales simples correspondientes cada una a un grupo metilo (δ 1.68, 1.04, 0.96, 0.94, 0.85 y 0.83).

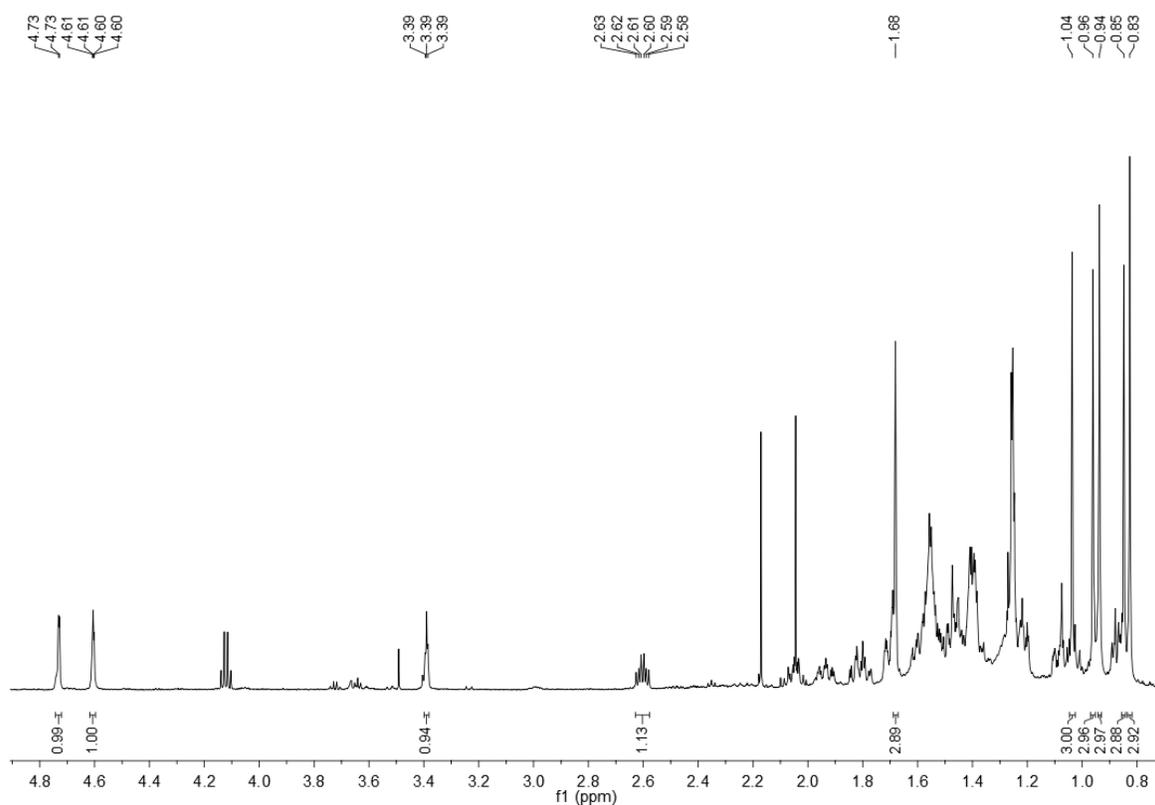


Figura 2.73 Ampliación del espectro de RMN- ^1H del compuesto **XII** en CDCl_3 a 600 MHz.

Con estas señales observadas en el espectro de RMN- ^1H se puede determinar que la estructura del compuesto corresponde a un triterpeno de esqueleto lupano con el OH en C-3 con orientación α , con seis grupos metilo, indicando la pérdida de un grupo metilo por una oxidación, o por ser un triterpeno de tipo *nor*; además, se observó protección en el desplazamiento químico de H-19 (de δ 3.00 pasó a δ 2.60), indicando que el C-28 no debería estar oxidado con un grupo carbonilo para causar un efecto de desprotección a H-19 debido a los efectos de los conos de desprotección del grupo carbonilo.

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.74) se observaron 29 señales de carbono, en particular las señales características a δ 150.2 y δ 109.9 correspondientes a los carbonos 20 y 29, respectivamente; a δ 80.6 y δ 76.4 dos señales de carbonos unidos a oxígeno, indicando que el compuesto **XII** posee en su estructura química dos grupos oxhidrilo, sin embargo, en el espectro de RMN- ^1H solamente se observó una señal indicativa de

protones base de grupo oxhidrilo, pudiendo deberse a que la estructura del compuesto no posee el C-28 y ahí se encuentre el grupo oxhidrilo.

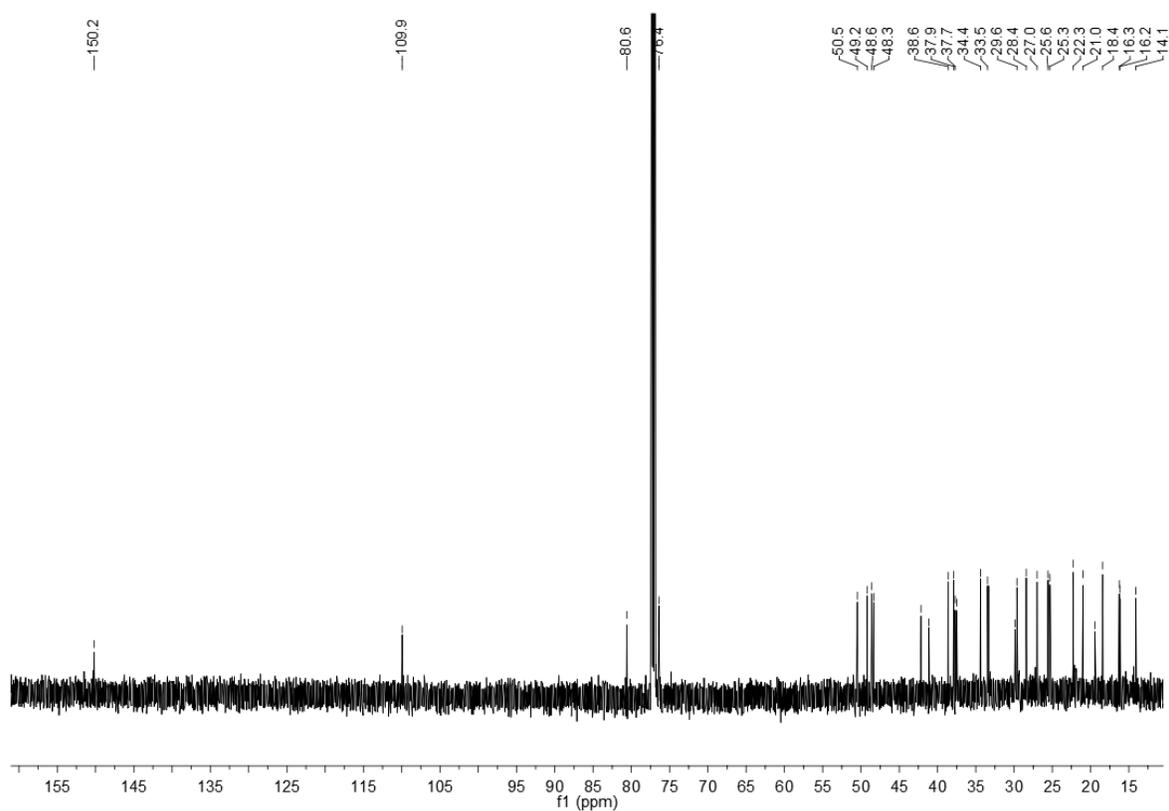


Figura 2.74 Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **XII** en CDCl_3 a 150 MHz.

Para determinar la posición del grupo oxhidrilo, se observaron las correlaciones del H-3 (δ 3.39) en el experimento bidimensional heteronuclear HMBC (Figura 2.75), con el C-1 (δ 33.6), así como las de los CH_3 -23 (δ 0.94) y CH_3 -24 (δ 0.83) con el C-3 (δ 76.4).

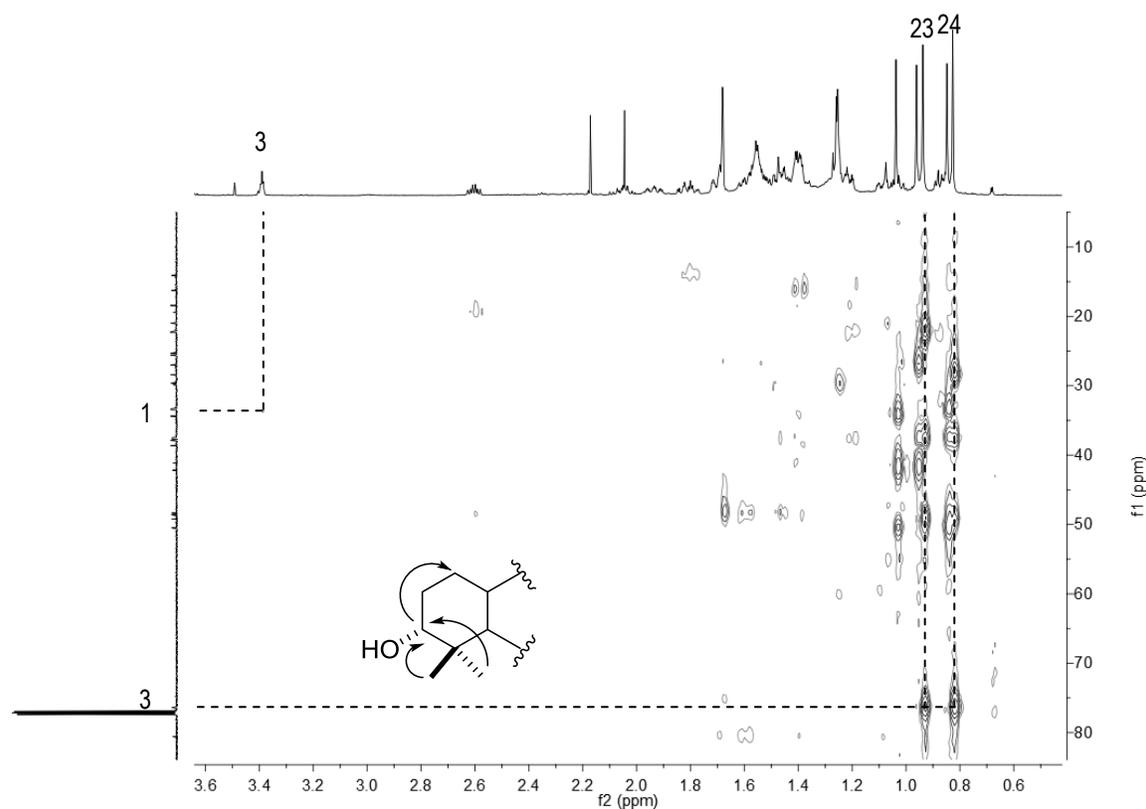


Figura 2.75 Ampliación del espectro HMBC del compuesto **XII**.

Para corroborar que efectivamente el grupo oxhidrilo se encuentra sobre el C-17 (δ 80.6) y se trata de un triterpeno de tipo *nor*-lupano, se observó en el espectro HMBC (Figura 2.76) las siguientes correlaciones: H-12 (δ 1.69)/C-17, H-22 (δ 1.60)/C-17, H-15 (δ 1.39)/C-17 y H-16 (δ 1.09)/C-17, además de observar las correlaciones entre el CH₃-27 con los C-12 (δ 27.0), C-13 (δ 37.7) y C-8 (δ 41.1).

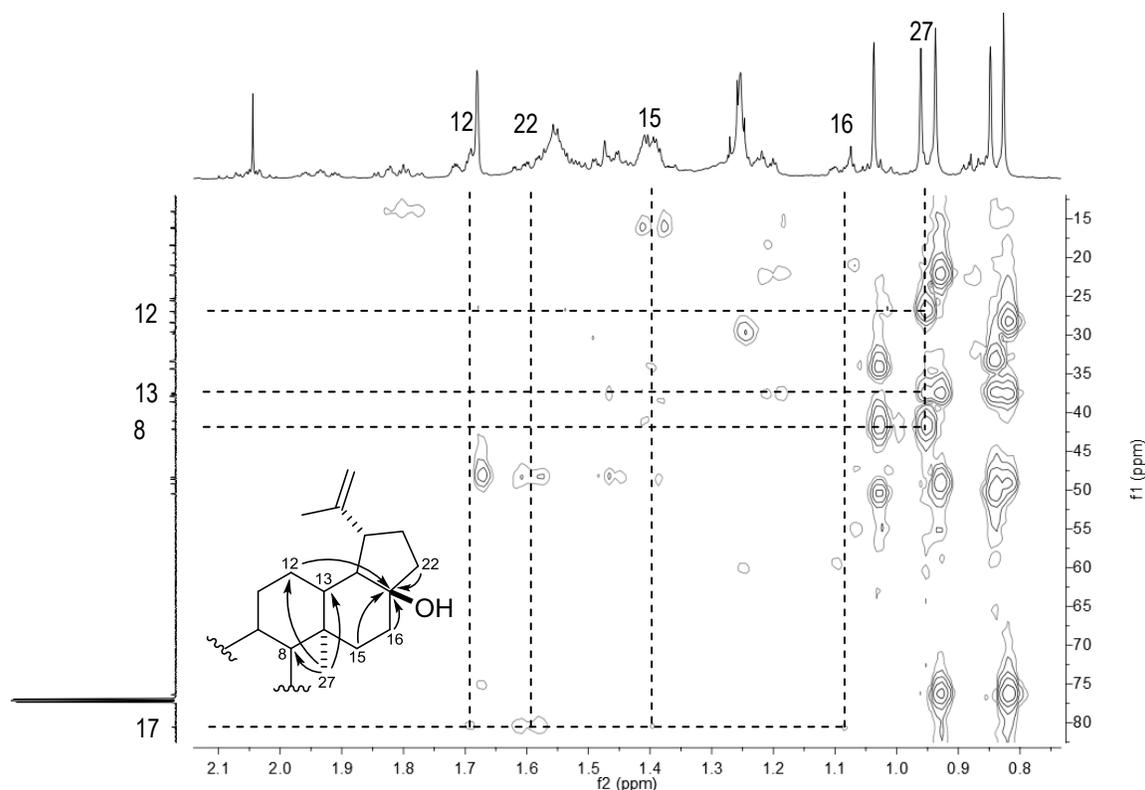


Figura 2.76 Ampliación del espectro HMBC del compuesto **XII**.

Por último, la orientación del grupo oxhidrilo en el C-17 no se puede establecer de manera explícita, debido a que no posee protones detectables para poder ser visualizados por medio de un experimento NOESY; sin embargo, se observó un cambio significativo en el desplazamiento químico al comparar los carbonos en posición 13, cuando la orientación del sustituyente en el C-17 es α ($\delta \sim 44.0$) (Abdel Bar *et al.*, 2008; Shiojima *et al.*, 1994) y cuando estos se encuentran en orientación β ($\delta \sim 38.0$) (Du *et al.*, 2009; Ching-Kuo, 1998). Otra evidencia importante es el desplazamiento peculiar del H-19 a δ 2.60 (ddd, $J = 10.8, 10.8, 6.1$ Hz), el cual fue determinado con orientación β , por medio del experimento ROESY (Figura 2.77), observando las correlaciones de H-19 con H-13 (δ 1.82), H-21 (δ 2.05) y H-29 (δ 4.73), y adicionalmente observando los siguientes acoplamientos: H-29/H-18, H-29/H-30; esto es importante debido a que la presencia de oxígeno, como es el caso del grupo OH en el C-17, afecta el desplazamiento químico de H $_{\beta}$ -19, como se puede ver en la literatura al comparar la sustitución en el C-17 cuando la orientación es α , el H $_{\beta}$ -19 se observa a δ 2.34 (ddd, $J = 8.1, 7.7, 3.7$ Hz), mientras que cuando el sustituyente se

encuentra en orientación β , H_{β} -19 se observa a δ 2.57 (ddd, $J = 10.6, 10.4, 5.9$ Hz) (Abdel Bar *et al.* 2008). Dado estas evidencias, se pudo identificar al compuesto **XII** como 28-norlup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol (Figura 2.78, Cuadro 2.10), siendo este el segundo aislamiento de este metabolito, ya que fue aislado anteriormente de los tallos de *Perrottetia arisanensis* (Du *et al.*, 2009), y éste es el primer reporte en *P. vernicosum*.

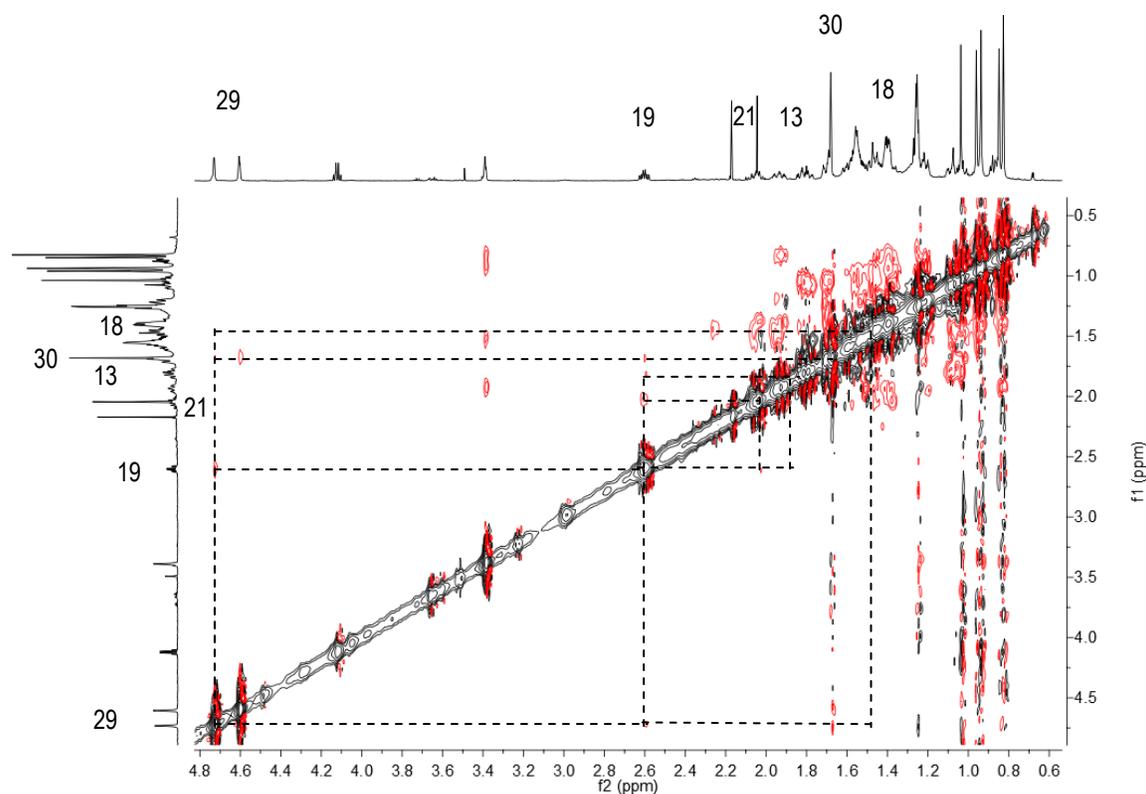


Figura 2.77 Espectro ROESY del compuesto **XII**.

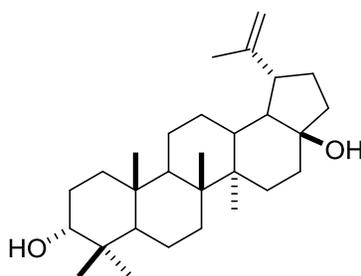


Figura 2.78 Estructura del compuesto **XII** (28-norlup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol) (Du *et al.*, 2009).

Cuadro 2.10 Asignación completa de los datos espectroscópicos de RMN-¹H (600 MHz) y -¹³C (150 MHz) determinado en CDCl₃ del compuesto **XII**.

Posición	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	Posición	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
1	1.60 (m), 1.47 (m)	33.5	16	1.79 (m), 1.09 (m)	27.0
2	1.93 (m), 1.53 (m)	25.6	17	---	80.6
3	3.39, (pt, <i>J</i> = 2.9 Hz)	76.4	18	1.47 (m)	48.6
4	---	37.9	19	2.60 (ddd, <i>J</i> = 10.8, 10.8, 6.1 Hz)	48.3
5	1.20 (m)	49.2	20	---	150.2
6	1.39 (m), 1.36 (m)	18.4	21	2.05 (m), 1.40 (m)	29.6
7	1.43 (m), 1.39 (m)	34.4	22	1.60 (m), 1.48 (m)	38.6
8	---	41.1	23	0.94 (s)	28.4
9	1.39 (m)	50.5	24	0.83 (s)	22.3
10	---	37.5	25	0.85 (s)	16.3
11	1.45 (m), 1.23 (m)	21.0	26	1.04 (s)	16.2
12	1.93 (m), 1.69 (m)	25.3	27	0.96 (s)	14.1
13	1.82 (m)	37.7	28	---	---
14	---	42.2	29	4.73 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz), 4.61 (dd, <i>J</i> = 2.3, 1.4 Hz)	109.9
15	1.39 (m), 1.24 (m)	29.9	30	1.68 (s)	19.4

3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano (**XIII**) y 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo (**XIV**)

Los compuestos **XIII** y **XIV** se obtuvieron por separado, y cada uno con apariencia aceitosa de color transparente, solubles en CH₂Cl₂, resultando ser el isobutirato de 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano y el isobutirato de 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo, respectivamente (Figura 2.79).

Estos compuestos son conocidos comúnmente como texanol o 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol monoisobutirato, utilizado en la industria como agente coalescente para las pinturas de látex (Eastman Chemical Products, 1962). Este se comercializa como una mezcla de isómeros *R* y *S* con el alcohol secundario (Figura 2.79A) y de la mezcla de isómeros *R* y *S* del compuesto con el alcohol primario (Figura 2.79B).

El compuesto **XIV** ha sido reportado previamente por García-Cámara (2014), sin embargo, debido a su origen sintético, es probable que haya sido obtenido debido a contaminación del material vegetal. Es necesario realizar más estudios para aclarar la procedencia de este compuesto.

En la figura 2.79 se muestran los espectros de RMN-¹H de los dos isómeros.

