

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Evaluación citotóxica de metabolitos
aislados de plantas usadas en la medicina
tradicional maya para el tratamiento de
síntomas sugerentes a cáncer**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en
Ciencias presenta:**

QFB. Edgar Emmanuel Caamal Fuentes

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Merida, Yucatán, Mexico

2012



Mérida, Yucatán, México, a 27 de marzo de 2012.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos 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:  _____

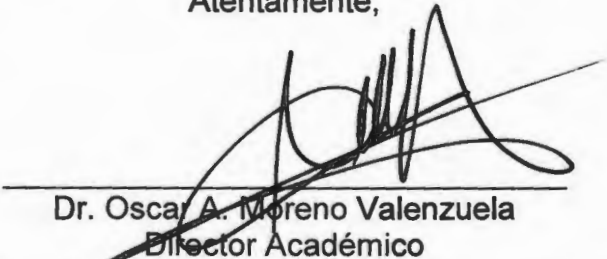
Nombre: Edgar Casimiro Fuentes

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN,
A.C. POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“Evaluación citotóxica de metabolitos aislados de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes a cáncer”** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los Drs. Sergio Rubén Peraza Sánchez y Rosa Esther Moo Puc, dentro de la Opción en Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosa E. Moo Puc, por todas sus valiosas enseñanzas y consejos en la realización del presente trabajo, gracias por su paciencia, su amistad y la confianza depositada en mí.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las instalaciones e infraestructura brindadas en la realización de este trabajo.

A la Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Tellez del Instituto Mexicano del Seguro Social y al jefe de la Unidad Dr. Roberto Cedillo Rivera, por las instalaciones prestadas en la realización de los ensayos biológicos.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia de la Unidad de Biotecnología del CICY, por su apoyo técnico en la realización del trabajo de laboratorio.

Al H. Comité Revisor de Tesis, integrado por la Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dra. Rocío Borges Argáez, Dr. Felipe Barahona Pérez, Dr. Gumersindo Mirón López y Dr. Miguel Rosado Vallado.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

A mis compañeros y amigos del posgrado: Abril Díaz, Arely Vargas, Ana Ruiz, Cecilia Guízar, Andres Uc, Alejandro Yam, Carlos Quintal e Ignacio Hernández por todos los momentos y experiencias compartidas.

Al M. en C. Juan Chalé, por su apoyo en la realización de los ensayos biológicos.

A todos mis profesores por los conocimientos transmitidos a lo largo del doctorado.

Al todo el personal administrativo del CICY, en especial a Landy Rodríguez y Alejandra Arceo.

DEDICATORIAS

A mi familia.

A mi madre, Socorro Mireya Fuentes Cardeña, gracias por ser mi mejor amiga, maestra, confidente, un gran ejemplo de ser humano, por todo tu amor y comprensión a lo largo de toda mi vida. Así como por enseñarme que no existen imposibles, sólo metas a largo plazo.

A mi padre Tomas Rubén Caamal Madera (q.e.p.d.), porque aunque no estés con nosotros me dejaste tu legado más importante, tu cariño, enseñanzas y tu recuerdo en los momentos más difíciles. Te dedico en tu memoria el presente trabajo.

A mi amada esposa Adriana del Carmen Ruiz Guzmán, por tu ternura, amor y apoyo en todo momento. Gracias por darme ánimo todos los días al levantarme y cobijarme con tu abrazo al terminar la jornada. *Je t'aime, tu sais que toutes mes réalisations sont aussi les vôtres.*

A todos los que de una u otra forma han contribuido en la realización de esta tesis.

INDICE

	Página
Índice	i
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Referencias	4
CAPITULO I	7
Antecedentes	7
1.1. Productos naturales como fuente de nuevos anti-cancerígenos	7
1.2. Estrategias para la búsqueda de nuevos fármacos	15
1.3. Medicina tradicional y cáncer	16
1.4. Objetivos	18
1.4.1. Objetivo general	18
1.4.2. Objetivos particulares	18
1.5. Hipótesis	19
1.6. Estrategia experimental	20
1.7. Referencias	21
CAPITULO II	23
Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms	23
2.1. Introduction	24
2.2. Materials and methods	24
2.2.1. Ethnobotanical search	24
2.2.2. Plant material	25
2.2.3. Preparation of extracts	25
2.2.4. Preparation of stock solution	25
2.2.5. Cell culture	25
2.2.6. Cytotoxicity assay	27
2.3. Results and discussion	27
2.4. Conclusions	33
2.5. References	34
CAPÍTULO III	39
Bonediol, a new alkyl catechol from <i>Bonellia macrocarpa</i>	39

3.1. Introduction	39
3.2. Results and discussion	40
3.3. Experimental	42
3.3.1. General	42
3.3.2. Plant material	42
3.3.3. Extraction and isolation	42
3.3.4. Antiproliferative activity	43
3.4. References	44
CAPÍTULO IV	45
Estudio fitoquímico de la partición hexánica de <i>Bonellia macrocarpa</i>	45
4.1. Antecedentes	45
4.1.1. Familia Theophrastaceae	45
4.1.2. Genero <i>Bonellia</i>	45
4.1.3. Especie <i>Bonellia macrocarpa</i> Cav.	45
4.1.4. Clasificación taxonómica	45
4.2. Material y métodos	46
4.2.1. Reactivos e instrumentación	46
4.2.2. Extracción masiva de <i>B. macrocarpa</i>	47
4.2.2.1. Material vegetal	47
4.2.2.2. Procesamiento del material vegetal	47
4.2.3. Evaluación de la actividad citotóxica de la partición hexánica	47
4.2.4. Obtención de los compuestos I, III y la fracción II	47
4.3. Resultados y discusión	49
4.3.1. Obtención de la colecta masiva de <i>B. macrocarpa</i>	49
4.3.2. Aislamiento de los compuestos mayoritarios de la partición hexánica de la colecta masiva de <i>B. macrocarpa</i>	51
4.3.1. Compuesto I	52
4.3.2. Fracción II	53
4.3.3. Compuesto III	54
4.4. Conclusiones	55
4.5. Referencias	56
CAPÍTULO IV	57
Estudio fitoquímico de la partición hexánica de <i>Aeschynomene fascicularis</i>	57
5.1. Antecedentes	57
5.1.1. Familia Fabaceae	57
5.1.2. Clasificación taxonómica de <i>Aeschynomene fascicularis</i> Schtdl. & Cham.	58
5.2. Materiales y métodos	58