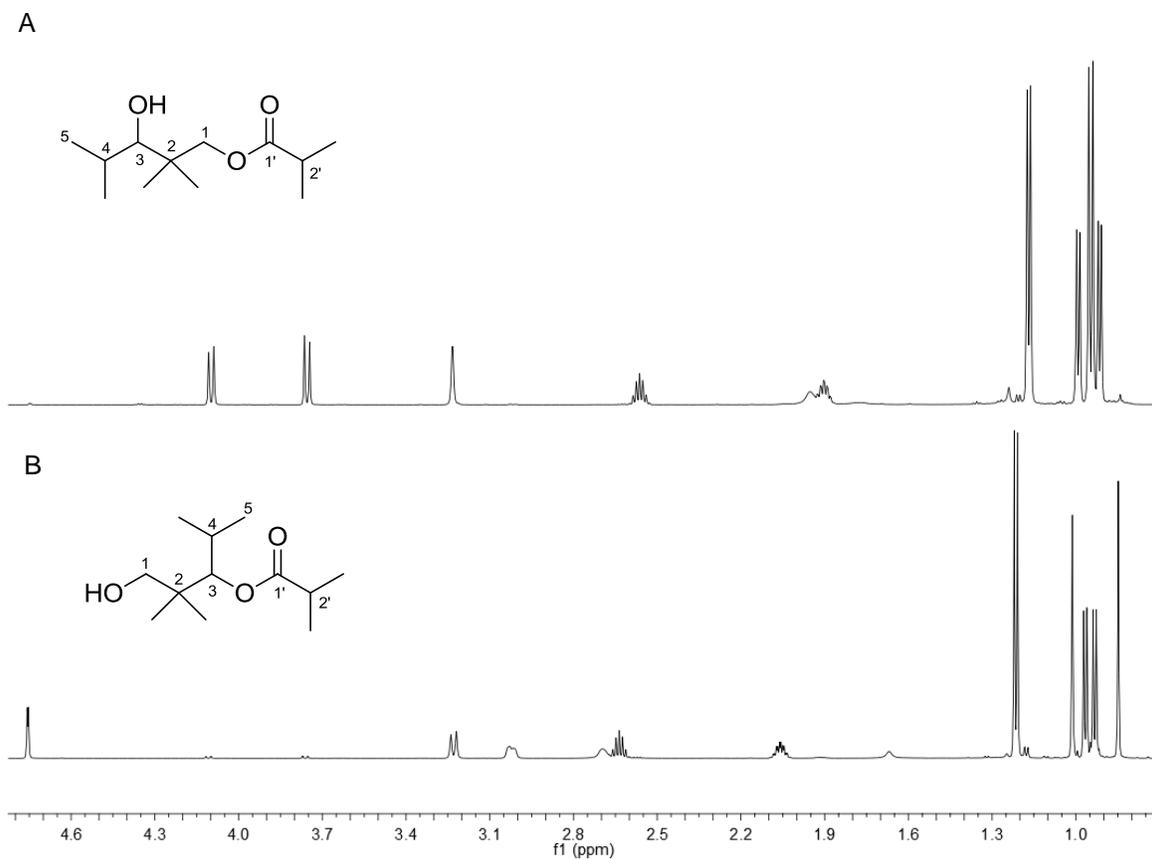


Figura 2.79 Espectros de RMN-¹H del compuesto **XIII** (A) y compuesto **XIV** (B) en CDCl₃ a 600 MHz.

2-metilpentano-2,3,4-triol (**XV**) y 2-metilpentano-2,3,4-triol (**XVI**)

Los compuestos **XV** y **XVI** se obtuvieron por separado, y cada uno con apariencia aceitosa de color transparente, solubles en CH₂Cl₂, e identificado cada uno como un diastereómero de 2-metilpentano-2,3,4-triol (Figura 2.80).

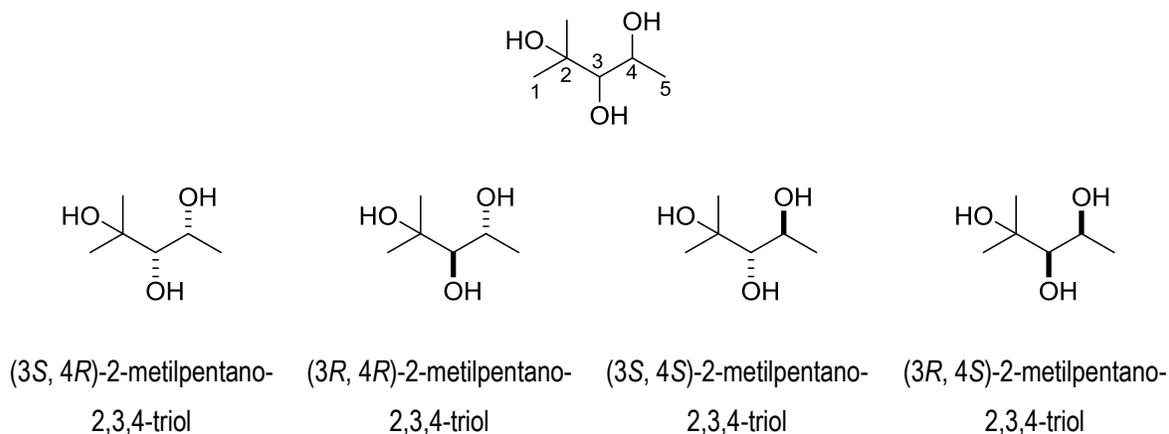


Figura 2.80 Estructuras posibles para los compuestos **XV** y **XVI** (2-metilpentano-2,3,4-triol).

El compuesto **XV** ha sido reportado previamente por García-Cámara (2014), observándose en el espectro de RMN-¹H (Figura 2.81) una señal cuádruple de dobles a δ 3.92 ($J = 6.0, 0.6$ Hz) correspondiente al protón del metino de H-4; a δ 3.30 una señal doble de dobles ($J = 6.0, 0.6$ Hz, H-3); por último, en la región de metilos se observó una señal doble a δ 1.31 ($J = 6.0$ Hz) y dos señales simples a δ 1.30 y 1.27. Este compuesto fue comparado con el compuesto **XVI** por su espectro de RMN-¹H (Figura 2.82), observándose señales similares; a δ 4.21 se observó una señal cuádruple ($J = 6.0$ Hz); una señal simple ancha a δ 3.01, correspondiente a un metino base de grupo oxhidrilo; a δ 1.31 y 1.30 mostró la presencia de dos señales simples integrando cada una para tres protones; por último, a δ 1.28 ($J = 6.6$ Hz) se observó una señal doble correspondiente a un metilo. Debido a las señales observadas en ambos espectros se pudo determinar que las conectividades son iguales, haciendo una diferencia en las multiplicidades y desplazamientos, indicando de esta manera que el compuesto **XV** y **XVI** son diastereómeros; sin embargo, por la información espectroscópica no se puede determinar su configuración relativa ni absoluta.

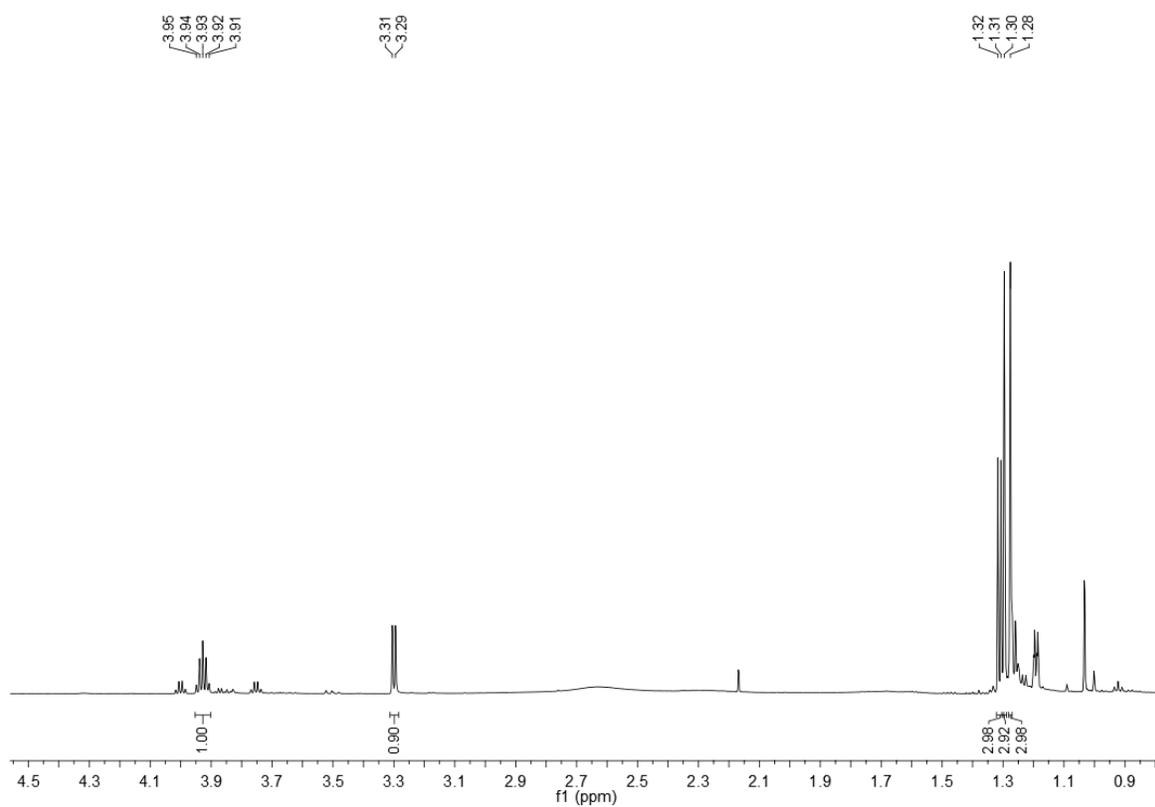


Figura 2.81 Ampliación del espectro de RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **XV** en CDCl_3 .

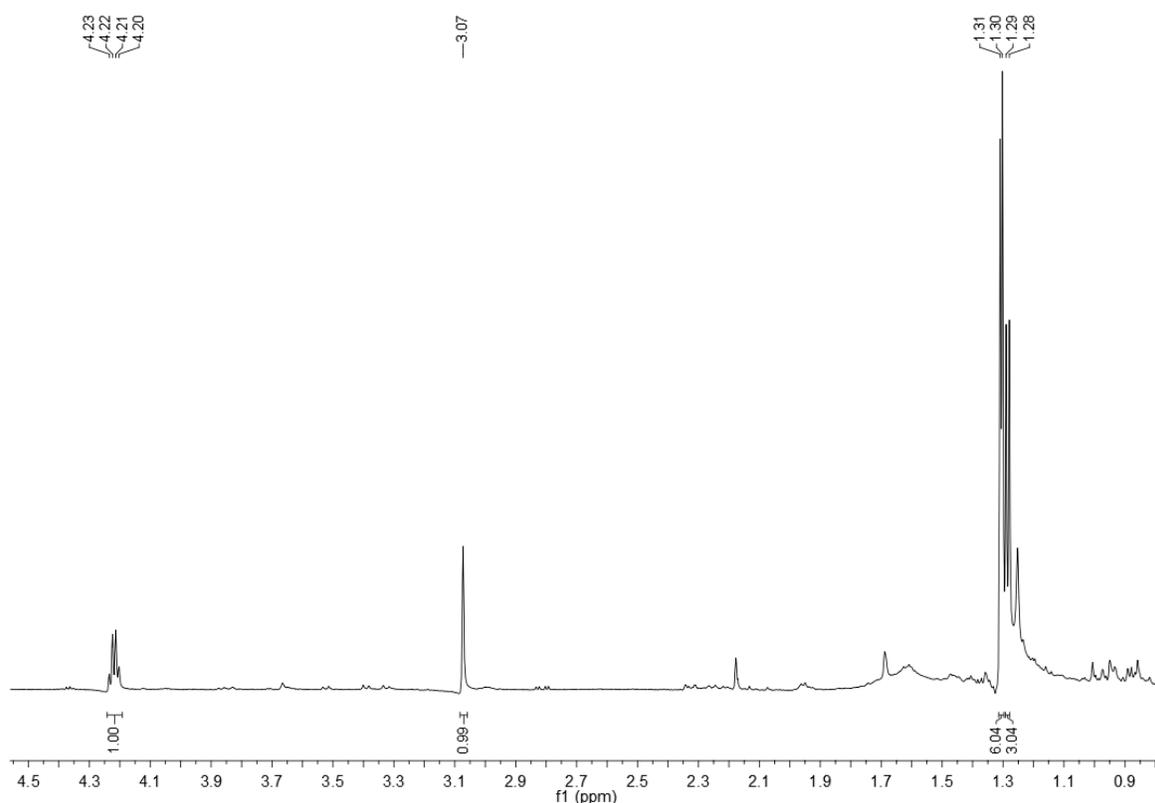


Figura 2.82 Ampliación del espectro de RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **XVI** en CDCl_3 .

En la Figura 2.83 se muestra la comparación de los espectros de RMN- ^1H y en la Figura 2.84 la comparación de los espectros de RMN- ^{13}C , en donde se puede observar para el compuesto **XV** (Figura 2.83 A) seis señales, de las cuales, tres señales corresponden a carbonos unidos a oxhidrilos (δ 80.0, 73.4 y 69.3) y tres señales a grupos metilo (δ 26.8, 25.8 y 20.3); en contraste, en el espectro de RMN- ^{13}C de **XVI** (Figura 2.84 B) se observaron de igual forma seis señales, tres correspondientes a carbonos unidos a grupos oxhidrilo (δ 77.9, 74.3 y 67.4) y tres señales de metilos (δ 27.6, 26.3 y 20.8), siendo el mismo número de señales, pero con diferente desplazamiento químico.

En la Cuadro 2.11 se hace una comparación de los datos espectroscópicos del compuesto **XV**, **XVI** y 2-metilpentano-2,3,4-triol aislado por García-Cámara (2014).

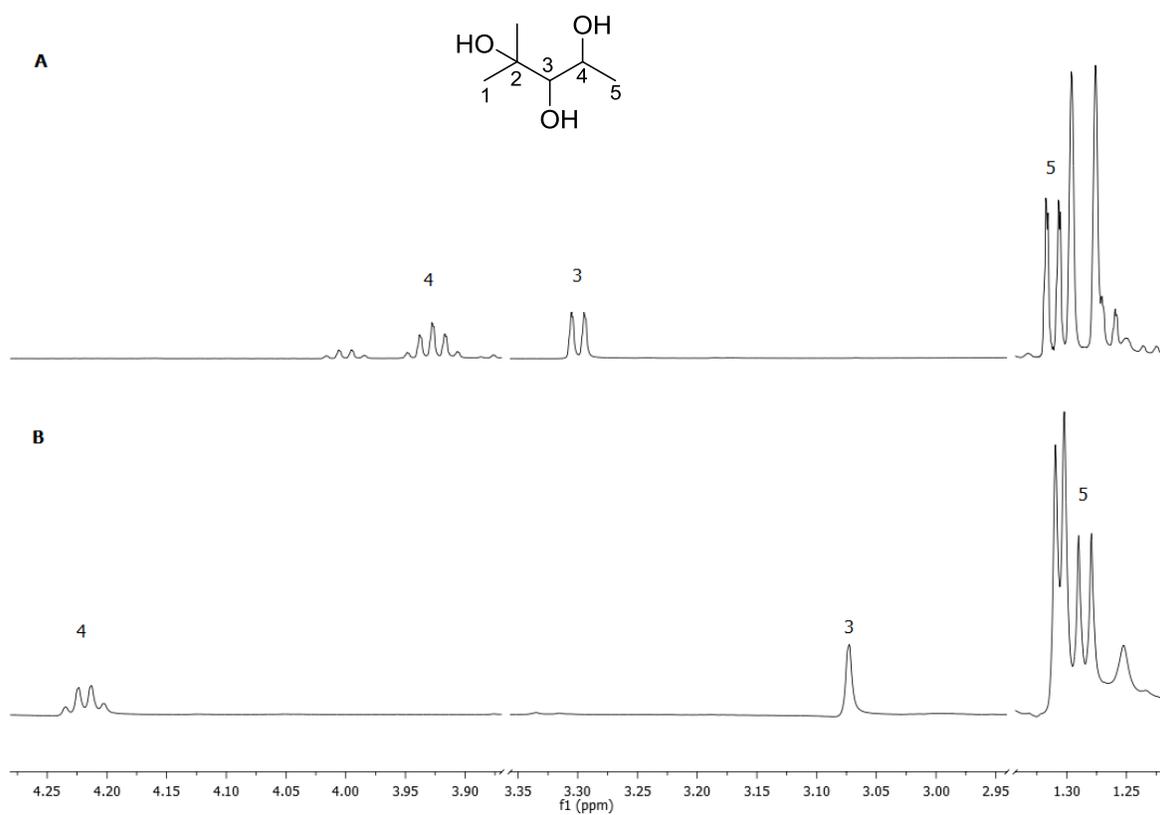


Figura 2.83 Comparación de los espectros por RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **XV** (A) y el compuesto **XVI** (B) en CDCl_3 .

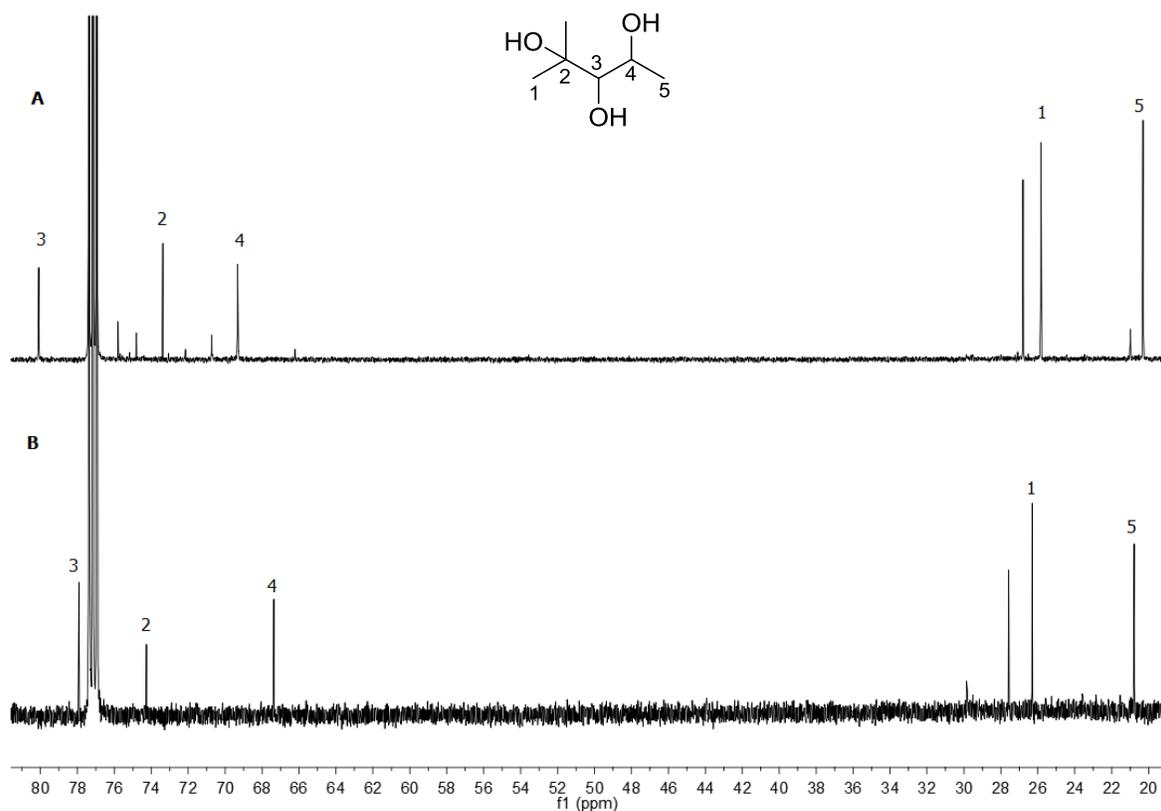


Figura 2.84 Comparación de los espectros por RMN- ^{13}C (150 MHz) del compuesto **XV** (A) y el compuesto **XVI** (B) en CDCl_3 .

Cuadro 2.11 Comparación de los datos espectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y RMN- ^{13}C (150 MHz) determinado en CDCl_3 del compuesto **XV**, **XVI** con los de 2-metilpentano-2,3,4-triol.

Posición	Compuesto XV		Compuesto XVI		2-metilpentano-2,3,4-triol	
	δ ^1H (m)	δ ^{13}C	δ ^1H (m)	δ ^{13}C	δ ^1H (m)	δ ^{13}C
1	1.30 (s)	25.8	1.31 (s)	26.3	1.30 (s)	25.7
2	---	73.4	---	74.3	---	73.2
3	3.30 (dd, $J = 6.0$, 0.6 Hz)	80.0	3.31 (s)	77.9	3.31 (m, $J = 6.6$ Hz)	79.9
4	3.92 (cd, $J = 6.0$, 0.6 Hz)	69.3	4.21 (c, $J = 6.0$ Hz)	67.4	3.93 (m, $J = 6.6$ Hz)	69.2
5	1.31 (d, $J = 6.0$ Hz)	20.3	1.28 (d, $J = 6.6$ Hz)	20.8	1.31 (d, $J = 6.6$ Hz)	20.1
6	1.27 (s)	26.8	1.30 (s)	27.6	1.28 (s)	26.6

Estos compuestos pudieran estar presentes en la planta debido a la modificación estructural derivada de un polialcohol, tales como arabitol, ribitol, xilitol, por mencionar algunos, debido a la reducción en los carbonos 1 y 2 y la introducción de un grupo metilo

por medio de SAM (Dewick, 2002). Estos compuestos no han sido reportados previamente en la literatura.

2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (XVII)

El compuesto **XVII** se obtuvo como un sólido de apariencia viscosa de color blanco, soluble en CH_2Cl_2 y $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, el cual fue identificado como 2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (Figura 2.85), y ha sido aislado anteriormente de las partes aéreas de *Vernonia chalybaea* (Da Costa *et al.*, 2008).

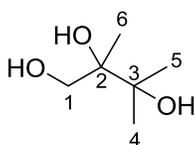


Figura 2.85 Estructura del compuesto **XVII** (2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol) (Da Costa *et al.*, 2008).

El compuesto **XVII** fue identificado por medio del espectro de RMN- ^1H (Figura 2.86) en el cual a δ 3.85 y 3.84 se observaron dos señales dobles ($J = 12.4$ Hz), cuya integral pertenece a un protón, correspondientes a dos hidrógenos de un mismo carbono de un grupo metileno, y tres señales simples a δ 1.27, 1.26 y 1.20 cada una integrando para tres protones, correspondiente a tres grupos metilo. Por otra parte, en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.87) se observaron cuatro señales, las cuales indican la presencia de carbonos unidos a grupos oxhidrilos (δ 75.3 y 73.2), y dos señales a δ 18.4 y 18.0 correspondientes cada una a un grupo metilo.

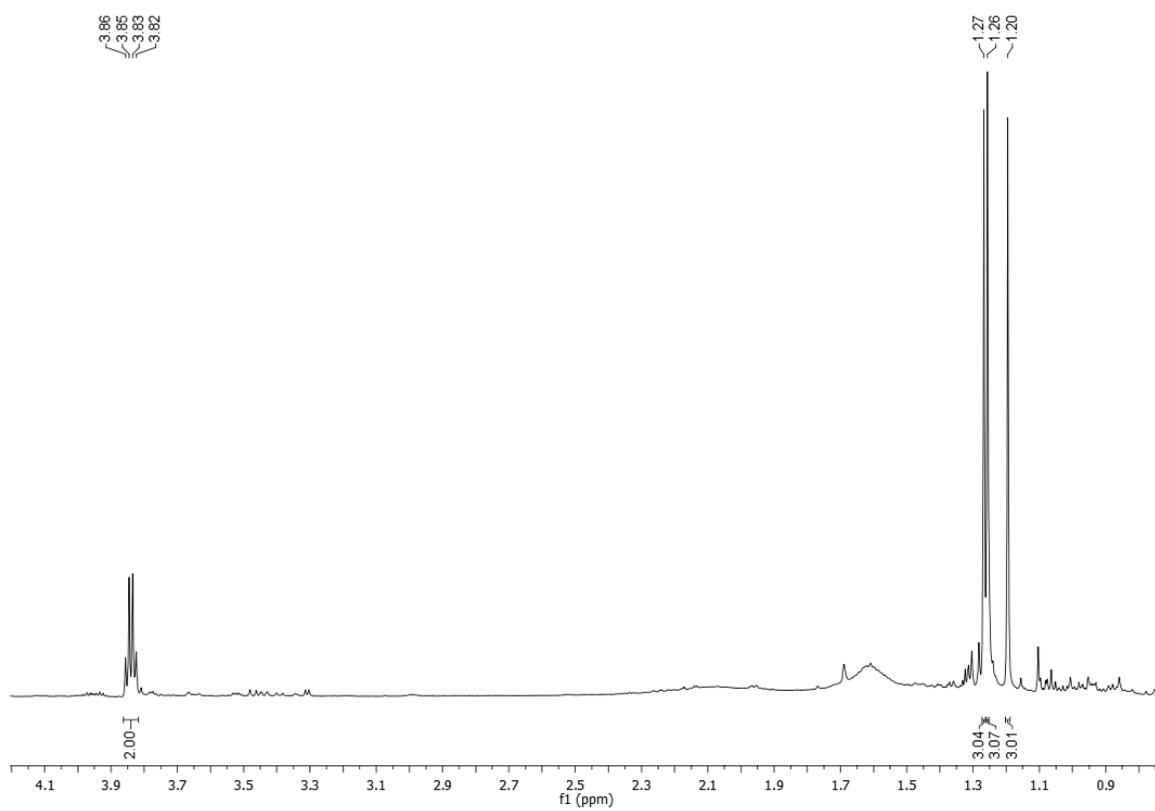


Figura 2.86 Ampliación del espectro de RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **XVII** en CDCl_3 .

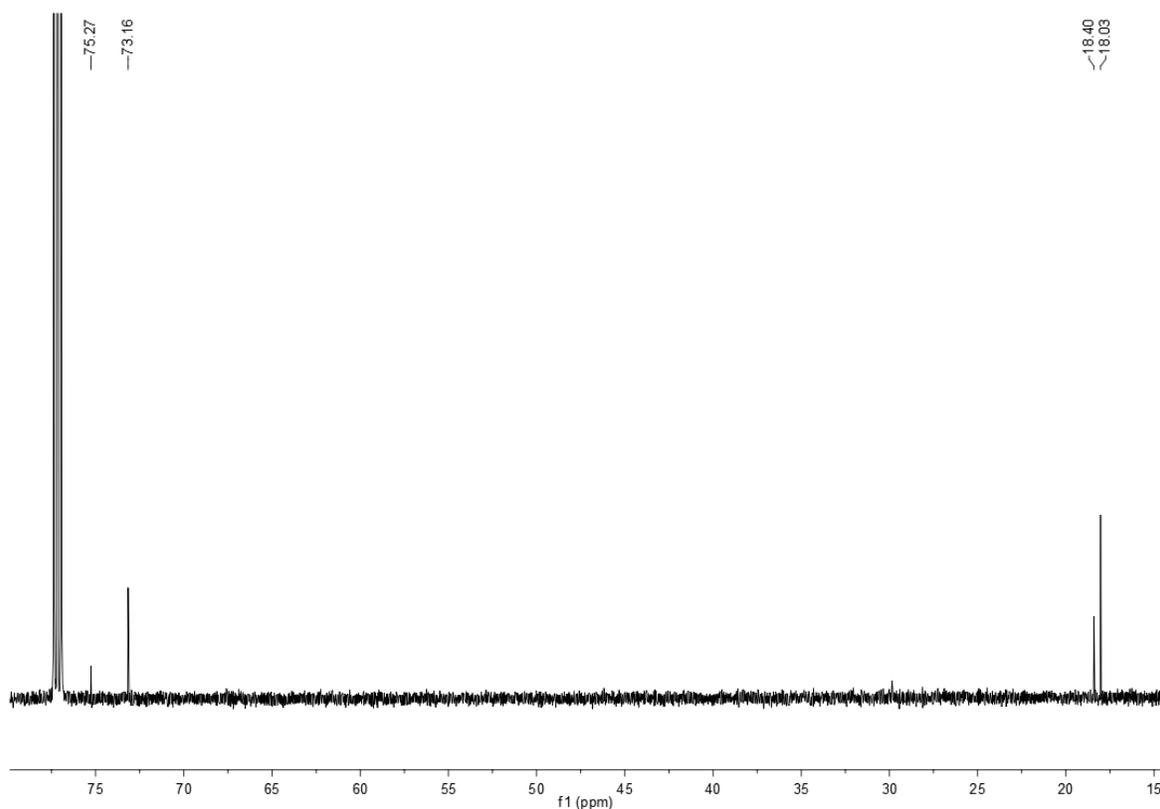


Figura 2.87 Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (150 MHz) del compuesto **XVII** en CDCl_3 .

Estas señales fueron comparadas con lo reportado en la literatura, las cuales se muestran en la Cuadro 2.12 (Da Costa *et al.*, 2008).

Cuadro 2.12 Comparación de los datos espectroscópicos de RMN- ^1H (600 MHz) y RMN- ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 del compuesto **XVII** con los de 2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol en An-d_6 .

Posición	Compuesto XVII		2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol	
	δ ^1H (m)	δ ^{13}C	δ ^1H (m)	δ ^{13}C
1	3.85 (d, $J = 12.4$ Hz), 3.83 (d, $J = 12.4$ Hz)	73.2*	3.71 (dd, $J = 10.8, 4.1$ Hz), 3.51 (dd, $J = 10.8, 5.9$ Hz)	68.4
2	---	73.2*	---	75.5
3	---	75.3*	---	75.8
4	1.27 (s)*	18.4*	1.21 (s)	25.6
5	1.26 (s)*	18.0*	1.20 (s)	25.4
6	1.20 (s)*	18.0*	1.12 (s)	20.5

*Señales intercambiables.

Lupeol (XVIII)

El compuesto **XVIII** se obtuvo como un sólido cristalino en forma de agujas y éste fue identificado como lupeol por medio de CG-EM (Figura 2.88), a un t_R de 19.26 min y obteniendo un porcentaje de coincidencia del 98% comparado con la base de datos del equipo.

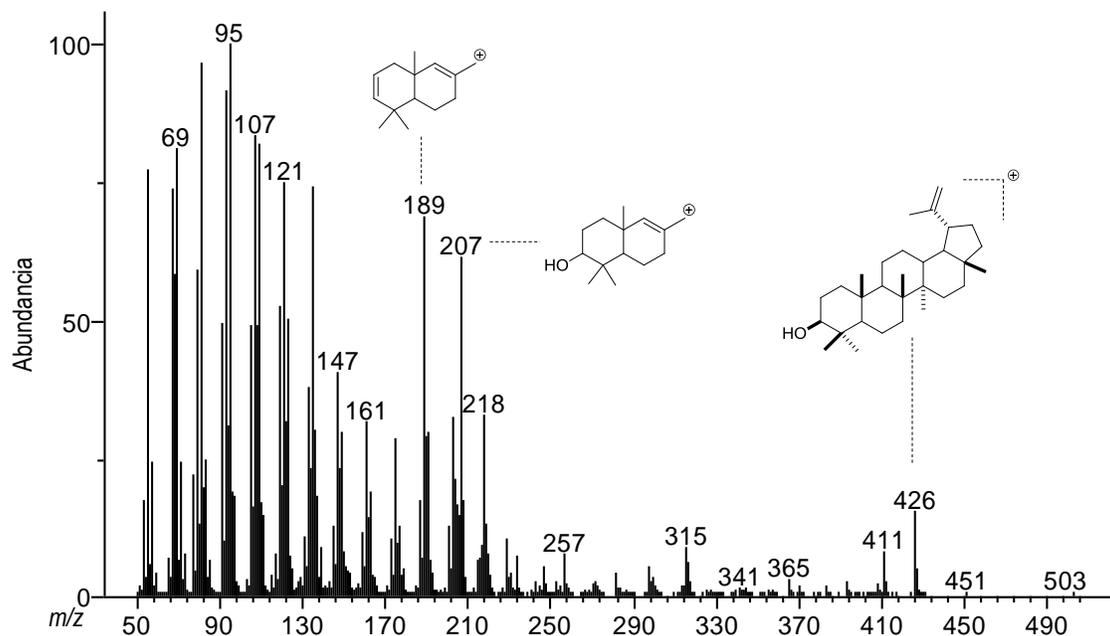


Figura 2.88 Espectro de masas del compuesto **XVIII**.

28-O-acetil-betulona (XIX)

El compuesto **XIX** fue aislado como un sólido de apariencia cristalina de color blanco, obteniéndose 7.5 mg. En el espectro de RMN- ^1H (Figura 2.89) se observaron señales características de un triterpeno de esqueleto lupano, en donde se observa las señales de los protones en posición H-29 a δ 4.91 y 4.78; de igual manera a δ 4.52 ($J = 12$ Hz) y 4.10 ($J = 12$ Hz) se observó la presencia de dos señales dobles características de los protones de un grupo metileno unido a un heteroátomo; adicionalmente, en la región de metilos se observó la presencia de siete señales simples (δ 2.14, 1.76, 1.15, 1.06, 1.02, 1.00 y 0.88), de las cuales se pudo ver la presencia de un metilo característico de un grupo acetilo (δ

2.14), indicando así que el compuesto **XIX** posee en su estructura un grupo acetilo; igualmente, se observó la presencia de señales características de metilenos α a carbonilo (δ 2.54 – 2.50) y la ausencia de un protón base de grupo oxhidrilo en posición 3.

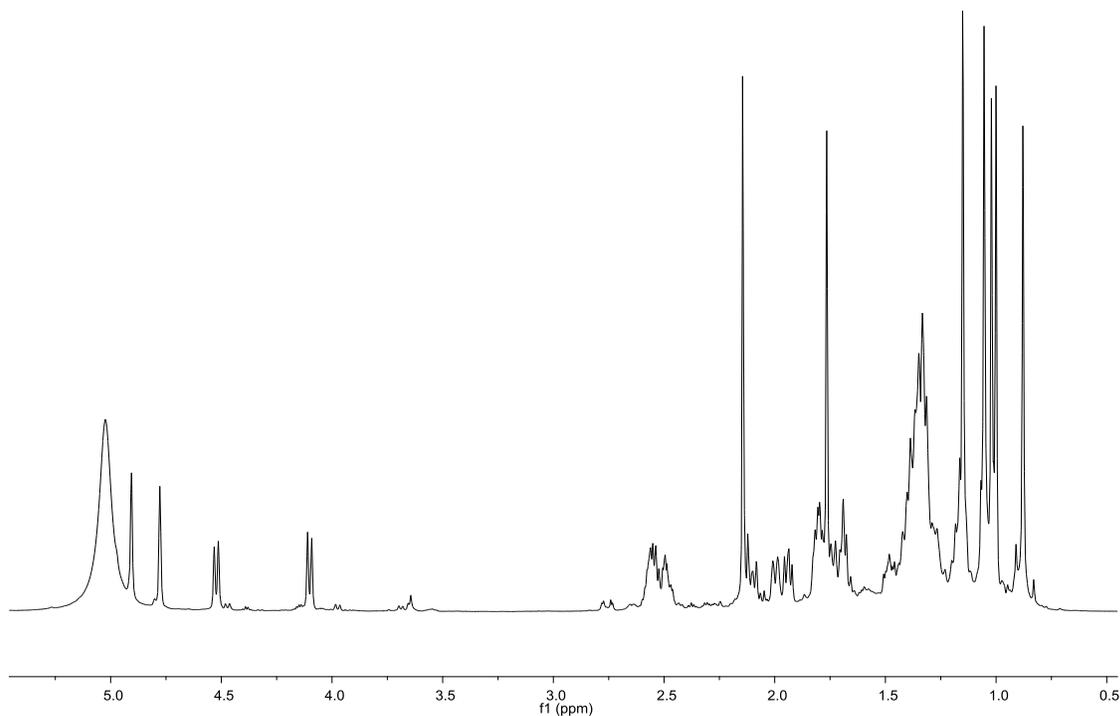


Figura 2.89 Ampliación del espectro de RMN-¹H del compuesto **XIX** en piridina-*d*₅ a 600 MHz.

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.90) se observó un total de 32 señales: a δ 217.0 una señal de cetona; a δ 171.7 una señal de carbonilo de grupo éster; dos señales de los C-20 y C-29 a δ 151.0 y 110.8, respectivamente; y una señal a δ 63.2 correspondiente a un carbono unido a oxígeno. Las señales observadas en ambos espectros indicaron que el compuesto posee en su estructura un grupo acetilo y un grupo cetona, posiblemente en posición 3.

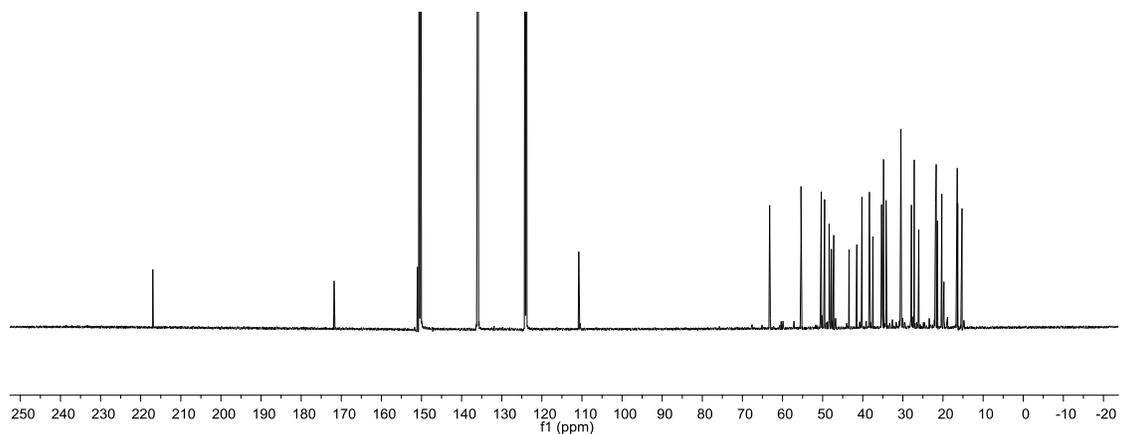


Figura 2.90 Espectro de RMN-¹³C del compuesto **XIX** en piridina-*d*₅ a 150 MHz.

Se determinó que en el carbono en posición 3 se encuentra un grupo cetona, esto debido a que se observó acoplamiento en el experimento HMBC (Figura 2.91) entre las señales de los protones H-2 (δ 2.54, 2.50), H-1 (δ 1.80, 1.35) y los CH₃-23, 24 y 25 (δ 1.15, 1.06 y 1.02) con la señal de la cetona a δ 217.0.

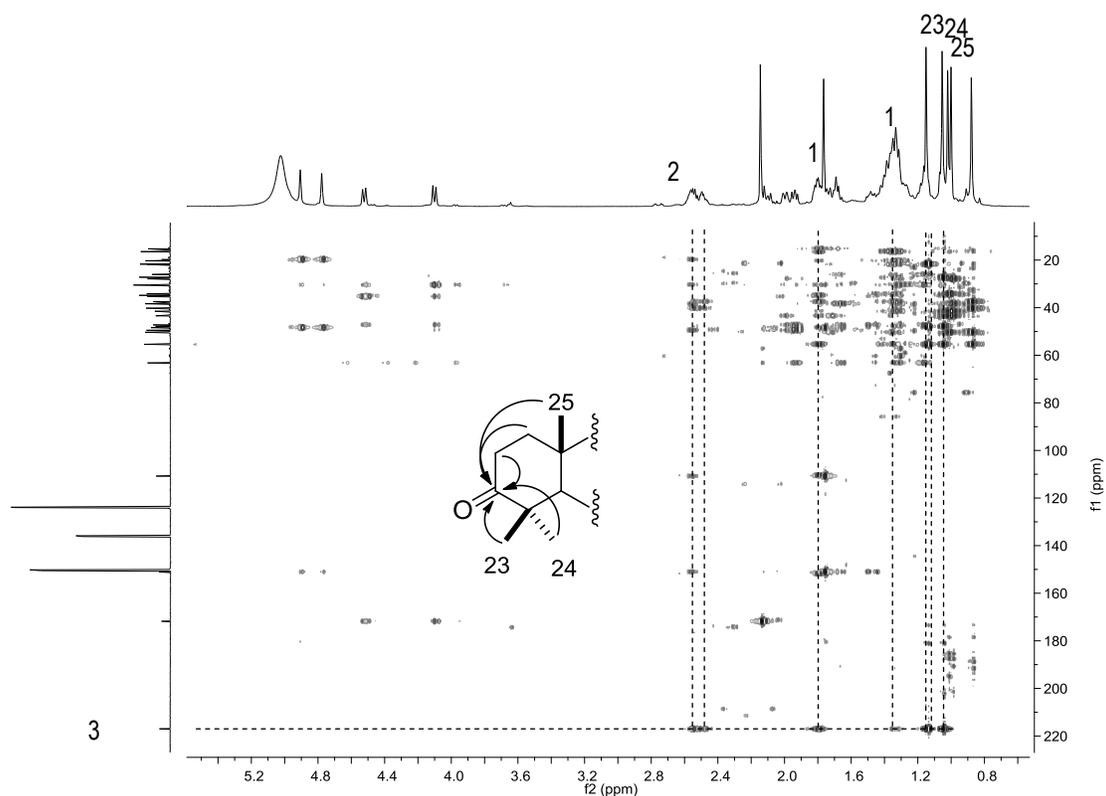


Figura 2.91 Experimento HMBC del compuesto XIX en piridina- d_5 .

De igual manera, gracias al experimento HMBC se pudo determinar la posición del grupo acetilo, observando que éste se encuentra unido al oximetileno (δ 4.52, 4.10), ya que se observó el acoplamiento entre los protones del oximetileno con C-19 (δ 47.9), C-22 (δ 34.8) y C-21 (δ 30.5), a su vez se observaron los siguientes acoplamientos; entre el metilo del grupo acetilo (δ 2.14) con el carbono a δ 63.2 del grupo oximetileno, así como el H-22 (δ 1.95, 1.19), H-18 (δ 1.69) y H-21 (δ 1.34) con el C-28 (δ 63.2) (Figura 2.92), determinándose la posición del grupo oximetileno en posición 28; adicionalmente, se corroboró el acoplamiento entre los protones H-28 con el H-22 y H-21, en el experimento COSY (Figura 2.93).

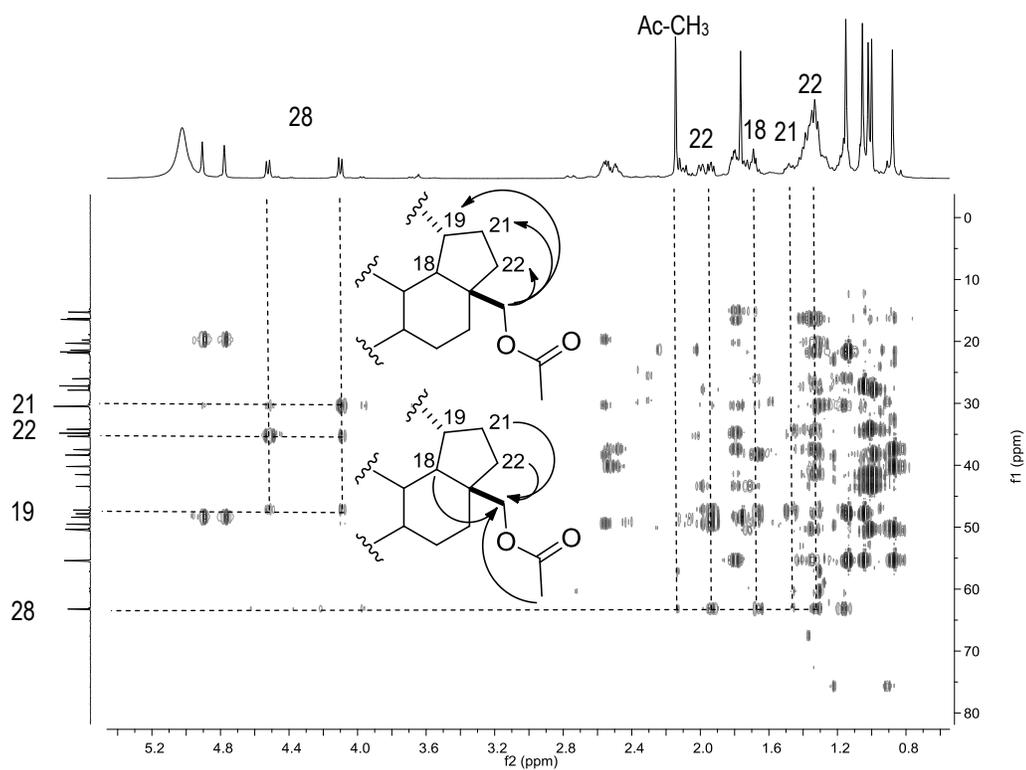


Figura 2.92 Ampliación del experimento HMBC del compuesto XIX en piridina- d_5 .

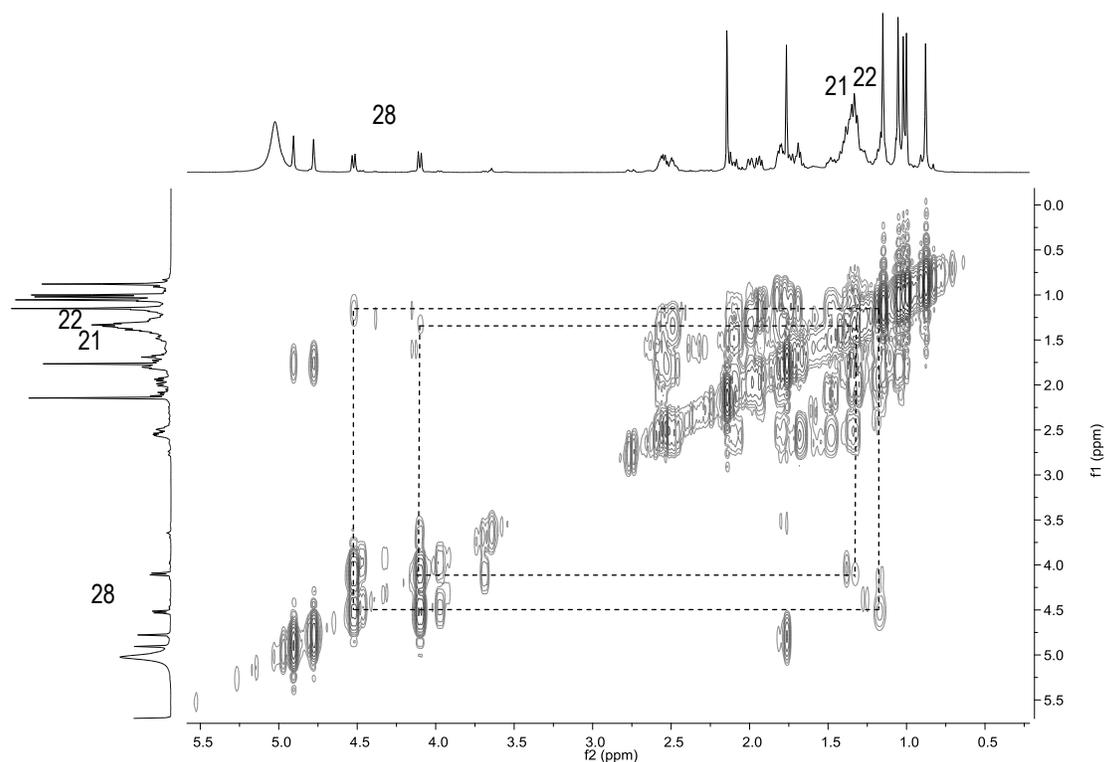


Figura 2.93 Ampliación del experimento COSY del compuesto **XIX** en piridina- d_5 .