5.2.1. Reactivos e instrumentación	58
5.2.2. Estudio químico de la partición hexánica de <i>A. fascicularis</i>	59
5.2.2.1. Obtención del compuesto IV	59
5.2.3. Colecta masiva de <i>A. fascicularis</i>	60
5.2.3.1. Material vegetal	60
5.2.3.2. Procesamiento del material vegetal	60
5.2.3.3. Obtención de los compuestos V-IX	60
5.2.4. Derivatización	61
5.2.4.1. Acetilación de los compuestos V y VI	61
5.2.4.2. Metilación de los compuestos V y VI	61
5.2.5. Compuesto IV (Isocordofina)	62
5.2.6. Compuesto V (Espinochalcona C)	62
5.2.6.1. Compuesto Va (Espinochalcona C acetilada)	62
5.2.6.2. Compuesto Vb (Espinochalcona C metilada)	62
5.2.7. Compuesto VI (Espinochalcona A)	62
5.2.7.1. Compuesto VIa (Espinochalcona A acetilada)	63
5.2.7.2. Compuesto VIb (Espinochalcona A metilada)	63
5.2.8. Compuesto VII (Aeschynocarpina)	63
5.2.9. Compuesto VIII (2-Metoxi-medicarpina)	63
5.2.10. Compuesto IX (Secundiflorol G)	63
5.3. Resultados y discusión	65
5.3.1. Compuesto IV (Isocordofina)	65
5.3.2. Compuesto V (Espinochalcona C)	67
5.3.3. Compuesto VI (Espinochalcona A)	73
5.3.4. Compuesto VII (Aeschynocarpina)	79
5.3.5. Compuesto VIII (2-Metoxi-medicarpina)	87
5.3.6. Compuesto IX (Secundiflorol G)	89
5.4. Discusiones generales	92
5.5. Conclusiones	94
5.6. Referencias	95
CAPÍTULO VI	96
Actividad biológica de los compuestos aislados de <i>Aeschinomene fascicularis</i>	96
6.1. Antecedentes	97
6.1.2. Tipos de ensayos citotóxicos	97
6.1.3. Bioensayo con MTT	97
6.1.4. Bioensayo con Sulforodamina B	97
6.2. Materiales y métodos	99
6.2.1. Reactivos e instrumentación	99
6.2.2. Bioensayo con MTT: citotoxicidad	99

6.2.3. Bioensayo con SRB: antiproliferativo	99
6.2.4. Análisis estadístico	100
6.3. Resultados y discusión	100
6.3.1. Actividad citotóxica	100
6.3.2. Actividad antiproliferativa	104
6.4. Conclusiones	109
6.5. Referencias	110
CAPITULO VII	113
7.1. Conclusiones generales	113
7.2. Perspectivas	115

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales tipos de cáncer, incidencia, muerte y poblaciones afectadas.	1
Tabla 1.1. Fármacos anti-cancerígenos aislados de plantas.	8
Tabla 1.2. Compuestos anti-cancerígenos aislados de plantas en fases clínicas de desarrollo.	11
Tabla 1.3. Compuestos citotóxicos aislados de plantas en fase preclínica de desarrollo.	12
Tabla 2.1. Plant species included in the present study.	26
Tabla 2.2. Plant species not included in the present study.	28
Tabla 2.3. Cytotoxic activity and selective index of the most active extracts	30
Tabla 3.1. NMR spectroscopic data of bonediol (CDCl ₃).	41
Tabla 3.2. Antiproliferative activity of bonediol.	41
Tabla 4.1. Comparación de las señales de RMN- ¹ H descritas para tirucalanos y las obtenidas para el compuesto I.	52
Tabla 5.1. Comparación de las señales de RMN- ¹ H obtenidas del compuesto IV e isocordofina.	67
Tabla 5.2. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto V.	69
Tabla 5.3. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto VI.	77
Tabla 5.4. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto VII.	86

Tabla 5.5. Comparación de las señales de RMN- ¹ H obtenidas del compuesto VIII y 2-metoxi-medicarpina.	89
Tabla 5.6. Comparación de las señales de RMN- ¹ H obtenidas del compuesto IX y secundiflorol G.	91
Tabla 6.1. Actividad citotóxica de los compuestos obtenidos de <i>A. fascicularis</i> .	101
Tabla 6.2. Comparación de la actividad citotóxica de extractos y compuestos obtenidos de <i>A. fascicularis</i> .	101
Tabla 6.3. Actividad citotóxica de compuestos análogos a secundiflorol G.	102
Tabla 6.4. Actividad antiproliferativa de los compuestos obtenidos de <i>A. fascicularis</i> .	106
Tabla 6.5. Relaciones selectas entre la actividad citotóxica/antiproliferativa (C/A) de los compuestos evaluados.	107

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.1. Diagrama de estrategia experimental.	20
Figura 3.1. Chemical structure of bonediol.	41
Figura 4.1. Hojas y flores de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö.	46
Figura 4.2. Diagrama de aislamiento de metabolitos secundarios de <i>B. macrocarpa</i> .	48
Figura 4.3. Cromatografía en capa delgada de: A) el compuesto bonediol extraída de la partición hexánica activa de <i>B. macrocarpa</i> y B) la partición hexánica masiva de <i>B. macrocarpa</i> . El sistema de disolventes empleado fue hexano/acetona (8:2).	49
Figura 4.4. Actividad citotóxica de la partición hexánica de la primera colecta de <i>B. macrocarpa</i> .	50
Figura 4.5. Actividad citotóxica de la partición hexánica de la colecta masiva de <i>B. macrocarpa</i> .	50
Figura 4.6. Estructura de tirucala-7,24-dien-3 β -ol (compuesto I).	52
Figura 4.7. CCD y CG-EM de la mezcla de ácido undecanoico, dodecanoico y tridecanoico.	53
Figura 4.8. Espectro IR (film) de la mezcla de ácido undecanoico, dodecanoico y tridecanoico.	54
Figura 4.9. Estructura del estigmasta-7,16-dien-3-ol (compuesto III).	54
Figura 5.1. <i>Aeschynomene fascicularis</i> Schltld. & Cham.	58
Figura 5.2. Aislamiento del compuesto IV.	60
Figura 5.3. Diagrama de aislamiento de los compuestos IV-IX de <i>B. macrocarpa</i> .	64
Figura 5.4. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto IV.	66

Figura 5.5. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto V.	70
Figura 5.6. Espectro de RMN- ¹³ C y estructura del compuesto V.	71
Figura 5.7. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto V acetilado.	72
Figura 5.8. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto V metilado.	72
Figura 5.9. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto VI.	75
Figura 5.10. Espectro de RMN- ¹³ C y estructura del compuesto VI.	76
Figura 5.11. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto VI acetilado.	78
Figura 5.12. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto VI metilado.	78
Figura 5.13. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto VII.	80
Figura 5.14. Espectro de RMN- ¹³ C y estructura del compuesto VII.	81
Figura 5.15. Espectro COSY del compuesto VII señalando los acoplamientos de los protones del anillo B.	82
Figura 5.16. Espectro HSQC del compuesto VII.	83
Figura 5.17. Espectro HMBC del compuesto VII señalando las correlaciones en el anillo A.	84
Figura 5.18. Espectro de HMBC del compuesto VII señalando las correlaciones en el anillo D.	85
Figura 5.19. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto VIII.	88
Figura 5.20. Espectro de RMN- ¹ H y estructura del compuesto IX.	90
Figura 6.2. Estructura molecular del colorante de sulforodamina B.	98

RESUMEN

El cáncer ocupa la tercera causa de muerte en México, después de la diabetes y las enfermedades del corazón. Los tratamientos disponibles para tratar esta patología no han demostrado ser seguros ni eficaces, causando graves efectos tóxicos y disminuyendo la calidad de vida de los pacientes. Ante esta problemática, las plantas medicinales son una excelente alternativa para el aislamiento de compuestos anticancerígenos más eficaces y seguros. La etnobotánica maya cuenta con al menos 800 especies de plantas descritas, las cuales podrían proveer nuevos fármacos anticancerígenos.

Tomando en cuenta lo anterior, se realizó un estudio etnobotánico del cual se seleccionaron 21 especies de plantas y se obtuvieron 41 extractos metanólicos, sometidos al bioensayo estandarizado de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) para medir la citotoxicidad contra líneas celulares embriogénicas humanas (HEK 293), cáncer humano de pulmón (A549), cáncer humano nasofaríngeo (KB), cáncer humano orofaríngeo (Hep-2), cáncer humano de cérvix (HeLa y SiHa), cáncer humano de mama (MCF-7) y cáncer humano de próstata (PC3).

De la fracción hexánica activa de las raíces de *Aeschynomene fascicularis* se obtuvieron tres chalconas (espinochalcona A, espinochalcona C e isocordoína), dos pterocarpanos, uno conocido (2-metoxi-medicagoína) y otro nuevo (aeschynocarpina), y un isoflavano (secundiflorol G). Además, se obtuvieron los derivados acetilados y metilados de espinochalcona A y de espinochalcona C. Así mismo, de la fracción hexánica activa de las raíces de *Bonellia macrocarpa* se obtuvo un nuevo catechol (bonediol), dos terpenoides (tirucala-7,24-dien-3 β -ol y estigmasta-7,16-dien-3-ol) y una mezcla de ácidos grasos.

El ensayo de citotoxicidad por MTT reveló actividad citotóxica de los compuestos isocordoína y secundiflorol G. Adicionalmente, la actividad antiproliferativa de los compuestos fue evaluada por el método de sulforodamina B (SRB) demostrando actividad de espinochalcona A y sus análogos contra líneas KB, HeLa y SiHa. También se encontró actividad antiproliferativa de bonediol contra las líneas celulares KB, Hep-2 y SiHa.

ABSTRACT

Cancer is the third leading cause of death in Mexico, after diabetes and heart diseases. The treatments available to treat this disease have not proven to be safe and effective, causing serious toxic effects and decreased quality of life of patients. The medicinal plants are an excellent alternative for the isolation of more effective and safe anticancer compounds. Mayan ethnobotany has at least 800 species of plants described, which may provide new anticancer drugs.

Taking this into account, an ethnobotanical study was conducted in which 21 plant species were selected and 41 methanol extracts were prepared. All extracts were evaluated in a cytotoxicity bioassay on human embryogenic (HEK 293), human lung cancer (A549), human nasopharyngeal cancer (KB), human oropharyngeal cancer (Hep-2), human cervical cancer (HeLa and SiHa), breast human cancer (MCF-7), and human prostate cancer (PC3) cell lines.

From the active hexane fraction prepared from *Aeschynomene fascicularis* root bark six secondary metabolites were obtained: three chalcones (spinochalcone A, spinochalcone C, and isocordoin), two pterocarpanes (the known 2-methoxy-medicarpin and the new aeschynocarpin), and one isoflavan. In addition, acetyl and methyl derivatives were prepared from both spinochalcone A and spinochalcone C. Likewise, from the active hexane fraction of *Bonellia macrocarpa* roots a new catechol (bonediol), two terpenoids (tirucala-7,24-dien-3 β -ol and stigmasta-7,16-dien-3-ol), and a mixture of fatty acids were obtained.

The MTT cytotoxicity assay revealed activity from the compounds isocordoin and secundiflorol G. Additionally, the antiproliferative activity of the compounds was evaluated by the method of sulforhodamine B (SRB); interesting activity of the compound spinochalcone A and its analogues was observed against KB, HeLa and SiHa cell lines. We also found antiproliferative activity of bonediol against KB, Hep-2, and SiHa cell lines.