Debido a los datos espectroscópicos observados se determinó que el compuesto **XIX** corresponde a la 28-*O*-acetil-betulona (Figura 2.94), siendo éste el primer reporte de este compuesto en la naturaleza, ya que los reportes de la 28-*O*-acetil-betulona son originados de la derivatización de lupanos (Wiemann *et al.*, 2015; Pettit *et al.*, 2014; Alakurtii *et al.*, 2010; Salin *et al.* 2010; Pohjala *et al.*, 2009; Korovin y Tkachev, 2001). En la Cuadro 2.13 se realiza a asignación completa del compuesto **XIX** y su comparación con los datos reportados en la literatura (Korovin y Tkachev, 2001).

Cuadro 2.13 Comparación de los datos espectroscópicos de RMN-¹H (600 MHz) y -¹³C (150 MHz) determinado en piridina-*d*₅ del compuesto **XIX** con los del 28-*O*-acetil-betulona en CDCl₃.

Posición	Compuesto XIX		28- <i>O</i> -acetil-betulona (Korovin y Tkachev, 2001)	
	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C	δ ¹ H (m)	δ ¹³ C
1	1.80 (dd, <i>J</i> = 11.4, 6.6 Hz), 1.35	40.1	1.86, 1.35	39.5
2	2.54 (dd, <i>J</i> = 6.6, 4.2 Hz) 2.50 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz)	34.6	2.45, 2.37	33.9
3	---	217.0	---	217.6
4	---	48.4	---	47.2
5	1.34	55.4	1.28	54.9
6	1.39	19.7	1.45	19.5
7	1.37	34.2	1.41	33.4
8	---	41.4	---	40.8
9	1.36	50.4	1.35	49.7
10	---	35.3	---	36.7
11	1.33	21.7	1.30, 1.41	21.2
12	1.72	26.0	1.04, 1.30	25.2
13	1.71	38.2	1.68	37.6
14	---	43.3	---	42.7
15	1.03	27.2	1.04, 1.67	27.0
16	1.76	27.9	1.23, 1.83	29.6
17	---	47.2	---	46.2
18	1.69	49.3	1.59	48.7
19	2.58	47.9	2.42	47.6
20	---	151.0	---	149.9
21	2.00, 1.34	30.5	1.38, 1.95	29.5
22	1.95, 1.19	34.8	1.06, 1.76	34.4
23	1.15 (s)	26.8	1.04 (s)	26.5
24	1.06 (s)	21.4	1.00 (s)	20.9
25	1.02 (s)	16.1	0.91 (s)	15.7
26	0.88 (s)	16.3	1.05 (s)	15.7
27	1.00 (s)	15.2	0.96 (s)	14.6
28	4.25 (d, <i>J</i> = 12 Hz), 4.10 (d, <i>J</i> = 12 Hz)	63.2	4.26 (d, <i>J</i> = 11 Hz), 3.84 (d, <i>J</i> = 11 Hz)	62.6
29	4.91 (s), 4.78 (s)	110.8	4.67 (s), 4.57(s)	109.8
30	1.76 (s)	18.8	1.66 (s)	19.0
31	---	171.1	---	171.3
32	2.14 (s)	21.4	2.04	20.8

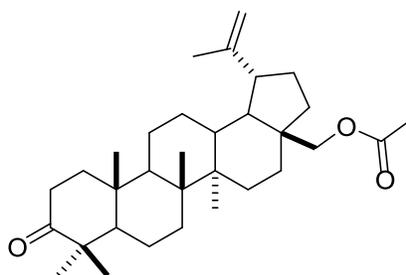


Figura 2.94. Estructura del compuesto **XIX** (28-O-acetil-betulona) (Korovin y Tkachev, 2001).

Naringenina (**XX**)

El compuesto **XX** se obtuvo como un sólido de color amarillo soluble en acetona, obteniéndose 5.4 mg. En el espectro de RMN-¹H (Figura 2.95) se observaron señales características de un flavonoide de tipo flavanona, esto debido a la presencia de una señal a δ 12.16 correspondiente a un protón de grupo hidroxilo que se encuentra quelatado; en la región de protones aromáticos se observaron cuatro señales dobles a δ 7.37 ($J = 8.4$ Hz), δ 6.88 ($J = 8.4$ Hz), δ 5.94 ($J = 1.8$ Hz) y δ 5.93 ($J = 1.8$ Hz), lo cual indica, por las constantes de acoplamiento, que los protones se encuentran en posición *orto* y *meta*, respectivamente; por otro lado, se observaron tres señales doble de dobles a δ 5.44 ($J = 12.6, 1.8$ Hz), δ 3.16 ($J = 16.8, 12.6$ Hz) y δ 2.71 ($J = 16.8, 3.0$ Hz); debido a los datos espectroscópicos obtenidos se identificó al compuesto **XX** como naringenina (Figuras 2.96, 2.97). En el Cuadro 2.14 se muestra la comparación de las señales espectroscópicas del compuesto **XX** con las reportadas en la literatura (Maltese *et al.*, 2009).

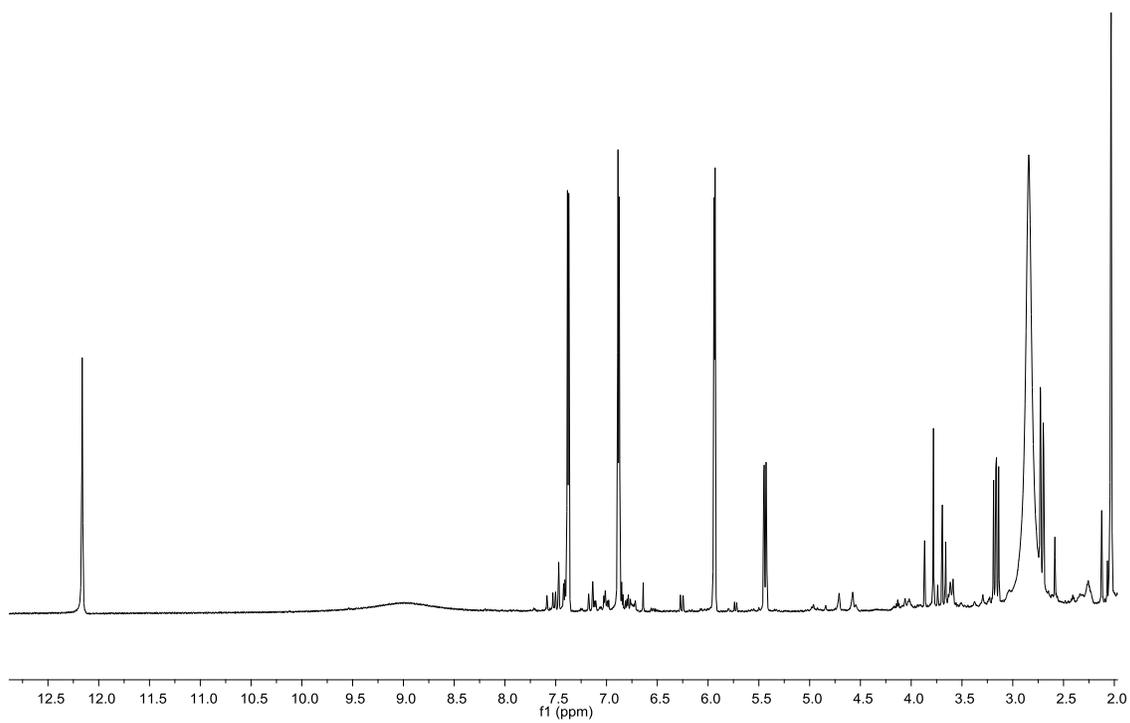


Figura 2.95 Espectro de RMN- ^1H del compuesto **XX** en $\text{An-}d_6$ a 600 MHz.

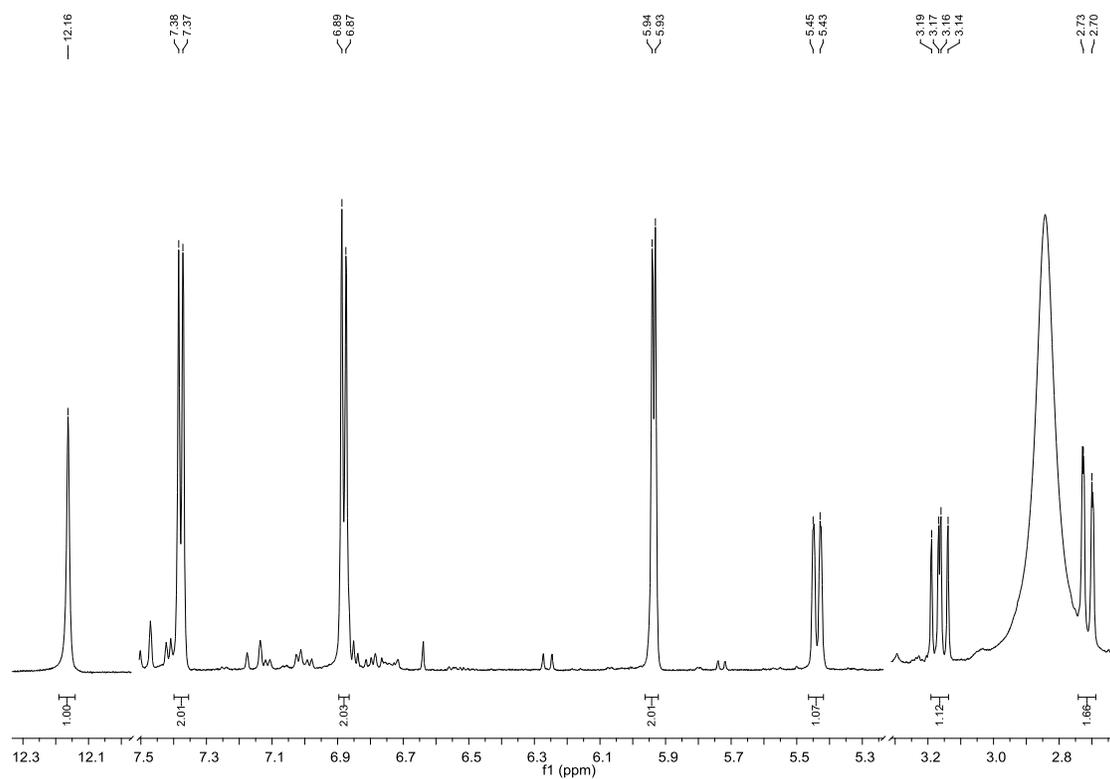


Figura 2.96 Ampliación del espectro de RMN-¹H del compuesto **XX** en An-d₆ a 600 MHz.

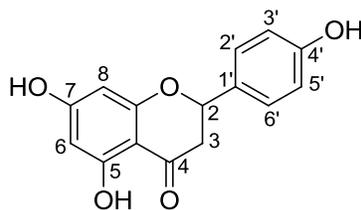


Figura 2.97 Estructura del compuesto **XX** (naringenina) (Maltese *et al.*, 2009).

Cuadro 2.14 Comparación de los datos espectroscópicos de RMN-¹H (600 MHz) determinado en An-*d*₆ del compuesto **XX** con los de la naringenina en CD₃OD:D₂O (1:1).

Posición	Compuesto XX	Naringenina
	δ ¹ H (m)	δ ¹ H (m)
2	5.44 (dd, <i>J</i> = 12.6, 1.8 Hz)	5.47 (dd, <i>J</i> = 12.6, 2.7 Hz)
3_{ax}	2.71 (dd, <i>J</i> = 16.8, 3.0 Hz)	2.71 (dd, <i>J</i> = 17.0, 3.0 Hz)
3_{eq}	3.16 (dd, <i>J</i> = 16.8, 12.6 Hz)	3.30 (dd, <i>J</i> = 17.0, 12.9 Hz)
6	5.93 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	5.91 (s)
8	5.94 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	5.91 (s)
2'	7.37 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	7.35 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz)
3'	6.88 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	6.82 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
5'	6.88 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	6.82 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
6'	7.37 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	7.35 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz)

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS TUMORALES DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Phoradendron vernicosum*

3.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se están llevando a cabo investigaciones químicas en plantas superiores de las cuales se tiene registro de algún uso etnobotánico. De manera particular, la medicina tradicional maya cuenta con al menos 800 especies de plantas descritas, las cuales podrían proveer nuevos fármacos anticancerígenos. Por lo tanto, dichas plantas son sometidas a estudios fitoquímicos, de los cuales los metabolitos aislados son posteriormente evaluados frente a diversas líneas celulares de cáncer.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Procedimientos generales

Los bioensayos fueron realizados dentro de una campana de flujo laminar (NuAire clase II, tipo A2). Las líneas celulares se mantuvieron dentro de una incubadora de CO₂ con camisa de agua y filtro HEPA (NuAire). Para la determinación del efecto biológico se utilizó sulforodamina B (SRB, Sigma). Se determinó la densidad óptica en las células previamente tratadas y teñidas con SRB mediante un lector de microplacas multimodo GloMax (Promega).

3.2.2 Líneas celulares

Las líneas celulares normales y tumorales fueron crecidas bajo la supervisión de la Dra. Rosa Esther Moo Puc de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social. Para los ensayos citotóxicos y antiproliferativos se utilizaron las líneas celulares tumorales de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), cérvix (HeLa y SiHa) y próstata (DU-145) y células normales de riñón de mono verde (Vero).

Las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en fase logarítmica de crecimiento con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). También se empleó 10,000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas, respectivamente. Igualmente, se utilizó 2.5

µg/mL de anfotericina B para inhibir el crecimiento de hongos, a una atmósfera del cultivo con 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2.3 Bioensayo de actividad citotóxica

Las células fueron incubadas en placas para cultivo celular de 96 pozos. A cada pozo se le adicionó 100 µL de medio con una densidad celular de 50,000 células/mL.

Transcurridas 24 h (confluencia celular de 90%), el medio fue retirado para añadir a cada pozo 100 µL de nuevo medio sin SFB. A su vez, se adicionó cada concentración de los extractos o compuestos a evaluar (50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL), y se incubó durante un periodo de 48 h.

Al cabo de este tiempo, se adicionó a cada pozo 100 µL de ácido tricloroacético al 10% con la finalidad de fijar las células; se incubó a 4 °C por 30 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante, y se adicionó a cada pozo 100 µL de la disolución de SRB (0.1% SRB en ácido acético al 1%), dejando transcurrir 15 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se realizaron cuatro lavados con ácido acético al 1% para eliminar el exceso de colorante.

La tinción se solubilizó con 200 µL de tris-base (10 mM). Consecutivamente, se midió la densidad óptica de la disolución a 560 nm, empleando un espectrofotómetro. La inhibición del crecimiento se determinó usando la fórmula $[(D.O \text{ control} - D.O \text{ extracto o producto puro}) / D.O \text{ control}] \times 100$. Cada evaluación se realizó por triplicado.

3.2.4 Bioensayo de actividad antiproliferativa

Al igual que el ensayo anterior, las células fueron incubadas en placas para cultivo celular de 96 pozos. A cada pozo se le adicionaron 100 µL de medio con una densidad celular de 50,000 células/mL.

Transcurridas 24 h (confluencia celular de 60 – 70 %), el medio fue retirado para añadir a cada pozo 100 µL de nuevo medio con SFB. A su vez, se adicionó cada concentración de los extractos o compuestos a evaluar (50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL), y se incubó durante un periodo de 48 h. Al cabo de este tiempo, se realizó la técnica de tinción descrita para SRB.

Los resultados de la actividad antiproliferativa se reportan como concentración inhibitoria media (CI_{50}) en $\mu\text{g/mL}$.

3.2.5 Análisis de los resultados

Los resultados fueron sometidos a un análisis del modelo de $\log(\text{inhibidor})$ vs. respuesta normalizada, empleando el paquete estadístico Prisma 5 (GraphPad Software), para obtener las concentraciones citotóxicas del 50% (CC_{50}) o concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) del crecimiento celular.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas de la partición del extracto metanólico

El extracto metanólico y las fracciones obtenidas de las particiones fueron evaluadas frente a la línea celular HeLa (Cuadro 3.1), en la cual se puede observar que el extracto metanólico no posee efecto citotóxico, sin embargo, las fracciones de las particiones hexánica y diclorometánica sí poseen dicho efecto, mostrando un aumento en la actividad al compararlas con el extracto orgánico de origen.

Cuadro 3.1 Efecto citotóxico del extracto metanólico y las fracciones de *P. vernicosum* evaluadas frente a la línea celular HeLa ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$).

Extracto o fracción	CC ₅₀ $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$
PVP-1A (MeOH)	---
PVP-2A (Hx)	53.0 \pm 1.0
PVP-2B (CH ₂ Cl ₂)	59.3 \pm 1.1
PVP-2C (AcOEt)	---
PVP-2D (Acuosa)	---
Docetaxel	0.33

CC₅₀ = concentración citotóxica media en $\mu\text{g/mL}$; -- = > 100 $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar

3.3.2 Actividad citotóxica de las fracciones primarias

De acuerdo con los efectos observados, se realizó la purificación de las fracciones hexánica y diclorometánica para posteriormente ser evaluadas frente a la línea celular HeLa. Las subfracciones obtenidas de las fracciones primarias presentaron un mejor efecto citotóxico en comparación con las fracciones orgánicas de origen, lo cual indica que al purificarse la actividad incrementa en las fracciones resultantes menos complejas (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2 Actividad citotóxica de las fracciones primarias de la partición hexánica (PVP-2A) y diclorometánica (PVP-2B) frente a la línea celular HeLa ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$).

PVP-2A (Hx)		PVP-2B (CH_2Cl_2)	
Fracciones	$\text{CC}_{50} \mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$	Fracciones	$\text{CC}_{50} \mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$
PVP-3A	---	PVP-19A	---
PVP-3B	---	PVP-19B	32.4 ± 1.0
PVP-3C	---	PVP-19C	---
PVP-3D	---	PVP-19D	---
PVP-3E	---	PVP-19E	17.8 ± 1.0
PVP-3F	23.2 ± 1.2	PVP-19F	15.5 ± 1.1
PVP-3G	21.2 ± 1.1	PVP-19G	18.9 ± 1.1
PVP-3H	20.5 ± 1.1	PVP-19H	20.5 ± 1.1
PVP-3I	29.2 ± 1.2	PVP-19I	22.8 ± 1.1
PVP-3J	35.2 ± 1.1	PVP-19J	31.1 ± 1.0
		PVP-19K	17.4 ± 1.1
		PVP-19L	37.6 ± 1.0
		PVP-19M	---
		PVP-19N	---
Docetaxel	0.33		

CC_{50} = concentración citotóxica media en $\mu\text{g/mL}$; -- = $> 100 \mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar

3.3.3 Actividad citotóxica de los metabolitos

Se realizó el estudio fitoquímico de las fracciones primarias PVP-3F, PVP-3G, PVP-3H y PVP-3I, de la fracción hexánica (PVP-2A) ya que son las que mostraron un mayor efecto citotóxico ($\text{CC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) (Mena-Rejón *et al.*, 2009). De igual manera, se obtuvo un metabolito (**compuesto I**) de la fracción PVP-3C, aunque esta fracción no mostró tener efecto citotóxico frente a la línea celular HeLa.

Con base en el estudio fitoquímico realizado de la fracción PVP-2A, se obtuvo un total de 11 metabolitos (compuesto **I-XI**), los cuales fueron evaluados frente a cinco líneas celulares de cáncer (HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231 y DU-145) y frente a una línea celular normal (Vero).

Los resultados de la actividad citotóxica e índice de selectividad (IS) de los compuestos evaluados sobre las seis líneas celulares utilizando el bioensayo de SRB mostraron un efecto citotóxico en un rango de $20.3 - 197.4 \mu\text{M}$ y presentaron $\text{CC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ (Cuadro 3.3), clasificándose como compuestos inactivos según el Instituto Nacional de Cáncer (Bugelski *et al.*, 2000).

Cuadro 3.3 Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera de *P. vernicosum*.

Compuesto	Líneas celulares CC_{50} $\mu M \pm DE$ (IS)					
	HeLa	SiHa	MCF-7	MDA	DU-145	Vero
Lupenona (I)	---	---	---	---	---	>588.8
Ácido betulínico (II)	32.6 \pm 2.3 (1.1)	28.9 \pm 2.5 (1.3)	49.6 \pm 3.1 (0.7)	94.3 \pm 2.7 (0.4)	---	38.1 \pm 2.3
Ácido 3-epi-betulínico (III)	117.9 \pm 2.8 (0.9)	113.1 \pm 2.9 (0.9)	153.7 \pm 3.1 (0.7)	---	---	106.6 \pm 2.3
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (IV)	120.4 \pm 1.3 (4.0)	109.7 \pm 1.0 (4.4)	98.5 \pm 1.2 (4.9)	91.1 \pm 1.1 (5.3)	97.2 \pm 1.0 (5.0)	>487.9
Betulona (V)	135.7 \pm 1.1	197.4 \pm 1.2	---	135.8 \pm 1.1	102.4 \pm 1.1	---
Ácido betulónico (VI)	---	116.8 \pm 1.06	---	60.9 \pm 1.2	139.0 \pm 1.1	---
Ácido oleanólico (VII)	---	108.7 \pm 1.0	---	106.0 \pm 1.0	65.6 \pm 1.2	---
Betulina (VIII)	---	---	---	---	161.8 \pm 2.2	---
Ácido 3 α ,24-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (IX)	152.6 \pm 1.5	20.3 \pm 0.8	31.7 \pm 1.7	71.2 \pm 1.1	53.1 \pm 1.1	---
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxo-lup-20(29)-en-28-oico (X)	182.2 \pm 1.5	92.2 \pm 1.0	---	105.8 \pm 1.1	52.6 \pm 1.1	---
Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23 dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (XI)	---	---	84.6 (5.0)	---	---	442.4 \pm 1.1
28-norlup-20(29)-en-3 α -17 β -diol (XII)	---	---	109.2 \pm 1.0 (5.3)	---	---	>583.6
3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano (XIII)	---	---	---	---	---	>1156.5
isobutirato de 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo (XIV)	---	---	---	---	---	>1156.5
2-metilpentano-2,3,4-triol (XV)	---	---	---	---	---	>1864.4
2-metilpentano-2,3,4-triol (XVI)	---	---	---	---	---	>1864.4
2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (XVII)	---	---	---	---	---	>1864.4
Lupeol (XVIII)	---	---	163.3 \pm 1.1 (3.6)	---	---	>585.9
28-O-acetil-betulona (XIX)	26.6 \pm 1.0 (33.8)	---	106.9 \pm 1.0 (8.4)	---	---	>898.5
Naringenina (XX)	---	---	---	---	---	>918.9
Docetaxel	0.09 (14.4)	0.22 (5.9)	0.01 (130)	0.19 (6.8)	0.81 (1.6)	1.3

CC_{50} = concentración citotóxica media en μM ; (IS) = índice de selectividad; --- = > 250 $\mu g/mL$; DE = desviación estándar; * no evaluado

3.3.4 Actividad antiproliferativa de los metabolitos

Los resultados de la actividad antiproliferativa e índice de selectividad (IS) de los compuestos evaluados sobre las seis líneas celulares utilizando el bioensayo de SRB (Cuadro 3.4) indican que el efecto antiproliferativo de todos los compuestos evaluados se encuentran en un rango de 47.6 - 261.4 μM ; al igual los compuestos fueron considerados inactivos (Bugelski *et al.* 2000).

Aunque se observa que los compuestos presentan un mayor efecto citotóxico que antiproliferativo, se calculó la razón entre la actividad citotóxica y actividad antiproliferativa (C/A), para determinar la tendencia del posible mecanismo de acción de cada compuesto, de modo que si la razón obtenida es menor a la unidad ($C/A \leq 1$) indica un mecanismo citotóxico, mientras que una razón mayor a la unidad ($C/A \geq 1$) indica un mecanismo básicamente antiproliferativo (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.4 Actividad antiproliferativa e índice de selectividad de los compuestos aislados de la planta entera de *P. vernicosum*.