Introducción

Desde edades tempranas hasta la vejez, una de las principales causas de muerte es el cáncer. En 2006 esta patología ocupaba la segunda causa de muerte en el mundo (Ngoma, 2006). Recientemente se han estimado 12.7 millones de nuevos casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por esta enfermedad en todo el mundo (Ferlay *et al.*, 2007). Proyecciones realizadas en 2009, estiman que para 2030 habrán muerto 12 millones de personas si no se toman acciones inmediatas para el control de este terrible padecimiento (Gospodarowicz *et al.*, 2009). En la Tabla 1 se muestran las principales muertes por tipo de cáncer, incidencia y poblaciones afectadas por área geográfica.

Tabla 1. Principales tipos de cáncer, incidencia, muerte y poblaciones afectadas (Ferlay *et al.*, 2007)

Tipo de cáncer	Poblaciones con mayor incidencia	Incidencia total	Muertes totales
Pulmón	Norteamérica y Este de Europa	1,600,000	1,400,000
Estómago	Asia y Sudamérica	990,000	738,000
Hígado	Asia y el centro y oeste de África	748,000	696,000
Colon y recto	Este de Europa, Japón y Oceanía	1,200,000	609,000
Mama	Norteamérica y la mayoría de las ciudades de Europa	1,400,000	458,000
Esofaringeo	Asia y la región Africana del sub-Sahara	482,000	407,000
Cérvix	África, Asia y centro y sur de América	529,000	275,000
Próstata	Norteamérica, Oceanía y el norte-oeste de Europa	914,000	258,000

En México, de las 539,530 defunciones registradas en 2008, 67,048 fueron causadas por diversos tipos de cáncer, ocupando la tercera causa de muerte en la población en general, sólo después de las cardiopatías y la diabetes (www.sinais.salud.gob.mx). En el estado de Yucatán, durante el periodo 1992-2007, el cáncer se mantuvo como la segunda causa de mortalidad en la población en general, solamente por debajo de las enfermedades del corazón. Entre los principales cánceres que afectan a la población yucateca se encuentran: el cáncer de estómago, tráquea y cérvix (www.salud.yucatan.gob.mx). Esta patología constituye un enorme reto para las instituciones de salud, ya que las demandas de atención médica por

esta enfermedad se incrementan, implicando serias repercusiones económicas (Salmon & Bertino, 1996), por lo que las autoridades sanitarias y la sociedad misma han considerado al cáncer como un problema de salud pública.

El cáncer es causado por modificaciones en la información genética de las células, provocando cambios en su conducta normal. Entre los principales genes modificados se encuentran: los protooncogenes y los genes supresores de tumor (GST). Los primeros controlan actividades habituales de la célula, pero cuando son alterados por algún agente cancerígeno se convierten en oncogenes, los cuales codifican para proteínas cuyo efecto es la pérdida del control en la proliferación celular. Los GST actúan como inhibidores del crecimiento celular y cuando son modificados pierden su capacidad para evitar la proliferación excesiva (González *et al.*, 1998; Karp, 1998; Paniagua *et al.*, 2003).

Estas modificaciones genéticas normalmente afectan al ciclo celular, el cual en células eucariotas consiste de cuatro fases (G1, S, G2 y mitosis) y dos sitios de control (puntos de restricción). El primero de estos últimos (proteína producto del gen Rb) se encuentra al final de la fase G1 y el segundo (proteína producto del gen p53) en la fase G2 inmediatamente antes de entrar en la mitosis (Freshney, 2000; Tachibana *et al.*, 2005). De hecho, todo tumor no es más que la consecuencia final de la alteración del ciclo celular en alguno de sus puntos de control (González *et al.*, 1998).

Entre los tratamientos disponibles para tratar el cáncer se encuentran: la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia. Cuando una o más de estas terapias pueden ser administradas, la vida del paciente se extiende del 20 al 50% (Salmon & Bertino, 1996; Kufe *et al.*, 2003). Cuando el cáncer se ha extendido a otras partes del cuerpo (fenómeno conocido como metástasis), la quimioterapia es el tratamiento de elección. Sin embargo, esta terapia no ha demostrado ser un tratamiento seguro y eficaz, debido a sus efectos secundarios (alopecia, diarrea, vómitos, náuseas e inmunosupresión) resultado de los efectos tóxicos sobre células normales y sus propiedades fisicoquímicas. Adicionalmente, se ha observado en algunos pacientes la aparición de resistencia a numerosos agentes antineoplásicos, ocasionando el principal fracaso de la quimioterapia (Brody *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999; Desoize & Jardillier, 2000; Stavrovskaya, 2000; Kufe *et al.*, 2003). Estos hechos han puesto de manifiesto la necesidad de buscar nuevos fármacos antineoplásicos más seguros y eficaces.

Actualmente, entre las estrategias para combatir esta problemática se encuentra la búsqueda de compuestos antineoplásicos novedosos que

presenten nuevos mecanismos de acción (Jansen *et al.*, 2006). Entre estas estrategias, las plantas son una excelente fuente para la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos.

El reino vegetal contiene alrededor de 400,000 especies de plantas y de éstas sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado para aplicaciones farmacéuticas (Ruffa *et al.*, 2002; Badisa *et al.*, 2003). En México, existen registros de más de 26,000 especies de plantas y en la península de Yucatán se ha calculado que hay al menos 2,200 especies, incluyendo la flora introducida, de las cuales aproximadamente 800 especies son usadas como medicinales de manera tradicional. De éstas, un pequeño porcentaje es usado para el tratamiento de síntomas relacionados con el cáncer (Arellano *et al.*, 2003; Méndez & Duran, 1997). Este pequeño porcentaje constituye una importante fuente de moléculas con actividad citotóxica y una buena alternativa para la obtención de nuevos compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células cancerígenas con nuevos mecanismos de acción.

El presente estudio se centró en la búsqueda de posibles compuestos que puedan ser desarrollados como nuevos fármacos anticancerígenos. Como primer paso, se seleccionaron 21 plantas usando como guía la literatura etnobotánica de la región. Posteriormente, se evaluó la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de las distintas partes vegetales de estas plantas. Finalmente, se seleccionaron dos plantas para realizar su estudio fitoquímico: *Aeschynomene fascicularis* y *Bonellia macrocarpa*. De *B. macrocarpa* se aisló un nuevo catechol conocido como bonediol, el cual resultó poseer actividad antiproliferativa en un panel de líneas de cáncer humano, y se identificaron por medio de CG-EM el triterpeno tirucalan-7,24-dien-3 β -ol, el esteroide estigmast-7,16-dien-3-ol y una mezcla de ácidos grasos. De la planta *A. fascicularis* se obtuvieron seis flavonoides, incluyendo tres chalconas: isocordofina, espinochalcona A y espinochalcona C, así como el pterocarpano 2-metoxi-medicarpina y el isoflavano secundiflorol G, reportados previamente en la literatura, además de un nuevo pterocarpano nombrado aeschynocarpina. Adicionalmente, se obtuvieron los derivados acetilados y metilados de las espinochalconas A y C.

Los compuestos obtenidos fueron evaluados y la actividad citotóxica resultante señala a dos compuestos (la isocordofina y el secundiflorol G) como los responsables de la actividad citotóxica de la planta.

REFERENCIAS

- Arellano-Rodríguez, J., Flores-Guido, J., Tun-Garrido, J., Cruz-Bojorquez, M. (2003). Leguminosae. In: Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo y Distribución de las Especies Vegetales de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 312–380.
- Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M., Pilarinou. (2003). Cytotoxic Activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytotherapy Research* 17, 472-476.
- Brody, T., Larner, J., Minneman, K. (1998). *Human Pharmacology Molecular to Clinical*, 3a ed.; Mosby-Year Book, Inc: USA.
- Desoize, B., Jardillier, J. (2000). Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36, 193-207.
- Freshney, R. (2000). *Culture of Animal Cells*, 4a ed.; Wiley-Liss: U.S.A, pp 4-6.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Base de datos. <http://globocan.iarc.fr> (consultado junio 2011).
- González, M., Ordóñez, A., Felio, J., Zamora, P., Espinosa, E., Castro, J. (1998). *Oncología Clínica*. 2ª ed.; McGraw Hill Interamericana: Madrid, pp 21-66.
- Gospodarowicz, M.K., Cazap, E., Jadad, A.R. (2009). Cancer in the world-a call for international collaboration. *Salud Pública de México* 51, 305-308.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Base de datos. <http://www.inegi.gob.mx> (consultado junio 2007).
- Jansen, O., Akhmedjanova, V., Angenot, L., Balansard, G., Chariot, A., Ollivier, E., Tits, M., Frédérich, M. (2006). Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 241-245.
- Karp, G. (1998). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana: México, pp 671-672.
- Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T., Holland, J., Frei III. (2003). *Cancer Medicine*, 6th ed.; BC Decker Inc; Emil, editors: Hamilton (Canada).
- Méndez, M., Durán, R. (1997). Diagnóstico del conocimiento etnobotánico actual de las plantas medicinales de la Península de Yucatán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60, 15-24.
- Ngoma, T. (2006). World Health Organization cancer priorities in developing countries. *Annals of Oncology*, 17, 9–14.

- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvares, M., Fraile, B., Anadon, R., Saez, F. (2003). *Biología Celular*, 2a ed.; McGraw Hill Interamericana: Madrid, pp 334-335.
- Ruffa, M., Ferraro, G., Wagner, M., Calcagno, M., Campos, R., Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 335-339.
- Salmon, S., Bertino, J., (1996). *Principles of Cancer Therapy*. En: Bennett, T.C., Plum, F.C. *Textbook of Medicine*, 20a ed.; WB Saunders: Philadelphia, Vol.1, pp 103-149.
- Secretaría de Salud Pública del Estado de Yucatán. Home page: <http://www.salud.yucatan.gob.mx> (consultado enero 2011).
- Stavrovskaya, A., 2000. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor. *Cells Biochemistry* 65, 95-106.
- Tachibana, K., Gonzalez, M., Coleman, N. (2005). Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *The Journal of Pathology* 205, 123-129.

Capítulo I

Antecedentes

1.1. PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE NUEVOS ANTI-CANCERÍGENOS

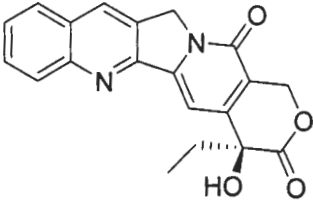
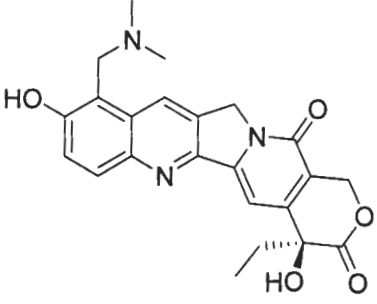
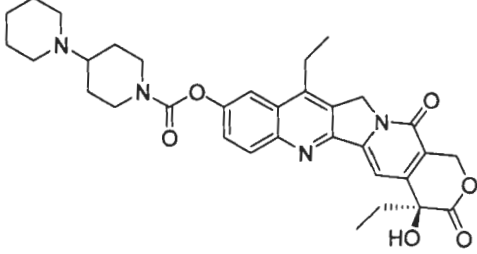
Los productos naturales son reconocidos como importantes fuentes de agentes quimioterapéuticos. Tan sólo en los años 60's, el 50% de todos los agentes anti-cancerígenos provenían de productos naturales. Entre los años de 1996 a 2000, 400 compuestos con notable actividad anti-cancerígena fueron aislados de plantas, organismos marinos y microorganismos (Kim *et al.*, 2002). Más aún, en 2007 de todos los fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para tratar el cáncer, el 57% resultó ser o derivó de un producto natural (Newman & Cragg, 2007).