Compuesto	Líneas celulares CI_{50} $\mu M \pm DE$ (IS)					
	HeLa	SiHa	MCF-7	MDA	Du-145	Vero
Lupenona (I)	---	---	---	---	---	>588.8
Ácido betulínico (II)	47.6 \pm 2.36 (1.2)	70.1 \pm 2.30 (1.0)	56.3 \pm 2.41 (1.2)	---	---	72.1 \pm 2.3
Ácido 3-epi-betulínico (III)	91.8 \pm 2.47 (1.3)	117.1 \pm 2.36 (1.0)	91.6 \pm 2.69 (1.2)	---	---	116.7 \pm 2.36
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-lup-20(29)- en-28-oico (IV)	---	---	---	---	---	---
Betulona (V)	---	---	---	---	---	---
Ácido betulónico (VI)	204.5 \pm 1.3	110.2 \pm 1.0	---	134.0 \pm 1.1	124.0 \pm 1.1	---
Ácido oleanólico (VII)	---	---	---	---	136.7 \pm 1.3	---
Betulina (VIII)	---	---	---	---	165.5 \pm 1.66	---
Ácido 3 α ,24-dihidroxi-lup-20(29)- en-28-oico (IX)	---	57.8 \pm 1.5	48.9 \pm 6.6	169.2 \pm 1.6	---	---
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxo-lup- 20(29)-en-28-oico (X)	106.2 \pm 1.0	126.7 \pm 1.0	---	122.8 \pm 1.0	89.7 \pm 1.0	---
Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23 dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (XI)	---	58.2 \pm 2.3 (11.3)	---	---	---	629.0 \pm 1.3
28-norlup-20(29)-en-3 α -17 β -diol (XII)	---	---	209.8 \pm 1.1 (2.8)	---	---	>583.6
3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano (XIII)	---	---	---	---	---	>1156.5
isobutirato de 1-hidroxi-2,2,4- trimetilpentan-3-ilo (XIV)	---	---	---	---	---	>1156.5
2-metilpentano-2,3,4-triol (XV)	---	---	---	---	---	>1864.4
2-metilpentano-2,3,4-triol (XVI)	---	---	---	---	---	>1864.4
2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (XVII)	---	---	---	---	---	>1864.4
Lupeol (XVIII)	---	---	---	152.8 \pm 1.0 (3.8)	---	>585.9
28-O-acetil-betulona (XIX)	---	165.8 \pm 1.0 (5.4)	261.4 \pm 1.1 (3.4)	95.3 \pm 1.0 (9.4)	---	>898.5
Naringenina (XX)	---	---	---	---	---	>918.9
Docetaxel	0.07 (1.9)	0.09 (1.3)	0.01 (11)	0.07 (1.78)	0.01 (11)	0.13

CI_{50} = concentración antiproliferativa media en μM ; (IS) = índice de selectividad; --- = > 250 $\mu g/mL$; DE = desviación estándar; * no evaluado

Cuadro 3.5 Razón entre la actividad citotóxica y antiproliferativa de los compuestos aislados de la planta entera de *P. vernicosum*.

Compuesto	Líneas celulares				
	HeLa	SiHa	MCF7	MDA	DU-145
<i>Lupenona</i> (I)	--- ^b				
Ácido betulínico (II)	0.68	0.41	0.87	C	--- ^b
Ácido 3- <i>epi</i> -betulínico (III)	1.28	0.96	1.67	--- ^b	--- ^b
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (IV)	C	C	C	C	C
<i>Betulona</i> (V)	C	C	--- ^a	C	C
Ácido betulónico (VI)	A	1.05	--- ^a	0.45	1.12
Ácido oleanólico (VII)	--- ^b	C	--- ^a	C	0.47
<i>Betulina</i> (VIII)	--- ^b	--- ^b	--- ^a	---	0.97
Ácido 3 α ,24-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (IX)	C	0.35	0.64	0.42	C
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (X)	1.71	0.72	--- ^a	0.86	0.58
Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23 dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (XI)	--- ^b	A	C	--- ^b	--- ^b
28-norlup-20(29)-en-3 α -17 β -diol (XII)	--- ^b	--- ^b	0.52	--- ^b	--- ^a
3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano (XIII)	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^a
isobutirato de 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo (XIV)	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^a
2-metilpentano-2,3,4-triol (XV)	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^a
2-metilpentano-2,3,4-triol (XVI)	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^a
2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (XVII)	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^b	--- ^a
<i>Lupeol</i> (XVIII)	--- ^b	--- ^b	C	--- ^b	--- ^a
28-O-acetil-betulona (XIX)	--- ^b	--- ^b	0.40	A	--- ^a
<i>Naringenina</i> (XX)	A	A	--- ^b	A	--- ^a
<i>Docetaxel</i>	1.40	2.25	1.00	2.66	66.0

A= Antiproliferativo, C= Citotóxico, ---^a No evaluado, ---^b No calculado

De las razones calculadas se puede observar que en algunos casos no se presentan valores, sólo los indicadores A (antiproliferativo) o C (citotóxico), puesto que no se tienen cantidades numéricas reportadas en los Cuadros de CI_{50} y CC_{50} , sin embargo, es posible predecir dicha tendencia.

La mayoría de los compuestos aislados presentan una tendencia de mecanismo preferentemente citotóxico, con excepción del ácido *epi*-betulínico (III), en las líneas celulares HeLa y MCF7, y el ácido betulónico (VII), en las líneas celulares SiHa y DU-145, el ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (X) en la línea HeLa, el ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxo-lup-20(29)-en-28-oico (XI), en la línea celular SiHa, el 28-O-acetil-

betulona (**XIX**) en la línea celular MDA-MB-231 y la naringenina (**XX**) en las líneas celulares HeLa, SiHa y MDA-MB-231.

3.3.5. Información previa de actividad frente líneas celulares de cáncer de los compuestos aislados

Lupenona (**compuesto I**), presenta un número limitado de estudios de actividad citotóxica y antiproliferativa, de los cuales sólo existen datos frente a la línea celular de cáncer de colon (HT-29) con una $CC_{50} > 70 \mu\text{M}$ (Ahmad *et al.*, 2015), mostrando que este metabolito no presenta un efecto citotóxico frente a líneas celulares de cáncer, resultado similar al obtenido en este estudio.

De los veinte compuestos evaluados frente a las diferentes líneas celulares, se puede observar que el ácido betulínico (**compuesto II**) es el que presenta un mayor efecto tanto citotóxico como antiproliferativo. En la literatura se ha encontrado información múltiple, en la cual se menciona que el ácido betulínico se ha evaluado frente a numerosas líneas celulares; en 1995 se determinó como inhibidor selectivo de melanoma humano, mostrando una actividad citotóxica frente a las líneas celulares MEL-1 ($CC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$), MEL-2 ($CC_{50} = 4.4 \mu\text{M}$) y MEL-3 ($CC_{50} = 10.5 \mu\text{M}$) (Pisha *et al.*, 1995). Actualmente el ácido betulínico se encuentra en fase clínica (fase I) para melanoma metastásico cutáneo y fase II para tratar nevos-displásicos (Salvador *et al.* 2012).

En numerosos estudios, el ácido betulínico se ha demostrado que induce apoptosis debido a los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno y apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial, lo cual produce la liberación de factores apogénicos mitocondriales, la activación de caspasas y la fragmentación del ADN (Fulda, 2008). Aunque originalmente se pensó que exhibía citotoxicidad específica contra las células de melanoma, se ha descubierto que este agente es citotóxico contra tipos de células tumorales no melanomatos, siendo este compuesto un metabolito prometedor debido a que ha presentado actividad frente a las líneas celulares, tales como carcinoma de ovario (A2780 $CI_{50} = 3.9 \mu\text{M}$), leucemia (H562 $CI_{50} = 21.9 \mu\text{M}$), carcinoma en cabeza y cuello (HNSCC $CI_{50} = 17.5 \mu\text{M}$) y células de cáncer de pulmón (H460 $CI_{50} = 3.3 \mu\text{M}$) (Thurner, 2003; Zuco *et al.*, 2002), por mencionar algunas; adicionalmente, se determinó que puede inducir muerte celular por apoptosis en células tumorales neuroectodérmicas frente a las líneas SH-EP (neuroblastoma), Daoy (meduloblastoma) y A17/95 (sarcoma de Ewing) (Fulda *et al.*, 1997).

Por otra parte, el epímero del ácido betulínico, el ácido 3-*epi*-betulínico (compuesto **III**), presenta muchos reportes respecto a su actividad frente a líneas celulares de cáncer. Se ha reportado actividad citotóxica frente a la línea celular de carcinoma de ovario (HO-8910) a una CC_{50} de 54.7 μM y sobre la línea celular de cáncer hepático (SMMC-7721) con una CC_{50} de 26.5 μM (Yang *et al.*, 2009). Con respecto a actividad antiproliferativa se ha evaluado el ácido 3-*epi*-betulínico sobre la línea celular HeLa, mostrando una CI_{50} de 6.8 μM (Abbas, 2011); sin embargo, en este trabajo dicho compuesto no muestra efecto antiproliferativo importante, ya que mostró una CI_{50} de 91.8 μM .

Con respecto al ácido 3 α ,23-dihidroxiup-20(29)-en-28-oico (compuesto **IV**) no existe mucha información en cuanto a su actividad biológica debido a que este es su segundo aislamiento, el cual fue obtenido por primera vez por derivatización, como aglicona del ácido 3 α ,23-dihidroxiup-20(29)-en-28-oico-28-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil éster (Yook *et al.*, 2002).

La betulona (compuesto **V**) no presenta muchos estudios de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer, encontrándose un reporte de actividad frente a la línea celular de cáncer broncopulmonar (NSCLC-N6, CC_{50} = 68.1 μM) (Mutai, 2004).

En contraste, del ácido betulónico (compuesto **VI**), se informa en la literatura un amplio número de evaluaciones frente a líneas celulares de cáncer, tales como la línea celular de cáncer de ovario (SH-OV-3, CC_{50} = 2.66 μM), cáncer de pulmón (A545, CC_{50} = 14.9 μM), cáncer de colon (HT29, CC_{50} = 13.2 μM ; XF498, CC_{50} = 1.03 μM ; HCT15, CC_{50} = 0.77 μM), leucemia (K562, CC_{50} = 5.9 μM), cáncer de próstata (PC3, CC_{50} = 14.9 μM ; DU145, CC_{50} = 35.9 μM), melanoma (SK-MEL-2, CC_{50} = 2.7 μM) y cáncer de mama (MCF7, CC_{50} = 28.8 μM) (Choi *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2004); sin embargo, no posee actividad frente a la línea celular de mama MDA-MB-231 (Satiraphan *et al.*, 2012), como se expuso en este trabajo al mostrar una CC_{50} de 60.9 μM frente a esta línea celular. El ácido betulónico ha exhibido un amplio rango de concentraciones citotóxicas medias, como se muestra en los datos obtenidos en la literatura y en los presentados en este trabajo, mostrando actividades desde prometedoras hasta no activas.

Por otra parte, el ácido oleanólico (compuesto **VII**) ha sido evaluado en numerosas líneas celulares de cáncer, tales como de hígado (HepG2, CC_{50} = 72.4 μM), cervicouterino (HeLa, CC_{50} = 72.4 μM), mama (MCF7, CC_{50} = 81.1 μM), colon (HTC-16, CC_{50} = 76.7 μM ; HCT15, CC_{50} = 59.8 μM ; HTC-116, CC_{50} = 53.0 μM), pulmón (A549, CC_{50} = 42.7 μM)

(Hashem *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2002), melanoma de ratón (B16 2F2, $CC_{50} = 6.8 \mu\text{M}$) (Hata *et al.*, 2002) y ovario (A2780, $CC_{50} = 17.5 \mu\text{M}$) (Cao *et al.*, 2004), por mencionar algunos, mostrando que no presenta actividad citotóxica, a excepción de la línea celular de melanoma de ratón.

En la literatura para la betulina (compuesto **VIII**) se determinaron las siguientes actividades: frente a la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa, $CC_{50} = 22.6 \mu\text{M}$), cáncer hepático (HepG2, $CC_{50} = 2059.0 \mu\text{M}$, SK-HEP-1, $CC_{50} = 131.4 \mu\text{M}$), cáncer de pulmón (A545, $CC_{50} = 35.5 \mu\text{M}$ y NCI-H460, $CC_{50} = 63.5 \mu\text{M}$), cáncer de mama (MCF7, $CC_{50} = 30.7 \mu\text{M}$), cáncer de próstata (PC3, $CC_{50} = 83.0 \mu\text{M}$) (Li *et al.*, 2010), leucemia (K562, $CC_{50} = 14.5 \mu\text{M}$; HL60, $CC_{50} = 14.7 \mu\text{M}$; U937 $CC_{50} = 14.2 \mu\text{M}$), melanoma (G31, $CC_{50} = 12.2 \mu\text{M}$; MEL-28, $CC_{50} = 16.0 \mu\text{M}$) y neuroblastoma (GOTO, $CC_{50} = 17.2 \mu\text{M}$; NB-1, $CC_{50} = 16.0 \mu\text{M}$) (Hata *et al.*, 2003), y en este trabajo se reporta su efecto sobre la línea celular DU-145 ($CC_{50} = 161.8 \pm 2.2$; $CI_{50} = 136.7 \pm 1.3$), mostrando un comportamiento similar al presentado frente a la línea PC-3, el cual no es activo.

El ácido 3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (compuesto **IX**) al ser un metabolito novedoso, aislado por primera vez del extracto diclorometánico de esta especie en un estudio previo, no existen más reportes respecto a actividad biológica, sólo el mostrado por García-Cámara (2014), el cual mostró actividad citotóxica y antiproliferativa importante frente a las líneas celulares de cáncer cervicouterino (SiHa, $CC_{50} = 20.3 \mu\text{M}$; $CI_{50} = 57.8 \mu\text{M}$), carcinoma nasofaríngeo (KB, $CC_{50} = 10.8 \mu\text{M}$; $CI_{50} = 12.5 \mu\text{M}$), cáncer de mama (MCF7, $CC_{50} = 31.7 \mu\text{M}$; $CI_{50} = 48.9 \mu\text{M}$) y cáncer laríngeo (Hep2, $CC_{50} = 34.1 \mu\text{M}$; $CI_{50} = 72.5 \mu\text{M}$).

Este es el primer reporte del metabolito ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (compuesto **X**), por lo tanto, es el primer reporte de actividad biológica.

El ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (compuesto **XI**), presentó actividad citotóxica relevante frente a la línea celular KB ($CC_{50} = 10.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$; $CI_{50} = 16.4 \pm 1.8 \mu\text{M}$), con un índice de selectividad alto de 41.0 en el ensayo de citotoxicidad y 39.9 en el ensayo antiproliferativo; debido a esto se puede considerar como un compuesto prometedor para seguir estudiando (Valencia-Chan *et al.*, 2017).

El 28-*nor*lup-20(29)-en-3 α -17 β -diol (compuesto **XII**), ha sido evaluado en un panel de líneas celulares de cáncer, como de hígado (HepG2, $CC_{50} = 21.50 \pm 0.01 \mu\text{M}$; Hep 3B,

$CC_{50} = 22.71 \pm 0.04 \mu\text{M}$), mama (MDA-MB-231, $CC_{50} = 29.04 \pm 0.07 \mu\text{M}$; MCF7, $CC_{50} = 21.50 \pm 0.01 \mu\text{M}$), pulmón (A 549, $CC_{50} = 24.46 \pm 0.14 \mu\text{M}$) y gingival (Ca9-22, $CC_{50} = 31.82 \pm 0.09 \mu\text{M}$), sin embargo, no mostró actividad citotóxica importante (Du *et al.*, 2009), como se observó en este trabajo al evaluarlo frente a las líneas celulares.

El compuesto isobutirato de 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentano (compuesto **XIII**), y como se mencionó anteriormente, fue aislado en un estudio previo y evaluado frente a un panel de líneas celulares de cáncer y no mostró actividad citotóxica (García-Cámara 2014). Por otro lado, su isómero nombrado como compuesto **XIV** (isobutirato de 1-hidroxi-2,2,4-trimetilpentan-3-ilo), se observó que, de igual manera, no mostró actividad biológica.

Como se mencionó en el capítulo 2, los compuestos **XV** y **XVI** son diasterómeros del 2-metilpentano-2,3,4-triol, de los cuales el compuesto **XV** ya había sido aislado con anterioridad y no mostró actividad frente a las líneas celulares de cáncer, y de igual manera su diasterómero (compuesto **XVI**) no mostró actividad citotóxica o antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer.

Con respecto al producto 2,3-dimetilbutano-1,2,3-triol (compuesto **XVII**), se ha reportado su aislamiento previamente, sin embargo, no existen reportes de su actividad biológica.

El lupeol (compuesto **XVIII**) es un compuesto ubicuo en la naturaleza, y por lo tanto se ha evaluado frente a diversas líneas celulares de cáncer, como por ejemplo melanoma (MEL-2, $CC_{50} 39.4 \mu\text{M}$; B16 2F2, $CI_{50} 38.0 \mu\text{M}$) (Setzer y Setzer 2003; Hata *et al.*, 2002), leucemia (HL60, $CC_{50} 19.9 \mu\text{M}$; U937, $CC_{50} 16.8 \mu\text{M}$) y neuroblastoma (NB-1, $CC_{50} 19.7 \mu\text{M}$) (Hata *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, se le ha realizado diversos estudios para determinar su mecanismo de acción frente a las diferentes líneas de cáncer, siendo su principal mecanismo la inducción de la apoptosis, bajo diferentes vías, como la activación de caspasas 3, 8 y 9 e inhibición de la proteína proto-oncogénica Ras, del receptor de muerte celular y de la topoisomerasa II, por mencionar algunos (Rauth *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Chaturvedi *et al.*, 2008; Mohammad *et al.*, 2005; Wada *et al.*, 2001). Sin embargo, los efectos observados son mayores a $10 \mu\text{M}$.

La 28-O-acetil-betulona (compuesto **XIX**), como se mencionó anteriormente, ha sido obtenida por medio de la modificación estructural de compuestos derivados de lupanos, como el ácido betulínico, por lo tanto existen reportes de su evaluación en líneas celulares de cáncer, mostrando las siguientes CC_{50} s: en leucemia (P388, $CC_{50} > 22.0 \mu\text{M}$),

páncreas (BXPC-3, CC_{50} 7.5 μ M), mama (MCF7, CC_{50} 7.0 μ M), glioblastoma (SF-268, CC_{50} 7.5 μ M), pulmón (NCI-H460, CC_{50} 6.1 μ M), colon (KM20L2, CC_{50} 9.7 μ M) y próstata (DU-145, CC_{50} 13.4 μ M) (Pettit *et al.*, 2014), y en este trabajo frente a la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa, CC_{50} 26.6 \pm 1.0 μ M), con un índice de selectividad alto de 33.8. Estos resultados han mostrado a este metabolito prometedor para futuros estudios frente a otras líneas celulares de cáncer, así como para determinar el mecanismo de acción del mismo.

Por último, la naringenina (compuesto **XX**) es un flavonoide altamente encontrado en diversas especies, el cual ha presentado varias actividades frente a diversas líneas celulares de cáncer (Kocyigit *et al.*, 2016; Sak, 2014; Kanno *et al.*, 2005); así también se ha evaluado para determinar sus posibles mecanismos de acción, observándose que puede inducir la apoptosis por medio de la generación de sustancias reactivas de oxígeno, por la activación de las caspasas 3, 7, 8 y 9, inhibir la proliferación celular, y arrestar el ciclo celular en fase G0/G1 en la línea celular A431 de carcinoma de piel y cáncer de hígado (HepG2); así como en fase S en cáncer de colon (SW1116, SW837) y cáncer de mama (HTB26, HTB132) (Abaza *et al.*, 2015; Ahamad *et al.*, 2014; Arul y Subramanian, 2013).

Con lo antes mencionado, se resume que las actividades evaluadas frente a las líneas celulares en estudio fueron similares a las reportadas en la literatura, mostrando además que poseen un potencial para estudios posteriores.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Existen pocos reportes de estudios fitoquímicos de las especies del género *Phoradendron*. Entre éstos se puede resaltar la especificidad de las plantas de este género en la síntesis de triterpenos, principalmente de tipo oleanano y lupano (López-Martínez *et al.*, 2013; Ríos *et al.*, 2001; Kashiwada *et al.*, 1998), siendo estos últimos los principales compuestos obtenidos en la especie *P. vernicosum*.

Los triterpenos son metabolitos que constituyen el grupo más grande de los productos vegetales naturales con más de 20,000 miembros conocidos. En las Figuras 4.1 y 4.2 se expone la posible ruta biogénica de los compuestos obtenidos en este trabajo, y como se observa, la ruta está comprendida principalmente por los rearrreglos de Wagner–Meerwein (W-M) y de oxidaciones en la estructura base de los compuestos (Phillips *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004; Dewick, 2002).

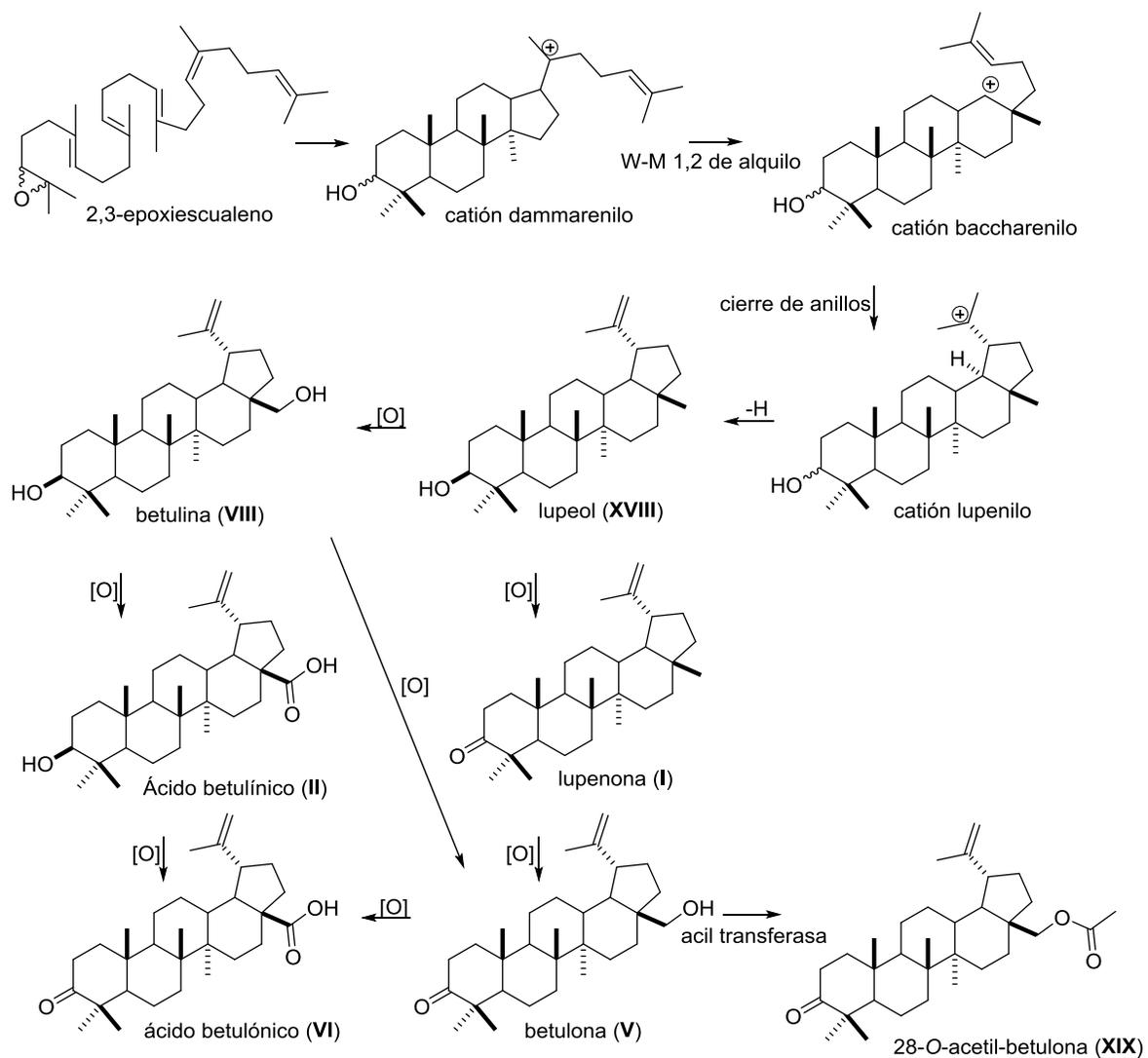


Figura. 4.1 Ruta biogénica propuesta para los triterpenos de esqueleto lupano provenientes del lupeol aislados en este trabajo.

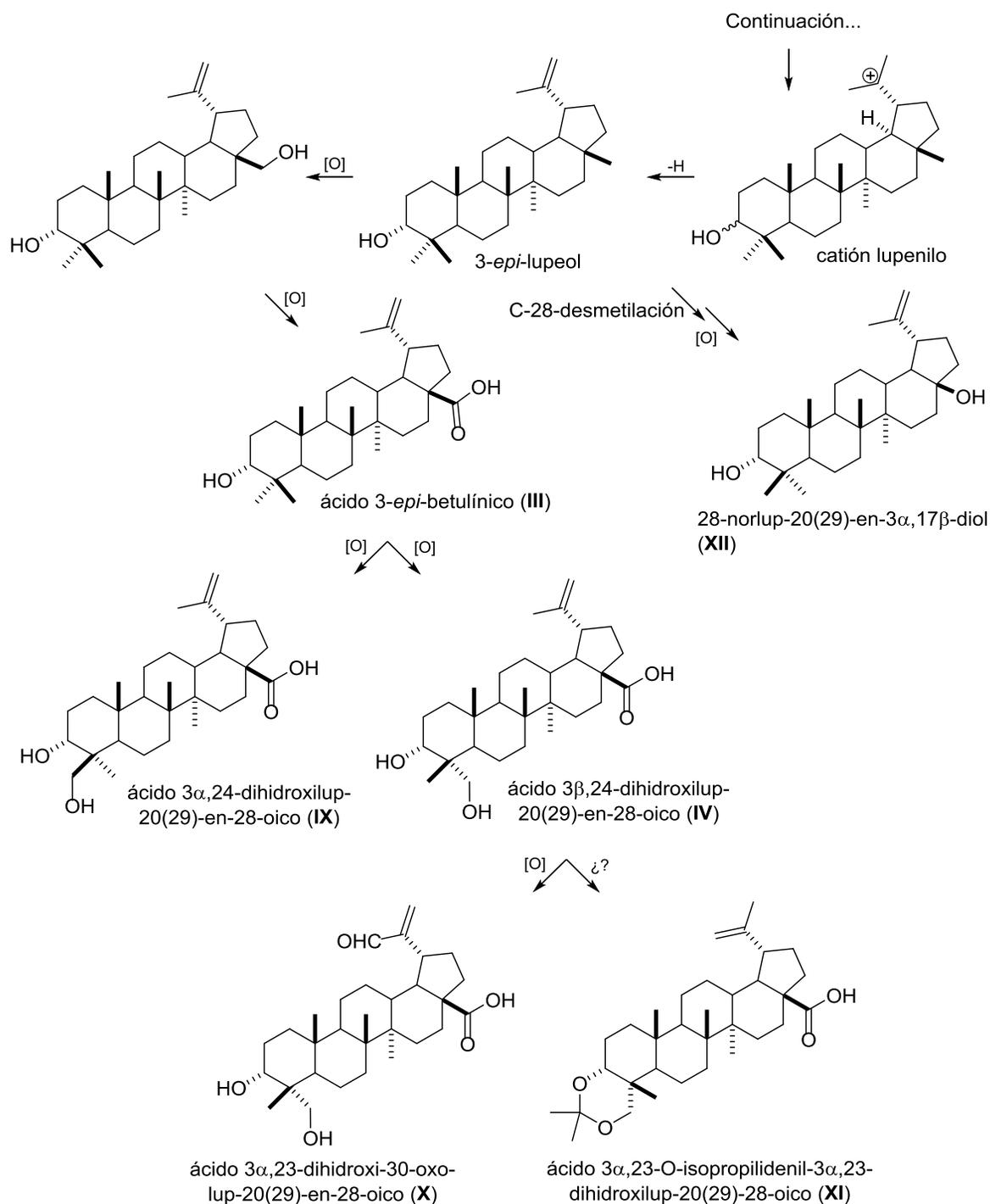


Figura. 4.2 Ruta biogénica propuesta para los triterpenos de esqueleto lupano provenientes del 3-*epi*-lupeol aislados en este trabajo (continuación).

Se encuentran múltiples reportes de actividades anticancerígenas de triterpenos de esqueleto lupano principalmente del ácido betulínico, betulina y lupeol, ya que estos compuestos son ubicuos en la mayoría de las plantas (Cháirez-Ramírez *et al.*, 2016). El

ácido betulínico es un candidato prometedor contra líneas celulares de melanomas humanos (MEL-1, MEL-2 y MEL-4), al inhibirlos selectivamente (Pisha *et al.*, 1995); encontrándose en fase clínica II para el tratamiento de nevos displásicos (lunares atípicos) con el potencial de transformarse en melanoma (Salvador *et al.*, 2012).

La actividad inhibitoria selectiva del ácido betulíco fue de interés para determinar su modo de acción, así como su capacidad para afectar a otras líneas celulares de cáncer; mostrando así que el principal mecanismo de muerte al que induce el ácido betulínico es por apoptosis celular. Ejemplo de lo anterior, es la activación de la apoptosis a 10 μM en la línea celular UISO-Mel-1 derivado de melanoma metastático, por la activación de caspasa 3 y sustancias reactivas de oxígeno (Tan *et al.*, 2003), también incrementa la actividad de las caspasas y suprime la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en las líneas celulares escamosas de cabeza y cuello (SCC9 y SCC25) a 17.5 μM ; y a 21.9 μM sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica (K562) (Wu *et al.*, 2010; Thurnher, 2003). De igual manera, mostró especificidad a 21.9 μM por muerte apoptótica en líneas celulares de neuroblastoma (SH-EP, IMR-32, Kelly y LAN-5) (Fulda *et al.*, 1997); a esta misma concentración ha inducido apoptosis en células de cultivo primario de leucemia mieloide aguda y leucemia linfoide aguda en muestras pediátricas (Ehrhardt *et al.*, 2004). Sobre la línea celular de cáncer cervicouterino CNE2, a 43.8 μM , mostró activación de caspasas 3 y 9, fragmentación del ADN y liberación del citocromo c (Liu y Luo, 2012); a 21.9 y 46.0 μM se pudo mediar apoptosis, suprimir inflamación e inhibir la angiogénesis en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-468, respectivamente (Weber *et al.*, 2014). Además, se encontró un incremento del gen pro-apoptótico bax y la mediación de las sustancias reactivas de oxígeno en células HeLa al ser tratadas con ácido betulínico a una concentración de 30 μM (Xu *et al.*, 2014). Es bien sabido que las mitocondrias juegan un papel importante en la vía intrínseca de la apoptosis; la ruta mitocondrial está precedida por la generación de especies reactivas de oxígeno y está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, que consiste en proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1) y proapoptóticas (Bax y Bad). Debido a lo expuesto anteriormente, el ácido betulínico ha mostrado inducir apoptosis de manera directa en el efecto sobre las mitocondrias en diversas líneas celulares de cáncer. Sin embargo, este no es el único mecanismo encontrado, debido a que ha mostrado causar necrosis y autofagia (Potze *et al.*, 2014; Karpova *et al.*, 2006).

Finalmente, otros estudios *in vitro* han demostrado que el ácido betulínico es un agente potentemente efectivo contra una gran variedad de células cancerosas ($CC_{50} < 10 \mu\text{M}$), sin embargo, en otras líneas celulares no ha sido tan efectivo, por lo que se puede decir que es selectivo frente a ciertas líneas celulares cancerígenas, como se muestra en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 Evaluaciones *in vitro* del ácido betulínico en distintas líneas celulares de cáncer.

Línea celular	CC ₅₀ (µM)	Referencia
Mama		
MCF-7	29.5	Damle <i>et al.</i> , 2013
SKBR3	35.5	Kessler <i>et al.</i> , 2007
MDA-MB-468	46.0	Weber <i>et al.</i> , 2014
MDA-MB-231	15.2	Abdel Bar <i>et al.</i> , 2009
MDL13E	25.2	Kessler <i>et al.</i> , 2007
BT483	28.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
BT474	26.5	Kessler <i>et al.</i> , 2007
T47D	28.5	Kessler <i>et al.</i> , 2007
BT549	12.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
ZR-75-1	> 43.8	Kessler <i>et al.</i> , 2007
Ovario		
A2780	3.9	Zuco <i>et al.</i> , 2002
OVCAR-5	7.2	Zuco <i>et al.</i> , 2002
IGROV-1	9.8	Zuco <i>et al.</i> , 2002
PA-1	8.8	Mukherjee <i>et al.</i> , 2004
Cervicouterino		
A431	3.9	Zuco <i>et al.</i> , 2002
CaSki	21.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
HeLa	31.3	Kessler <i>et al.</i> , 2007
SiHa	25.8	Kessler <i>et al.</i> , 2007
Melanoma		
G361	5.2	Hata <i>et al.</i> , 2002
SK-MEL-28	6.5	Hata <i>et al.</i> , 2002
Me665/2/21	3.3	Zuco <i>et al.</i> 2002
Me665/2/60	3.5	Zuco <i>et al.</i> , 2002
B16-F1	16.1	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
Leucemia		
U937	10.0	Hata <i>et al.</i> , 2002
HL60	6.6	Hata <i>et al.</i> , 2002
K562	9.8	Hata <i>et al.</i> , 2002
Colon		
SW1463	8.3	Kessler <i>et al.</i> , 2007
SW837	24.7	Kessler <i>et al.</i> , 2007
RKO	20.8	Kessler <i>et al.</i> , 2007
CO115	26.7	Kessler <i>et al.</i> , 2007
SW480	33.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
T84	24.7	Kessler <i>et al.</i> , 2007
HCT81	35.9	Kessler <i>et al.</i> , 2007
DLD1	15.0	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
HT29	> 43.8	Kessler <i>et al.</i> , 2007
LS180	25.6	Kessler <i>et al.</i> , 2007
Páncreas		
EPP85-181P	7.4	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RNOV	3.1	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RDB	7.9	Drang <i>et al.</i> , 2009

Cuadro 4.1 Evaluaciones *in vitro* del ácido betulínico en distintas líneas celulares de cáncer (continuación).

Pulmón		
H460	3.3	Zuco <i>et al.</i> 2002
POGB	9.2	Zuco <i>et al.</i> 2002
POGB/DX	7.0	Zuco <i>et al.</i> 2002
SW1573	> 43.8	Kessler <i>et al.</i> , 2007
A549	10.3	Gauthier <i>et al.</i> 2006
H322	26.9	Kessler <i>et al.</i> , 2007
GLC-2	19.3	Kessler <i>et al.</i> , 2007
GLC-4	21.9	Kessler <i>et al.</i> , 2007
GLC-36	21.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
H187	19.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
N417	13.6	Kessler <i>et al.</i> , 2007
MBA9812	16.6	Kessler <i>et al.</i> , 2007
L132	2.7	Mukherjee <i>et al.</i> , 2004
Próstata		
DU-145	25.4	Kessler <i>et al.</i> , 2007
PC3	26.9	Kessler <i>et al.</i> , 2007
22Rv1	22.1	Kessler <i>et al.</i> , 2007
LNCaP	26.0	Kessler <i>et al.</i> , 2007
Gástrico		
EPG85-257P	6.6	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPG85-257RDB	2.0	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPG85-257RNOV	3.6	Drang <i>et al.</i> , 2009
Páncreas		
EPP85-181P	7.4	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RNOV	3.1	Drang <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RDB	7.9	Drang <i>et al.</i> , 2009
Neuroblastoma		
GOTO	7.9	Hata <i>et al.</i> , 2002
NB-1	9.5	Hata <i>et al.</i> , 2002

Otro triterpeno de esqueleto lupano muy representativo es la betulina, el cual se ha evaluado en un gran número de líneas celulares de cáncer, como se observa en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Evaluaciones *in vitro* de la betulina en distintas líneas celulares de cáncer.

Línea celular	CC ₅₀ (μM)	Referencia
Mama		
MCF7	30.7	Li <i>et al.</i> , 2010
T47D	5.2	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Cervicouterino		
HeLa	22.6	Li <i>et al.</i> , 2010
HPCC	3.4	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Hígado		
HepG2	22.8	Li <i>et al.</i> , 2010
SK-HEP-1	132.1	Li <i>et al.</i> , 2010
Pulmón		
A549	7.4	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
NCI-H460	63.5	Li <i>et al.</i> , 2010
Lu1	>45.2	Hwang <i>et al.</i> , 2003
Próstata		
PC3	82.9	Li <i>et al.</i> , 2010
LNCaP	>45.2	Hwang <i>et al.</i> , 2003
Leucemia		
CCRF/CEM	24.6	Boryczka <i>et al.</i> , 2013
P388	12.4	Boryczka <i>et al.</i> , 2013
K562	14.5	Hata <i>et al.</i> , 2003
Jurat 1E.6	6.7	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
HL60	14.7	Hata <i>et al.</i> , 2003
U937	14.4	Hata <i>et al.</i> , 2003
Neuroblastoma		
SK-N-AS	2.5	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
TE671	10.3	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
GOTO	17.1	Hata <i>et al.</i> , 2003
NB-1	16.5	Hata <i>et al.</i> , 2003
Glioma		
C6	5.9	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Colon		
HT-29	4.3	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Col2	>45.2	Hwang <i>et al.</i> , 2003
DLD-1	6.6	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
SW707	51.7	Boryczka <i>et al.</i> , 2013
Tiroides		
FTC238	6.8	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Mieloma múltiple		
RPMI8226	6.4	Rzeski, W. <i>et al.</i> 2009
Ovario		
HPOC	2.8	Rzeski W. <i>et al.</i> , 2009
A2780	>45.2	Chaturvedula <i>et al.</i> , 2003
Glioblastoma		
HPGBM	3.4	Rzeski <i>et al.</i> , 2009
Nasofaringeo		
KB	>45.2	Hwang <i>et al.</i> , 2003

Cuadro 4.2 Evaluaciones *in vitro* de la betulina en distintas líneas celulares de cáncer (continuación).

Páncreas		
EPP85-181P	21.1	Drag <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RNOV	20.6	Drag <i>et al.</i> , 2009
EPP85-181RDB	26.5	Drag <i>et al.</i> , 2009
Gástrico		
EPG85-257P	18.7	Drag <i>et al.</i> , 2009
EPG85-257RDB	11.0	Drag <i>et al.</i> , 2009
EPG85-257RNOV	12.3	Drag <i>et al.</i> , 2009
Melanoma		
G361	12.4	Hata <i>et al.</i> , 2003
SK-MEL-28	16.2	Hata <i>et al.</i> , 2003
B16-F1	13.8	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
B162F2	27.4	Hata <i>et al.</i> , 2002
MEL-2	>45.2	Kim <i>et al.</i> , 1998

La betulina, al igual que el ácido betulínico, ha inducido muerte celular por apoptosis, en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa) a 21.9 μM , mostrando cambios morfológicos como condensación y fragmentación nuclear, translocación de la fosfatidilserina de la membrana celular y formación de cuerpos apoptóticos. De igual manera, se observó la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c mitocondrial, la activación de las caspasas 9, 3 y 7 y la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (miembros de la familia Bcl-2) (Li *et al.*, 2010). En otro estudio, la betulina mostró un porcentaje del 20% de células apoptóticas en la línea celular de melanoma murino B164A5 a 10 μM , mientras que en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, a 20 μM , fue de un 27.64%, medidas por citometría de flujo (Soica *et al.*, 2012; Pyo *et al.*, 2009).

Otro compuesto muy abundante en la naturaleza es el lupeol, el cual es el lupano más simple y, al igual que sus análogos lupanos, ha sido evaluado en un gran número de líneas celulares de cáncer, sin embargo, y posiblemente debido a su número limitado de grupos funcionales en el C-28, no ha mostrado actividad citotóxica importante, como se puede observar en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3 Evaluaciones *in vitro* del lupeol en distintas líneas celulares de cáncer.

Línea celular	CC ₅₀ (μM)	Referencia
Leucemia		
HL60	19.9	Hata <i>et al.</i> , 2003
U937	16.8	Hata <i>et al.</i> , 2003
K562	>20	Hata <i>et al.</i> , 2003
Melanoma		
G361	>20	Hata <i>et al.</i> , 2003
SK-MEL-28	>20	Hata <i>et al.</i> , 2003
B16-F1	104.0	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
B162F2	38.0	Hata <i>et al.</i> , 2002
Neuroblastoma		
GOTO	>20	Hata <i>et al.</i> , 2003
NB-1	19.7	Hata <i>et al.</i> , 2003
Ovario		
A2780	>46.9	Chaturvedula <i>et al.</i> , 2003
Pulmón		
A549	165.0	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
Colon		
DLD-1	125.0	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
Próstata		
LNCaP	49.2	Saleem <i>et al.</i> , 2005a
CWR22Rv1	43.3	Saleem <i>et al.</i> , 2005a
Boca		
UPCI:SCC131	26.1	Rauth <i>et al.</i> , 2016
UPCI:SCC084	21.4	Rauth <i>et al.</i> , 2016
Páncreas		
AsPC-1	35	Saleem <i>et al.</i> , 2005b

A pesar de la baja actividad observada se han realizado experimentos para determinar el tipo de muerte celular, como el estudio realizado sobre la línea celular PCNA-1 de cáncer de páncreas a una concentración de 60 μM, en el cual se logró inhibir la proliferación celular, indicando por citometría de flujo un mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis (~ 60%), aunado a esto se determinó el arresto del ciclo celular en las fases G0/G1 (~ 80%) (Li *et al.*, 2015). En otra línea celular de páncreas, AsPC-1, se evaluó el compuesto a diversas concentraciones (30-50 μM), en la cual se observó un cambio en la morfología celular, siendo que la concentración más alta presentó un 20% de población apoptótica, además de presentar un aumento significativo en la expresión proteica de Bax y aumento en la expresión de caspasas 3, 8 y 9 (Saleem *et al.*, 2005a). Por otro lado, se determinó que el lupeol induce apoptosis en la línea celular de cáncer de próstata a 49.2 μM, en la cual se mostró un cambio en la morfología celular, además de inducir la escisión de la proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa y degradación de la proteína acinus con un aumento significativo en la expresión de la proteína FADD, además de causar un aumento

significativo en la expresión del receptor Fas (receptor ligando de muerte celular) y la activación de las caspasas 8 y 9, habiendo muerte celular por apoptosis por vía extrínseca (Saleem *et al.*, 2005b). En la línea celular de cáncer oral (UPCI: SCC131), el lupeol causó muerte celular por apoptosis a 50 μM al activar las caspasas 3 y 7, y por citometría de flujo se observó un 84% de células en apoptosis a las 48 h (Rauth *et al.*, 2016). Como se puede observar, el principal mecanismo de muerte celular que ejerce el lupeol es por medio de la inducción de la apoptosis; sin embargo, el principal objetivo de seguir estudiando el lupeol es por su abundancia en la dieta, debido a que se encuentra en muchas frutas, cereales, vegetales, aceites vegetales, entre otros alimentos, que son ampliamente consumidos normalmente, por lo que se propone al lupeol como un compuesto quimiopreventivo de diversos tipos de cáncer (Saleem, 2009; Chaturvedi *et al.*, 2008).

Haciendo una comparación entre los tres triterpenos de esqueleto lupano antes mencionados, se puede ver que el grado de oxidación en el C-28 es de gran importancia, observándose que el ácido betulínico posee un mayor efecto citotóxico que la betulina y ésta a su vez que el lupeol, mostrando así que la efectividad de los triterpenos está determinada por su funcionalidad. Aunado a esto, y debido al auge observado en estudios biológicos de los lupanos, se han diseñado muchos derivados de los lupanos para determinar relaciones estructura-actividad, teniendo como sitios prometedores el C-28, C-20, C-29, C-30 y C-3 para modificaciones estructurales (Figura 4.3).

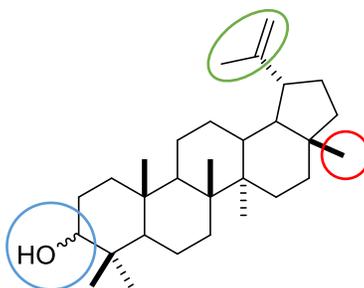


Figura 4.3 Sitios prometedores de los lupanos.

Ejemplo de lo anterior es la introducción de un grupo amino en el ácido carboxílico del ácido betulínico, observándose que al agregar aminoácidos específicos como alanina y valina mejoran la actividad de los derivados resultantes en las líneas celulares de melanoma (MEL-2) y cáncer nasofaríngeo (KB) (Figura 4.4) (Jeong *et al.*, 1999).

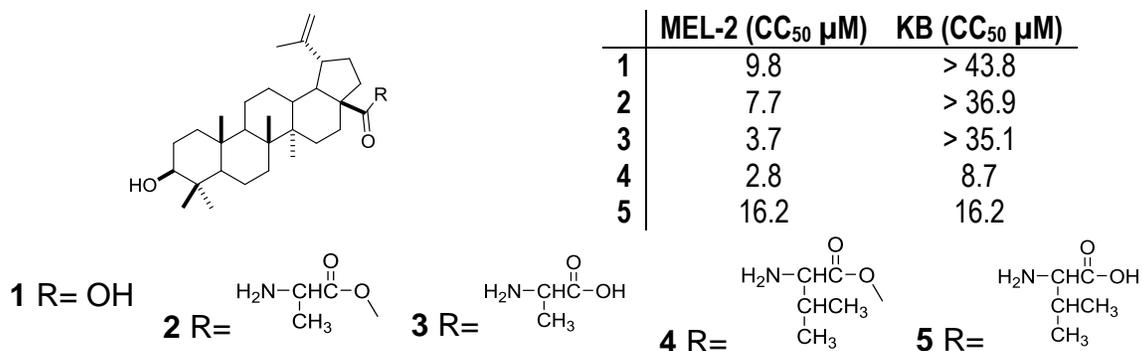


Figura. 4.4 Derivados del ácido betulínico con aminoácidos conjugados y su actividad citotóxica (Jeong *et al.*, 1999).

En otro estudio, continuando con la modificación en el C-28, se realizó la introducción de diversos sustituyentes para monitorear la actividad observada al variar grupos, observándose que al agregar grupos voluminosos polares con características de electrodonadores aumenta la actividad en diversas líneas celulares (Figura 4.5) (Zhang *et al.*, 2014).