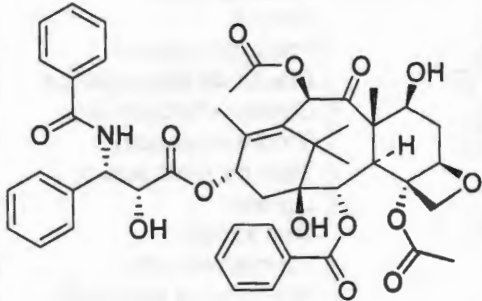
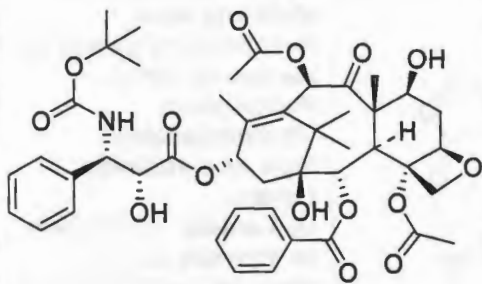
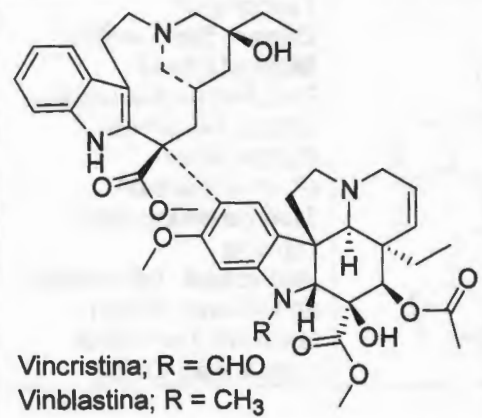
Varias razones pueden ser descritas para explicar el éxito de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos: su alta diversidad química, el efecto de la presión evolutiva a sintetizar constantemente moléculas activas y por último la diversidad de actividades que pueden presentar en varios modelos biológicos (Harvey, 2007).

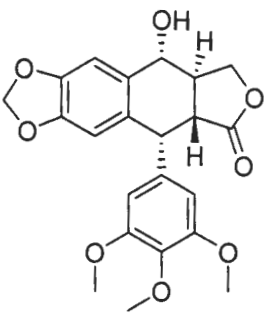
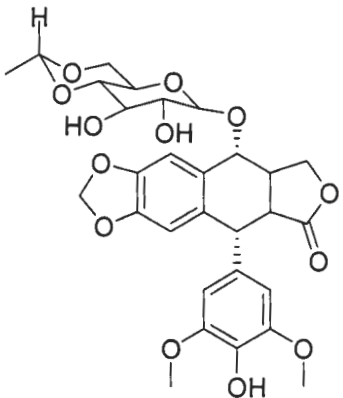
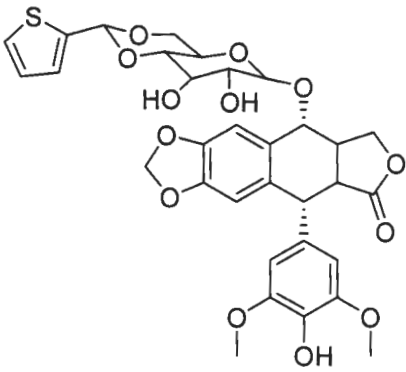
Con respecto al reino vegetal, se ha estimado que existen alrededor de 400,000 especies de plantas y de éstas sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado para aplicaciones farmacéuticas. Por consiguiente, aún representan un reservorio de moléculas bioactivas (Ruffa *et al.*, 2002; Badisa *et al.*, 2003).

La investigación de nuevos agentes anti-cancerígenos provenientes de plantas ha sido de gran importancia desde los años 50's, con el descubrimiento de los alcaloides de la vinca, las podofilotoxinas, los taxanos y las camptotecinas (Cragg & Newman, 2005). Actualmente, se tiene una amplia gama de fármacos anticancerígenos obtenidos de plantas utilizados en la terapéutica actual (Tabla 1.1). Además, se están desarrollando otros compuestos, en fases clínicas, como potenciales fármacos anticancerígenos (Tabla 1.2). Por último, se han aislado de fuentes vegetales compuestos con potente actividad citotóxica e innovadores mecanismos de acción (Tabla 1.3), los cuales son prominentes candidatos para ser desarrollados como posibles fármacos contra algún tipo de cáncer.

Tabla 1.1. Fármacos anticancerígenos aislados de plantas.

Estructura	Datos generales
 <p>The structure shows a complex polycyclic system. It features a benzene ring fused to a pyridine ring, which is further fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom. This nitrogen is part of a lactone ring system. A hydroxyl group (HO) is attached to the structure, and there are several methyl groups indicated with wedges and dashes.</p>	<p>Nombre del compuesto Camptotecina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Alcaloide</p> <p>Uso actual Farmacóforo del topotecan e irinotecan (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The structure is similar to camptotecin but includes a dimethylamino group (-N(CH3)2) attached to the benzene ring. It also features a hydroxyl group (HO) and a lactone ring system with methyl groups.</p>	<p>Nombre del compuesto Topotecan</p> <p>Origen Semi-sintético</p> <p>Molécula base Camptotecina aislada de <i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Alcaloide</p> <p>Uso actual Tratamiento de cáncer de ovario y pulmón de células pequeñas (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The structure is similar to camptotecin but has a piperidine ring connected via a piperazine ring to a carbonyl group, which is further linked to the benzene ring. It also features a hydroxyl group (HO) and a lactone ring system with methyl groups.</p>	<p>Nombre del compuesto Irinotecan</p> <p>Origen Semi-sintético</p> <p>Molécula base Camptotecina aislada de <i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Alcaloide</p> <p>Uso actual Tratamiento de cáncer colorectal (Cragg & Newman, 2005)</p>