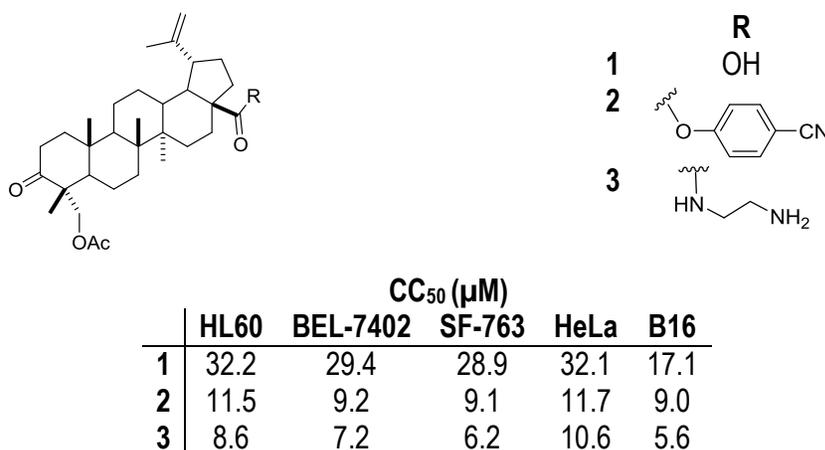
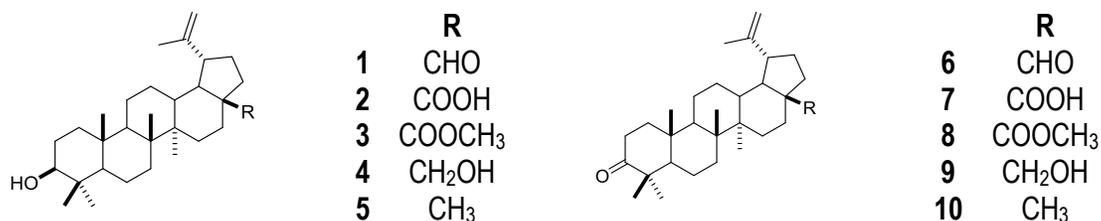


Figura. 4.5 Derivados del acetato de ácido betulínico y su actividad citotóxica (Zhang *et al.*, 2014).

En otro ejemplo de modificación en el C-28 se evaluaron cinco análogos de dos compuestos con diferente grado de oxidación, en el que se muestra una tendencia de mayor a menor efecto citotóxico en este orden: CHO > COOH > COOCH₃ > CH₂OH > CH₃ (Figura 4.6) (Urban *et al.*, 2004; Hata *et al.*, 2003, 2002).



	CC ₅₀ (μM)							
	HL60	U937	K562	G361	SK-MEL-28	GOTO	NB-1	B162F2
1	1.1	3.7	4.9	9.6	10.6	7.5	8.8	6.4
2	6.6	10.0	9.8	5.2	6.5	7.9	9.5	7.9
3	10.8	11.1	8.8	8.7	4.8	6.8	6.3	4.9
4	14.7	14.4	14.5	12.4	16.2	17.1	16.5	27.4
5	19.9	16.8	>20	>20	>20	>20	19.7	38.0
6	0.5	1.5	1.8	9.4	9.3	5.2	5.8	4.1
7	--	--	5.9	--	--	--	--	---
8	7.8	8.8	10.9	8.5	7.4	9.4	9.6	---
9	18.9	16.8	18.7	10.6	>20	>20	>20	29.3
10	15.8	11.9	18.2	>20	>20	>20	>20	25.4

Figura. 4.6 Derivados en el C-28 de dos triterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica (Urban *et al.*, 2004; Hata *et al.*, 2003, 2002).

Con respecto a modificaciones en los carbonos C-20 y C-29, en un estudio se observó que al reducir el alqueno a enlace simple hay un aumento en la actividad en la línea celular de próstata (PC-3) y melanoma (SK-MEL-2) (Figura 4.7) (Choi *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001).

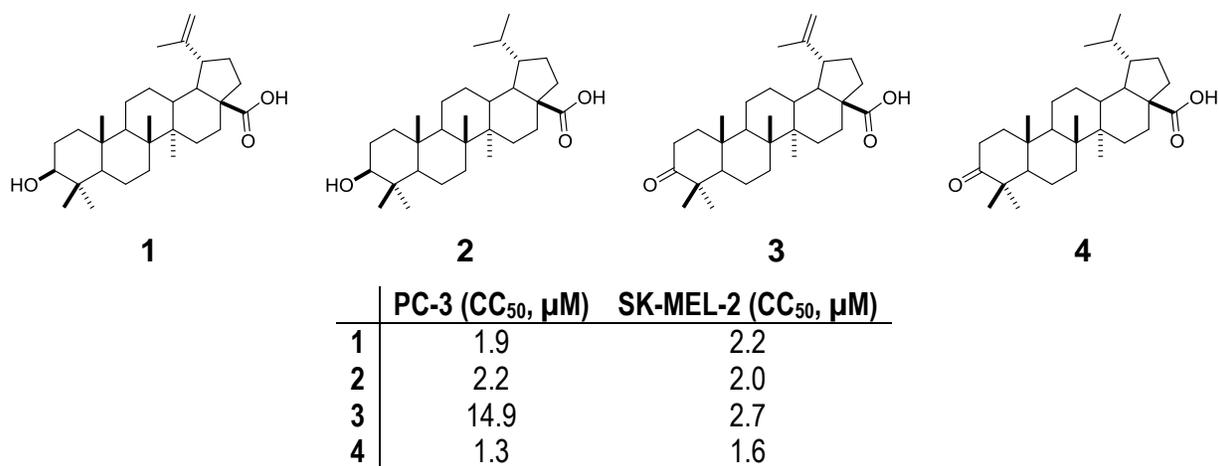


Figura. 4.7 Derivados en los carbonos C-20 y C-29 de triterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica (Urban *et al.*, 2004; Hata *et al.*, 2003, 2002).

También se han realizado modificaciones en el C-30, observándose que oxidaciones del metilo a aldehído o ácido carboxílico mejora la actividad, al compararlo con su análogo sin grupo funcional; la presencia del grupo vinilo es importante para la actividad biológica (Figura 4.8) (Hata *et al.*, 2008).

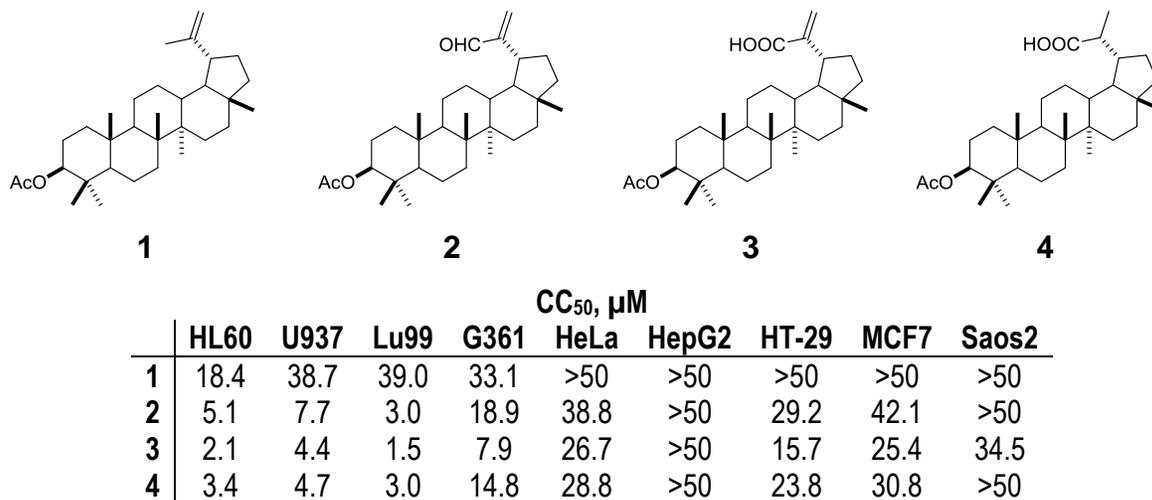


Figura. 4.8 Derivados en el C-30 de triterpenos de esqueleto lupano y su actividad citotóxica (Hata *et al.*, 2008).

En relación a modificaciones en el C-3, en un estudio se evaluaron cuatro derivados de la betulina unidos a grupos derivados de coumaroilo, observándose que la presencia de este grupo afecta positivamente la actividad biológica (Figura 4.9) (Hwang *et al.*, 2003).

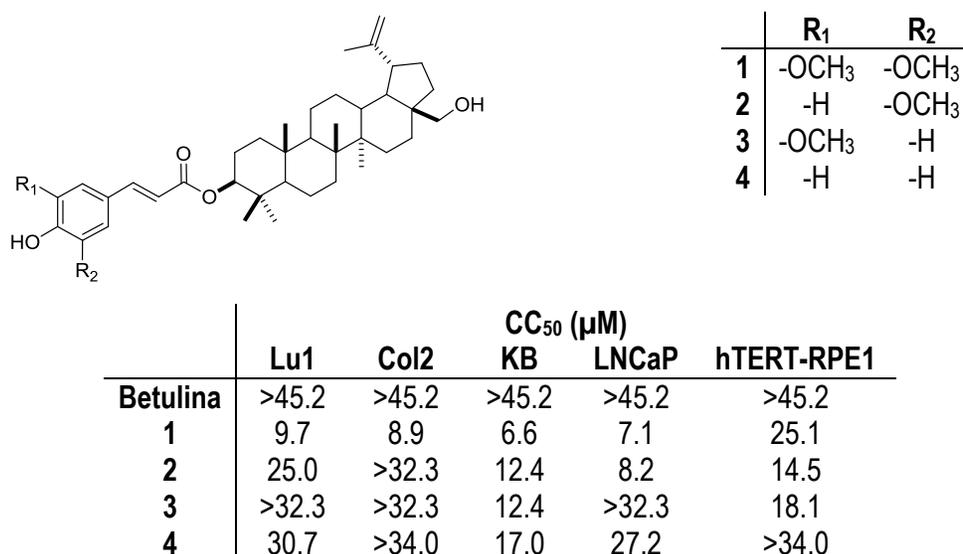
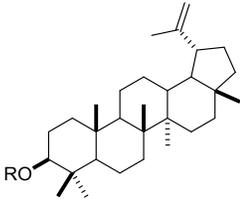


Figura. 4.9 Derivados de betulina en C-3 y coumaroilo y su actividad citotóxica (Hwang *et al.*, 2003).

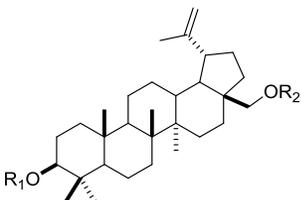
En un trabajo realizado por Gauthier *et al.* (2006) se derivatizaron 23 compuestos de esqueleto lupano a los cuales se unieron monosacáridos en diferentes sitios de su estructura química. De esta manera, se pudo hacer un análisis de la actividad biológica y de los grupos funcionales presentes en las estructuras de los derivados, observándose que para compuestos base de lupeol (Figura 4.10) la presencia en particular de los monosacáridos β -D-glucopiranososa y α -D-arabinopiranososa incrementa la actividad biológica al compararse con su aglicona análoga, sin embargo, con la presencia de α -L-rhamnopiranososa la actividad es desfavorable.



	R ₁	CC ₅₀ (μM)		
		A-549	DLD-1	B16F1
1	H	165.0	125.0	104.0
2	Glu	14.0	14.0	15.0
3	Rha	>178	>178	>178
4	Ara	28.0	50.0	27.0

Figura. 4.10 Derivados glicosilados en el C-3 de lupeol y su actividad citotóxica (Gauthier *et al.*, 2006).

Por otro lado, al hacer la comparación con análogos de la betulina, la presencia de grupos acetilo, ya sea en el C-3 o en el C-28, decrementa la actividad; efecto similar se observa al unir monosacáridos en el C-3 o en el C-28 al ser comparada con su esqueleto base, por lo tanto, el efecto citotóxico es desfavorable con la presencia ya sea de grupos acetilo o de monosacáridos (Figura 4.11) (Gauthier *et al.*, 2006).

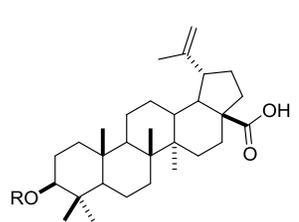


	R ₁	R ₂	CC ₅₀ (μM)		
			A-549	DLD-1	B16F1
1	H	H	3.8	6.6	13.8
2	Ac	Ac	>95	>95	>95
3	H	Ac	75.0	56.0	43.0
4	Ac	H	>253	>253	>253
6	Glu	H	>200	>200	>200
7	Rha	H	22.0	5.0	18.0
8	Ara	H	41.0	63.0	38.0
9	H	Glu	>248	>248	>248
10	H	Rha	>228	>228	>228
11	H	Ara	>175	>175	>175

Figura. 4.11 Derivados glicosilados y acetilados de betulina en el C-3 y C-28 y su actividad citotóxica (Gauthier *et al.*, 2006).

Estos resultados sugieren que la presencia del alcohol en C-28 de la betulina es importante para la citotoxicidad y, por lo tanto, el acoplamiento de un monosacárido no es una modificación deseable en esta posición.

En cuanto al ácido betulínico, la actividad se mejora considerablemente al realizar la unión con α -L-rhamnopiranososa en el C-3, caso contrario al unir β -D-glucopiranososa en la misma posición, mostrando una nula actividad biológica (Figura 4.12) (Gauthier *et al.*, 2006).

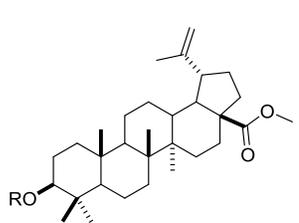


The chemical structure shows a complex polycyclic steroid-like core with a carboxylic acid group at C-28 and a variable group R₁ at C-3. The R₁ group is defined in the adjacent table as H, Glu, Rha, or Ara.

	R ₁	CC ₅₀ (μM)		
		A-549	DLD-1	B16F1
1	H	10.3	15.0	16.1
2	Glu	>178	32.0	49.0
3	Rha	2.6	3.9	3.9
4	Ara	10.0	17.0	11.0

Figura. 4.12 Derivados glicosilados de ácido betulínico en el C-3 y su actividad citotóxica (Gauthier *et al.*, 2006).

Por último, el derivado del ácido betulínico, el metil betulinato, mejora su efecto al presentar β -D-glucopiranososa en el C-3 y éste es desfavorecido al tener en el C-3 a α -L-rhamnopiranososa (Figura 4.13) (Gauthier *et al.*, 2006).



The chemical structure shows a complex polycyclic steroid-like core with a methyl ester group at C-28 and a variable group R₁ at C-3. The R₁ group is defined in the adjacent table as H, Glu, Rha, or Ara.

	R ₁	CC ₅₀ (μM)		
		A-549	DLD-1	B16F1
1	H	19.0	25.0	26.1
2	Glu	8.4	3.9	7.1
3	Rha	59	>183	55
4	Ara	13.5	18.0	13.3

Figura. 4.13 Derivados glicosilados de metil betulinato en el C-3 y su actividad citotóxica (Gauthier *et al.*, 2006).

Siguiendo con las modificaciones en la estructura química de los lupanos, en un estudio realizado por Kim *et al.* (1998) se realizaron modificaciones químicas en los C-3, C-20, C-29 y C-28 del ácido betulínico (Figura 4.14), en donde se observó que solamente dos compuestos mostraron una mejora en la citotoxicidad en la línea celular de melanoma (MEL-2), los cuales tienen como característica principal la oxidación en el C-3 de alcohol a cetona y la presencia del ácido carboxílico en el C-28, y, además, la actividad es potenciada al reducir el doble enlace entre los C-20 y C-29.

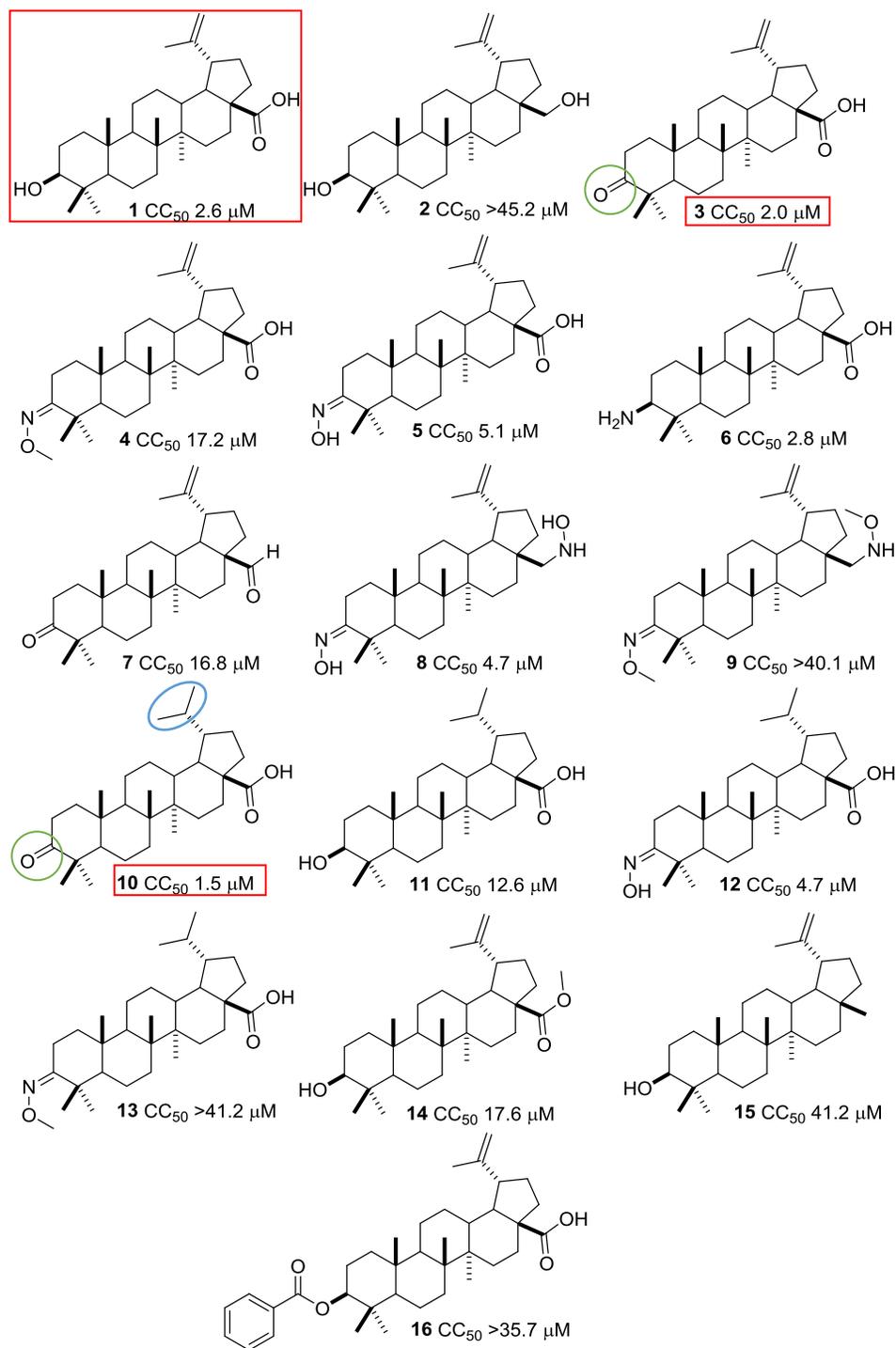


Figura. 4.14 Derivados de ácido betulínico y su actividad citotóxica en células de melanoma (MEL-2) (Kim *et al.*, 1998).

Recopilando la información anterior, se demuestra que las simples modificaciones de la estructura original de un triterpeno de esqueleto lupano, como por ejemplo del ácido betulínico, pueden mejorar el perfil de citotoxicidad. Sin embargo, es necesario realizar

investigaciones más extensas, utilizando un mayor número de análogos y evaluando en un grupo similar de líneas celulares, para poder realizar una mejor comparación entre ellos y para posteriormente poder hacer un efectivo estudio de relación estructura actividad (SAR) y un diseño de modificación para un mejor agente citotóxico.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación de los metabolitos aislados (I-XI) no es posible concluir que dichos metabolitos sean o no citotóxicos, pues como se observó en los ejemplos anteriormente presentados, aquellos compuestos que no presentaron actividad en estas líneas celulares podrían tener actividad en otras líneas de células cancerígenas, en especial el compuesto **IX** (ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico), ya que resultó ser el más abundante de la especie *P. vernicosum*, y es uno de los compuestos que presentó un mayor efecto citotóxico (KB, CC₅₀ = 11.4 μ g/mL) y posiblemente es el compuesto que le está confiriendo actividad al extracto metanólico crudo (KB, CC₅₀ = 29 μ g/mL), e incluso, debido a la presencia de oxidaciones en C-3, C-24 y C-28, sería un buen candidato a modificaciones estructurales para modular así su actividad biológica.

4.2 CONCLUSIONES

Las fracciones orgánicas, hexánica, diclorometánica y de acetato de etilo, del extracto de las partes aéreas de *Phoradendron vernicosum* son ricas en triterpenos, ya que principalmente se aislaron triterpenos de esqueleto lupano, de los cuales tres son novedosos: ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**IX**), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (**X**) y ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**XI**). Asimismo, se reporta por primera vez el triterpeno 28-O-acetil-betulona (**XIX**) a partir de una fuente natural.

Se aislaron 15 compuestos conocidos, de los cuales diez son de naturaleza terpénica: lupenona (**I**), ácido betulínico (**II**), ácido 3-*epi*-betulínico (**III**), ácido dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (**IV**), betulona (**V**), ácido betulónico (**VI**), ácido oleanólico (**VII**), betulina (**VIII**), 28-*nor*-lup-20(29)-en-3 α -17 β -diol (**XII**) y lupeol (**XVIII**). Debido a la abundancia de compuestos aislados de esqueleto lupano, se infiere que el metabolismo de la especie *P. vernicosum* se concentra principalmente en la producción de triterpenos.

El aislamiento de cinco compuestos hidroxilados (compuestos **XIII-XVII**), reportados por primera vez para el género *Phoradendron*, constituyen una importante contribución a la

fitoquímica del género, siendo novedosos los diasterómeros de 2-metilpentano-2,3,4-triol (compuestos **XV** y **XVI**).

La presencia de la naringenina (**XX**), un flavonoide ubicuo en la naturaleza, en *P. vernicosum* no es sorprendente, ya que en otras especies del género se reportan diversos tipos de metabolitos de la ruta del ácido shikímico.

Los tres lupanos novedosos poseen la peculiaridad de tener oxidaciones específicas en los metilos unidos al C-4 (CH₃-23 y CH₃-24), lo que indica que en *P. vernicosum* ocurren oxidaciones en regiones determinadas.

El compuesto **IX**, ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico, resultó ser el más abundante y está presente en las tres fracciones orgánicas (Hx, CH₂Cl₂ y AcOEt), por lo que podría ser considerado como un marcador quimiotaxonómico de la especie.

Todos los metabolitos evaluados frente al panel de líneas celulares cancerígenas se clasifican como no activos, debido a que presentan una CC₅₀ y CI₅₀ mayor a 10 μ M.

4.3 PERSPECTIVAS

Evaluar los metabolitos obtenidos con otras líneas celulares de cáncer para determinar otros posibles blancos.

Con base en el alto rendimiento del ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**IX**), éste puede ser utilizado para realizar modificaciones químicas.

Evaluar las actividades citotóxica y antiproliferativa de los derivados obtenidos de las modificaciones estructurales realizadas al ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**IX**) en un panel de líneas celulares de cáncer.