 <p>The image shows the chemical structure of Paclitaxel, a complex diterpenoid. It features a central taxane ring system with multiple stereocenters, several hydroxyl groups, and a side chain containing a benzamide group and a hydroxyl group.</p>	<p>Nombre del compuesto Paclitaxel</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Diterpeno</p> <p>Uso actual Tratamiento de cáncer de mama, ovario, pulmón y sarcoma de Kaposi (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The image shows the chemical structure of Docetaxel, which is a semi-synthetic derivative of Paclitaxel. It has the same taxane core but with a tert-butyl ester group instead of the benzamide side chain.</p>	<p>Nombre del compuesto Docetaxel</p> <p>Origen Semi-sintético</p> <p>Molécula base Paclitaxel aislada de <i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Diterpeno</p> <p>Uso actual Tratamiento de cáncer de mama y pulmón (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The image shows the chemical structure of Vincristine and Vinblastine, which are complex alkaloids. They feature a complex polycyclic ring system with multiple nitrogen atoms, hydroxyl groups, and a side chain with a hydroxyl group. The structure is labeled with 'R' at the bottom left.</p> <p>Vincristina; R = CHO Vinblastina; R = CH₃</p>	<p>Nombre del compuesto Vincristina y vinblastina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Alcaloide</p> <p>Uso actual Tratamiento de leucemias, linfomas, cáncer testicular, de mama, pulmón (Cragg & Newman, 2005)</p>

 <p>The structure shows a podophyllotoxin core with a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at the C-10 position. The C-13 position has a hydroxyl group (OH) and a hydrogen atom (H) on a chiral center. The C-14 position has a hydrogen atom (H) on a chiral center. The C-15 position is part of a lactone ring.</p>	<p>Nombre del compuesto Podofilotoxina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento Género <i>Podophyllum</i> (Podophyllaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Lignano</p> <p>Uso actual Farmacóforo del tenipósido y etopósido (Lee & Xiao, 2003)</p>
 <p>The structure is similar to podofilotoxina but features a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at the C-10 position and a hydroxyl group (OH) at the C-13 position. The C-13 position is also linked to a ribose sugar moiety.</p>	<p>Nombre del compuesto: Etopósido</p> <p>Origen: Semi-sintético</p> <p>Molécula base: Podofilotoxina aislada de plantas del género <i>Podophyllum</i> (Podophyllaceae)</p> <p>Tipo de metabolito: Lignano</p> <p>Uso actual: Tratamiento de linfomas, cáncer testicular y bronquial (Lee & Xiao, 2003)</p>
 <p>The structure is similar to etoposide but features a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at the C-10 position and a hydroxyl group (OH) at the C-13 position. The C-13 position is linked to a ribose sugar moiety, which is further substituted with a thienyl group.</p>	<p>Nombre del compuesto: Tenipósido</p> <p>Origen: Semi-sintético</p> <p>Molécula base: Podofilotoxina aislada de plantas del género <i>Podophyllum</i> (Podophyllaceae)</p> <p>Tipo de metabolito: Lignano</p> <p>Uso actual: Tratamiento de linfomas, cáncer testicular y bronquial (Lee & Xiao, 2003)</p>

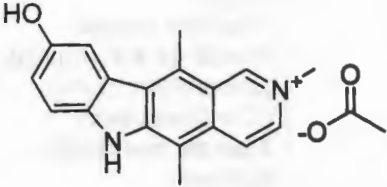
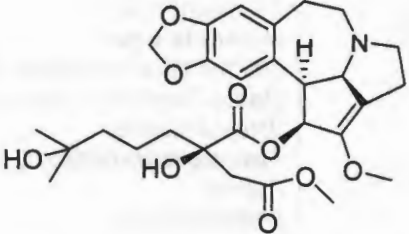
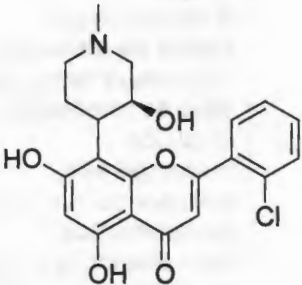
 <p>The structure shows a complex polycyclic system with a central benzene ring fused to a five-membered ring containing an NH group. This is further fused to a six-membered ring with a methyl group and a nitrogen atom with a positive charge. A side chain with a methyl ester group is attached to the nitrogen.</p>	<p>Nombre del compuesto: Elliptium Origen: Semi-sintético Molécula base: Ellipticina aislada de varias especies de la familia Apocynaceae Tipo de metabolito: Alcaloide Uso actual: Tratamiento de cáncer de mama (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The structure is a highly complex polycyclic alkaloid with multiple fused rings, including a benzene ring, a five-membered ring with a nitrogen atom, and a six-membered ring with a nitrogen atom. It features several hydroxyl groups, a methyl group, and a complex side chain with a methyl ester group.</p>	<p>Nombre del compuesto: Homoharringtonina Origen: Producto natural Planta de aislamiento: <i>Cephalotaxus harringtonia</i> var. <i>drupacea</i> (Cephalotaxaceae) Tipo de metabolito: Alcaloide Uso actual: Tratamiento de leucemia mielocítica crónica (Cragg & Newman, 2005)</p>

Tabla 1.2. Compuestos anticancerígenos aislados de plantas en fases clínicas de desarrollo (Cragg & Newman, 2005).