BIBLIOGRAFIA

- Abaza, M. S. I., Orabi, K. Y., Al-Quattan, E., Al-Attayah, R. J. (2015). Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer. *Cancer cell international*, 15, 1-19.
- Abbas, J. (2011). Anticancer evaluation of plants from Indonesian tropical rain forests. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2, 310-318.
- Abdel Bar, F. M., Khanfar, M. A., Elnagar, A. Y., Lui, H., Zaghloul, A., Badria, F. A., Sylveter, P. W., Ahmad, K. F., Raisch, K. P., El Sayed, K. A. (2009). Rational design and semithynthesis of Betulinic acid analogues as potent topoisomerase inhibitors. *Journal of Natural Products*, 72, 1643-1650.
- Abdel Bar, F. M., Zaghloul, A. M., Bachawal, S. V., Sylveter, P. W., Ahmad, K. F., El Sayed, K. A. (2008). Antiproliferative triterpenes from *Melaleuca ericifolia*, *Journal of Natural Products*, 71, 1787-1790.
- Ahamad, M. S., Siddiqui, S., Jafri, A., Ahmad, S., Afzal, M., Arshad, M. (2014). Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest, *PLOS ONE*, 9, 1-8.
- Ahmad, S., Sukari, M. A., Ismail, N., Ismail, I. S., Abdul, A. B., Bakar, M. F. A., Kifli, N., Ee, G. C. L. (2015). Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and their biological activities, *Complementary and Alternative Medicine*, 15, 1-8.
- Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (2002) *Biología Molecular de la Célula*. Omega. México. pp. 1345-1363.
- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrencillas-Torres, L., Erazo-V., A. E. (2012). Mortalidad por cáncer en México 2000-2010 el recuento de los daños. *GAMO*. 11, 371-379.
- Alonso-Castro, A. J., Juárez-Vázquez, M. C., Domínguez, F., González-Sánchez, I., Estrada-Castillón, E., López-Toledo, G., Chávez, M., Cerbón M. A., García-Carranca, A. (2012). The antitumoral effect to the American mistletoe

- Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 857-864.
- Alvarado-Cárdenas, L. O. (2010). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo, 75, 1-37.
- Arellano-Rodríguez, J., Flores-Guido, J., Tun-Garrido, J., Cruz-Bojorquez, M. (2003). Leguminosae. In: *Etnoflora Yucatanense, Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 399.
- Arul, D., Subramanian, P. (2013). Naringenin (Citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells, *Pathology and Oncology Research*, 19, 763-770.
- Ayatollahi, A. M., Ghanadian, M., Afshatypour, S., Abdella, O. M., Mirzai, M., Askari, G. (2011). Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 287-294.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.
- Borowski, E., Bontemps-Gracz, M. M., Piwkowska, A. (2005). Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 609-627.
- Boryczka, S., Bebenek, E., Wietrzyk, J., Kempinska, K., Jastrzebska, M., Kusz, J., Nowak, M. (2013). Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. *Molecules*, 18, 4526-4543.
- Bugelski, P.J., Atif, U., Molton, S., Toeg, I., Lord, P.G., Morgan, D.G. (2000). A strategy for primary high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. *Pharmaceutical Research* 17, 1265-1272.

- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S. R., Moo-Puc, R. (2011). Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 719-724.
- Caligiani, A., Malvasi, G., Palla, G., Marseglia, A., Tognolini, M., Bruni, R. (2013). A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chemistry*, 136, 735-741.
- Cao, S., Guza, R. C., Miller, J. S., Andriantsiferana, R., Rasamison, V. E., Kingston, D. G. I. (2004). Cytotoxic triterpenoids from *Acridocarpus vivy* from the Madagascar rain forest, *Journal of Natural Products*, 67, 986-989.
- Cháirez-Ramírez, M. H., Moreno-Jiménez, M. R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Gúzman, N. E. (2016). Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A Review, *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 15, 758-771.
- Chaturvedi, P. K., Bhui, K., Shukla, Y. (2008). Lupeol: Connotations for chemoprevention, *Cancer Letters*, 263, 1-13.
- Ching-Kuo, L. (1998). A new norlupene from the leaves of *Melaleuca leucadendron*, *Journal of Natural Products*, 61, 375-376.
- Choi, S. Z., Yang, M. C., Choi, S. U., Lee, K. R. (2006). Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia*, *Archives of Pharmacal Research*, 29, 203-208.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60, 52-60.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. (2002). *Drugs from nature: past achievements, future prospects*. En Iwu, Wootton (Eds.), *Ethnomedicine and Drug Discovery*., Elsevier Science. USA. pp. 24-25, 27.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72-79.

- Da Costa, F. J., Bandeira, P. N., Albuquerque, M. R. J. R., Pessoa, O. D., Silveira, E. R., Braz-Filho, R. (2008). Constituintes químicos de *Vernonia chalybaeae* Mart. Química Nova, 31, 1691-1695.
- Da Rocha, A. B., Lopes, R. M., Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. Current Opinion Pharmacology, 1, 364-369.
- Damle, A. A., Pawar, Y. P., Narkar, A. A. (2013). Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. Indian Journal of Experimental Biology, 51, 485-491.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., Barton, M. (2005) The role of radiotherapy in cancer treatment, estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. Cancer, 104, 1129-1137.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Segunda ed., Londres, Reino Unido, Wiley. pp. 3, 22, 217-219.
- Dossaji, S. F., Becker, H., Exner, J. (1983) Flavone C-glycosides of *Phoradendron tomentosum* from different host tree. Phytochemistry, 22, 311-312.
- Drag, M., Surowiak, P., Drag-Zalesinska, M., Dietel, M., Lage, H., Oleksyszyn, J. (2009). Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. Molecules, 14, 1639-1651.
- Du, Y. C., Lin, A. S., Wu, C. C., Hsieh, P. W., Chen, Y. H., Chen, I. H., Chen, S. L., Yen, H. F., Lübken, T., Chang, F. R., Wu, Y. C. (2009). New cytotoxic lupane triterpenes from *Perrottetia arisanensis*, Planta Medica, 75, 848-855.
- Eastman Chemical Products. (1962). We call it Texanol a 12-carbon Eastman ester/alcohol. Chemical and Engineering News, 40, 4.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Führer, M., Debatin, K. M., Jeremias, I. (2004). Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. Leukemia, 18, 1406-1412.
- Fahad-Ullah, M. (2008). Cancer Multidrug Resistance (MDR): A major impediment to effective chemotherapy. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 9, 1-6.

- Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1096-1107.
- Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nuñez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E., Debatin, K. M. (1997). Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in Neuroectodermal Tumors. *Cancer Research*, 57, 4956-4964.
- Furbacher, T. R. (2001). Bioassay-guided Isolation of Potential Antineoplastic Natural Products from Southwestern plants. Tesis de Doctorado. The University of Arizona, Arizona, EUA. pp. 47-65.
- García-Cámara, I. G. (2014). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos con actividad citotóxica de *Phoradendron vernicosum*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. pp. 27-91.
- García-Regalado, G. (1998) La familia Loranthaceae (Injertos) del estado de Aguascalientes. *Polibotánica*, 7, 1-14.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P., Pichette, A. (2006). Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 6713-6725.
- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9, 767-776.
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 53, 615-627.
- Graham, J. G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2000). Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 347-377.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- Harbone, J. B. (1998). *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Tercera ed., Chapman & Hall, London. pp. 1, 2, 31, 35, 36, 129.

-
- Hashem, F. A., Sengab, A. E., Shabana, M. H., Khaled, S. (2012). Antioxidant activity of *Mayodendron igneum* Kurz and the cytotoxicity of the isolated terpenoids, *Journal of Medicinally Active Plants*, 1, 88-97.
- Hata, K., Hori, K., Ogasawara, H., Takahashi, S. (2003). Anti-leukemia activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene, *Toxicology letters*, 143, 1-7.
- Hata, K., Hori, K., Takahashi, S. (2002). Differentiation-and Apoptosis-Inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line, *Journal of Natural Products*, 65, 645-648.
- Hata, K., Ogawa, S., Makino, M., Mukaiyama, T., Hori, K., Iida, T., Fujimoto, Y. (2008). Lupane triterpenes with a carbonyl group at C-20 induce cancer cell apoptosis. *Journal of Natural Medicine*, 62, 332-335.
- Heinrich, M., Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal Pharmacy Pharmacology*, 53, 425-432.
- Hejmadi, M. (2013). *Introduction to Cancer Biology*. (2 ed.) Denmark: Ventus Publishing. pp. 7.
- Hernández-Menéndez, M., Ríos-Hernández, M. A. (1999). Oncogenes y cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 15, 131-139.
- Herz, W., Santhanam, P. S., Wahlberg, I. (1972). 3-*epi*-betulinic acid, a new triterpenoid from *Picramia pentandra*, *Phytochemistry*, 11, 3061-3063.
- Hull, R. J., Leonard, O. A. (1964a). Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*). I. The carbohydrate nutrition of mistletoe, *Plant Physiology*, 996-1007.
- Hull, R. J., Leonard, O. A. (1964b) Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*). II. The photosynthetic capacity of mistletoe, *Plant Physiology*, 1008-1017.
- Hwang, B. Y., Chai, H-B., Kardono, L. B. S., Riswan, S., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (2003). Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*, *Phytochemistry*, 62, 197-201.

- Ibrahim, A. Y., El-Gengaihi, S. E., Motawe, H. M. (2011). Phytochemical and cytotoxicity investigations of *Salvadora persica* bark extracts, *JASMR*, 6, 127-133.
- Jacobo-Salcedo, M. R., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Álvarez, C., Gonzáles-Espíndola, L. A., Domínguez, F., Maciel-Torres, S. P., García-Luján, C., González-Martínez, M. R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., García-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications*, 6, 1925-1928.
- Jeong, H.-J., Chai, H.-B., Park, S.-Y., Kim, D. S. H. L. (1999). Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9, 1201-1204.
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., Ishikawa, M. (2005). Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 527-530.
- Karpova, M. B., Sanmun, D., Henter, J. I., Smirnov, A. F., Fadeel, B. (2006). Betulinic acid, a natural cytotoxic agent, fails to trigger apoptosis in human Burkitt's lymphoma-derived B-cell lines, *International Journal of Cancer*, 118, 246-252.
- Kashiwada, Y., Wang, H.-K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Consentino, L. M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C.-Q., Yeh, E., Lee, K.-H. (1998). Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of Oleanolic acid, Pomolic acid and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 61, 1090-1095.
- Kessler, J. H., Mullauer, F. B., De Roo, G. M., Medema, J. P. (2007). Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types, *Cancer Letters*, 251, 132-145.
- Kim, D. S. H. L., Pezzuto, J. M., Pisha, E. (1998). Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8, 1707-1712.

-
- Kim, J. Y., Koo, H.-M., Kim, D. S. H. L. (2001). Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11, 2405-2408.
- Kocyigit, A., Koyuncu, I., Dikilitas, M., Bahadori, F., Turkkan, B. (2016). Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of narigenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines, *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 6, 872-880.
- Korovin, A. V., Tkachev, A. V. (2001). Synthesis of quinoxalines fused with triterpenes, ursolic acid and betulin derivatives, *Russian Chemical Bulletin*, 50, 304-310.
- Kuijt, J. (2003). Monograph of *Phoradendron* (Viscaceae). *Systematic Botany Monographs*, 66, 1, 177, 475, 501.
- Lage, H., Duarte, N., Coburger, C., Hilgeroth, A., Ferreira, M. J. U. (2010). Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 17, 441-448.
- Li, A. J. (1993). Tumor Suppressor genes, *Annual Review of Biochemistry*, 62, 623-651.
- Li, J., Gou, W.-J., Yang, Q.-Y. (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15, *World Journal Gastroenterology*, 8, 493-495.
- Li, Y., He, Y., Huang, Y., Zhen, D., Gao, C., Cui, L., Jin, Y.-H. (2010). Betulin induces mitochondrial cytochrome C release associated apoptosis in human cancer cell, *Molecular carcinogenesis*, 49, 630-640.
- Liscovitch, M., Lavie, Y. (2002). Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research. *IDrugs*, 5, 1-7.
- Liu, Y., Bi, T., Wang, G., Dai, W., Wu, G., Qian, L., Gao, Q., Shen, G. (2015). Lupeol inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic cancer PCNA-1 cells through AKT/ERK pathways, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388, 295-304.
- Liu, Y., Luo, W. (2012). Betulinic acid induces Bax/Bak-independent cytochrome c release in human nasopharyngeal carcinoma cells, *Molecules and Cells*, 33, 517-524.

- López-Martínez, S., Navarrete-Vázquez G., Estrada-Soto, S., León-Rivera, I., Ríos, M. Y. (2013). Chemical constituents of hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). *Natural Product Research*, 27, 130-136.
- Maltese, F., Erkelens, C., Kooy, F. V. D., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2009). Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy, *Food chemistry*, 116, 575-579.
- Mena-Rejón, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., Moo-Puc, R. (2009). *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 462-465.
- Moldoveanu, S. (2014). The Utilization of Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Profiling of Several Antioxidants in Botanicals. En: *Advances in Gas Chromatography*, Guo, X., (ed). Intech. USA. pp. 117-119.
- Moreira, D. L., Schaaf Teixeira, S., Monteiro, H. D., De-Oliveira, A. C. A. X., Paumgarten, F. J. R. (2014). Traditional use and safety of herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 248-257.
- Mukherjee, R., Jaggi, M., Rajendran, P., Siddiqui, M. J. A., Srivastava, S. K., Vardhan, A., Burman, A. C. (2004). Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 2181-2184.
- Musarrat, J., Aqil, F., Ahmad, I. (2006). Mutagenicity and antimutagenicity of medicinal plants, en *Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs*, Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M. (eds). Wiley-VCH. Gran Bretaña. pp. 271-273.
- Mutai, C., Abatis D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., Roussi, V. (2004). Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*, *Phytochemistry*, 65, 1159-1164.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981-2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.

- Newman, D. J., Cragg, G. M., Kenneth, M. S. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*, 17, 215-234.
- Nirmala, M. J., Samundeeswari, A., Deepa Sankar, P. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology*, 1, 1-14.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59, 365-378.
- Osadao, R. (1834). *El Libro del Judío Medicina Doméstica, Descripción de las Virtudes de las Yervas Medicinales de Yucatán*. Additional notes of Dr. Andrew Heath de Zapata, Mérida, Yucatán, México. pp. 20-25.
- Patwardhan, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 50-52.
- Peng, C., Bodenhausen, G., Qiu, S., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Yuan, S., Zheng, C. (1998). Computer-Assisted Structure Elucidation: Application of CISOC-SES to the Resonance Assignment and Structure Generation of Betulinic Acid, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 36, 267-278.
- Pereira, F. B. M., Domingues, F. M. J., Silva, A. M. S. (1996). Triterpenes from *Acacia dealbata*. *Natural Products Letters*, 8, 97-103.
- Pettit, G. R., Melody, N., Hempenstall, F., Chapuis, J.-C., Groy, T. L., Williams, L. (2014). Antineoplastics agents. 595. Structural modifications of betulin and the X-ray crystal structure of an unusual betulin amine dimer, *Journal Natural Products*, 77, 863-872.
- Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B., Matsuda, S. P. T. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current opinion in plant biology*, 9, 305-314.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.-S., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D., Brown, D. M., Wani, M. C.,

-
- Wall, M. E., Heiken, T. J., Das Gupta, T. K., Pezzuto, J. M. (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nature Medicine*, 1, 1046-1051.
- Pohjala, L., Alakurtti, S., Ahola, T., Yli-Kauhaluoma, J., Tammela, P. (2009). Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication, *Journal of Natural Products*, 72, 1917-1926.
- Potze, L., Mullauer, F. B., Colak, S., Kessler, J. H., Medema, J. P. (2014). Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response, *Cell Death and Disease*, 5, 1-8.
- Pyo, J. S., Roh, S. H., Kim, D. K., Lee, J. G., Lee, Y. Y., Hong, S. S., Kwon, S. W., Park, J. H. (2009). Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry, *Planta Medica*, 75, 127-131.
- Raderer, M.; Scheithauer, W. (1993). Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. *Cancer*, 72, 3553-3563.
- Rajamanickam, B., Kuo, A. L. Richard Y., Kheng-Wei, Y. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9, 193-199.
- Ramawat, K. G.; Goyal, S. (2009). Natural products in cancer chemoprevention and chemotherapy. En Ramawat, K. G (ed.), *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer. India. pp. 153-164.
- Rauth, S., Ray, S., Bhattacharyya, S., Mehrotra, D. G., Alam, N., Mondal, G., Nath, P., Roy, A., Biswas, J., Murmu, N. (2016). Lupeol evokes anticancer effects in oral squamous cell carcinoma by inhibiting oncogenic EGFR pathway, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417, 97-110.
- Ríos, M. Y., Salinas, D., Villarreal, M. L. (2001). Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3,4-*seco*-olean-18-ene-3,28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Medica*, 67, 443- 446.

- Rizo-Ríos, P., González-Rivera, A.; Sánchez-Cervantes, F.; Murguía-Martínez P. (2015). Trends in cáncer mortality in Mexico: 1990-2012. *Revista Médica del Hospital General*, 78, 85-94.
- Rugo, H. S. (2007). *Cáncer Laboral (Ed.) Diagnóstico y Tratamiento en Medicina Laboral y Ambiental. Manual Moderno: México.* pp. 241-257.
- Rzeski, W., Stepulak, A., Szymanski, M., Juszcak, M., Grabarska, A., Sifringer, M., Kaczor, J., Kandefer-Szerszen, M. (2009). Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines *in vitro*. *Basic and Clinical pharmacology and Toxicology*, 105, 425-432.
- Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types, *Pharmacognosy Review*, 8, 122-146.
- Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters*, 285, 109-115.
- Saleem, M., Kaur, S., Kweon, M.-H., Adhami, V. M., Afaq, F., Mukhtar, H. (2005a). Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway, *Carcinogenesis*, 26, 1956-1964.
- Saleem, M., Kweon, M.-H., Yun, J.-M., Adhami, V. M., Khan, N., Syed, D. N., Mukhtar, H. (2005b). A novel dietary triterpene lupeol induces Fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. *Cancer Research*, 65, 11203-11213.
- Salin, O., Alakurtti, S., Pohjala, L., Siiskonen, A., Maass, V., Maass, M., Yli-Kauhaluoma, J., Vourela, P. (2010). Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae*. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1141-1151.
- Salvador, J. A. R., Moreira, V. M., Goncalves, B. M. F., Leal, A. S., Jing, Y. (2012). Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Natural Products Report*, 29, 1463-1479.

- Satiraphan, M., Pamonsinlapatham, P., Sotanaphun, U., Sittisombut, C., Raynaud, F., Garbay, C., Michel, S., Cachet, X. (2012). Lupane triterpenes from the leaves of tropical rain forest tree *Hopea odorata* Roxb. and their cytotoxic activities. *Biochemical Systematic and Ecology*, 44, 407-412.
- Setzer, W. N., Setzer, M. C. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 540-556.
- Shiojima, K., Suzuki, H., Kodera, N., Kubota, K., Tsushima, S., Ageta, H., Chang, H.-C., Chen, Y.-P. (1994). Composite constituent: novel triterpenoid, 17-*epi*-lupenyl acetate, from aerial parts of *Ixeris chinensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 2193-2195.
- Soica, C., Dehelean, C., Danciu C., Wang, H. M., Wenz, G., Ambrus, R., Bojin, F., Anghel, M. (2012). Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in *in vitro* and *in vivo* tumor models. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14992-15011.
- Tan, Y. M., Yu, R., Pezzuto, J. M. (2003). Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical Cancer Research*, 9, 2866-2875.
- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., Wacheck, V., Selzer, E. (2003). Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells, *Head and Neck*, 25, 732-740.
- Tijjani, A., Ndukwe, I. G., Ayo, R. G. (2012). Isolation and characterization of Lup-20(29)-ene-3,28-diol (betulin) from the stem-bark of *Adenium obesum* (Apocynaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11, 259-262.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinical*, 65, 87-108
- Trelease, W. (1916) The genus *Phoradendron*. A monographic revision, pp 7-19, 99-100.

- Tsuda, Y., Sano, T., Isobe, K., Miyauchi, M. (1974). Triterpenoid Chemistry. VII. Classification of triterpenoid 1,3-glycol acetonides by NMR Spectra. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 22, 2396-2401.
- Urban, M., Sarek, J., Klinot, J., Korinkova, G., Hajduch, M. (2004). Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity, *Journal of Natural Products*, 67, 1100-1005.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., Capellá, G. (2010). Recent advances in cáncer therapy: An Overview, *Current Pharmaceutical Desing*, 16, 3-10.
- Valencia-Chan, L. S., García-Cámara, I., Torres-Tapía, L. W., Moo-Puc, R. E., Peraza-Sánchez, S. R. (2017). Lupane-Type Triterpenes of *Phoradendron vernicosum*, *Journal of Natural Products*, 80, 3038-3042.
- Varela, B. G., Fernández, T., Ricco, R. A., Cerdá Zolezzi, P., Hajos, S. E., Gurni, A. A., Alvarez, E., Wagner, M. L. (2004). *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 109-116.
- Vázquez-Collazo, I., Villa Rodríguez, A., Madrigal Huendo, S. (2006). Los Muerdagos (Loranthaceae) en Michoacán, Litho Quality. México. pp. 11-52.
- Vicent, T., DeVita, Jr., Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 68, 8643-8653.
- Wada, S., Iida, A., Tanaka, R. (2001). Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity, *Journal of Natural Products*, 64, 1545-1547.
- Wang, X., Zhang, S., Li, J., Lui, H., Xie, X., Nan, F. (2014). Highly lipophilic 3-*epi*-betulinic acid derivatives as potent and selective TGR5 agonists with improved cellular efficacy, *Acta Pharmacologica Sinica*, 35, 1463-1472.

-
- Weber, D., Zhang, M., Zhuang, P., Zhang, Y., Wheat, J., Currie, G., Al-Eisawi, Z. (2014). The efficacy of betulinic acid in triple-negative breast cancer, *SAGE Open Medicine*, 2, 1-12.
- Weinberg, R. A. (1994). *Oncogenes and tumor suppressor genes*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 44, 160-170.
- Wiemann, J., Heller, L., Perl, V., Kluge, R., Ströhl, D., Csuk, R. (2015). Betulinic acid derived hydroxamates and betulin derived carbamates are interesting scaffolds for the synthesis of novel cytotoxic compounds, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 106, 194-210.
- Wu, Q., He, J., Fang, J., Hong, M. (2010). Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cell *in vitro*, *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical*, 30, 453-457.
- Xu, R., Fazio, G. C., Matsuda, S. P. T. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.
- Xu, T., Pang Q., Zhou, D., Zhang, A., Luo, S., Wang, Y., Xiufeng, Y. (2014). Proteomic investigation into Betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells, *PLOS one*, 9, 1-11.
- Yang, G. E., Chen, B., Zhang, Z., Gong, J., Bai, H., Li, J., Wang, Y., Li, B. (2009). Cytotoxic activities of extracts and compounds from *Viscum coloratum* and its transformation products by *Rhodobacter sphaeroides*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152, 353-365.
- Yook, C.-S., Liu, X.-Q., Chang, S.-Y., Park, S.-Y., Nohara, T. (2002). Lupane-triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1383-1385.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products, *Molecules*, 21, 559, 1-18.

Zhang, H., Zhu, P., Liu, J., Yang, X., Xu, S., Yao, H., Jiang, J., Ye, W., Wu, X., Xu, J. (2014). Synthesis and antitumor activity of novel 3-oxo-23-hydroxybetulinic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 159-167.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., Formelli, F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letter*, 175, 17-25.