Estructura	Datos generales
 <p>The structure features a central benzene ring with two hydroxyl groups. It is fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom and a hydroxyl group. Another five-membered ring is fused to the benzene ring, containing a carbonyl group and a chlorine atom. A side chain with a methyl group is attached to the nitrogen atom.</p>	<p>Nombre del compuesto: Flavopiridol Origen: Síntesis total Molécula base: Rohitukina aislada de la planta <i>Dysoxylum binectariferum</i> (Meliaceae) Tipo de metabolito: Flavonoide Uso potencial: Tratamiento en leucemias, linfomas y tumores sólidos</p>

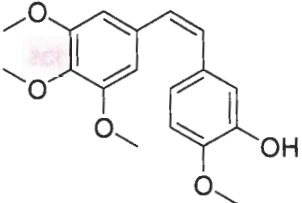
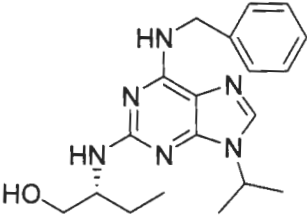
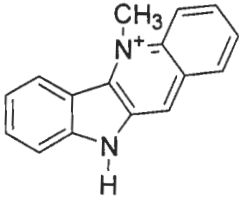
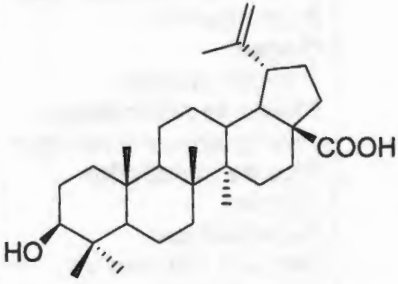
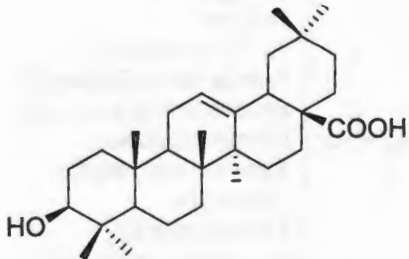
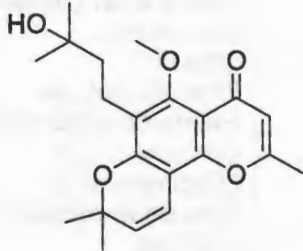
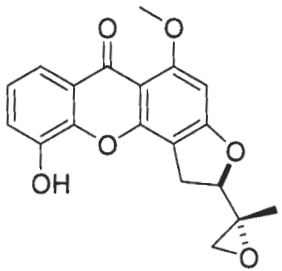
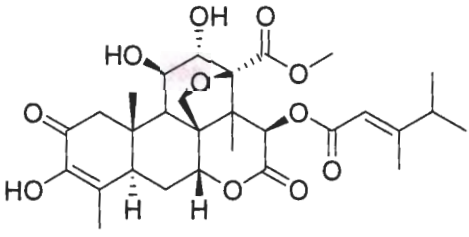
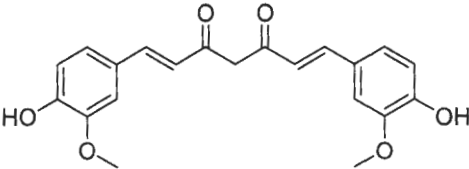
	<p>Nombre del compuesto Combrestatina A₄</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Combretum caffrum</i> (Combretaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Estilbeno</p> <p>Potencial uso Agentes anti-angiogénicos</p>
	<p>Nombre del compuesto Roscovitina</p> <p>Origen Semi-sintético</p> <p>Molécula base Olomoucina aislada de la planta <i>Raphanus sativus</i> (Brassicaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Purina</p> <p>Potencial uso Inhibidor de ciclinas dependientes de cinasa</p>

Tabla 1.3. Compuestos citotóxicos aislados de plantas en fase preclínica de desarrollo.

Estructura	Datos generales
	<p>Nombre del compuesto Criptolepina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Cryptolepis sanguinolenta</i></p> <p>Tipo de metabolito Alcaloide</p> <p>Potencial uso Inhibidor de la enzima topoisomerasa II favoreciendo la apoptosis en células cancerosas (Hanson, 2005)</p>

	<p>Nombre del compuesto Ácido betulínico</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Betula populifolia</i></p> <p>Tipo de metabolito Triterpeno</p> <p>Potencial uso Antiproliferativo en diversos tipos de tumores sólidos (Hanson, 2005)</p>
	<p>Nombre del compuesto Ác. oleánico</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento Especies del género <i>Freziera</i></p> <p>Tipo de metabolito Triterpeno</p> <p>Potencial uso Inhibidor de la enzima polimerasa-β (Hanson, 2005)</p>
	<p>Nombre del compuesto: O⁵-Metilsorbifulina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento: <i>Spathelia sorbifolia</i></p> <p>Tipo de metabolito: Cromona</p> <p>Potencial uso En células de leucemia (Cassady, 1990)</p>

 <p>The structure shows a xanthone core with a hydroxyl group at position 1, a methoxy group at position 2, and a complex side chain at position 3 consisting of a furan ring, a propyl chain, and an epoxide ring.</p>	<p>Nombre del compuesto Psorospermina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Psorospermum febrifugum</i></p> <p>Tipo de metabolito Xantona</p> <p>Potencial uso Marcada actividad en células de cáncer humano de mama, pulmón y colon (Cassady, 1990)</p>
 <p>The structure is a complex pentacyclic triterpene with multiple hydroxyl groups, a lactone ring, and a side chain with a branched alkene.</p>	<p>Nombre del compuesto Bruceantina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Brucea antidysenterica</i> (Simaroubaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Triterpeno</p> <p>Potencial uso En cáncer de leucemia, linfoma y mieloma (Cragg & Newman, 2005)</p>
 <p>The structure is a linear polyphenol consisting of two 3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl rings connected by a heptane chain with two ketone groups and two trans-alkene linkages.</p>	<p>Nombre del compuesto Curcumina</p> <p>Origen Producto natural</p> <p>Planta de aislamiento <i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)</p> <p>Tipo de metabolito Polifenol</p> <p>Potencial uso Leucemias, melanoma maligno, cáncer de pulmón, cabeza, cuello, mama, próstata y páncreas (López, 2008)</p>

1.2. ESTRATEGIAS PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS

En la investigación de nuevas entidades químicas de origen vegetal con propiedades farmacológicas se toman en cuenta principalmente cuatro estrategias para la selección, evaluación biológica y posterior aislamiento de los compuestos bioactivos:

- **Selección aleatoria seguida por un tamizaje químico.** Esta estrategia también es conocida como tamizaje fitoquímico, su principal objetivo es la búsqueda de una o más familias de metabolitos secundarios específicos (por ejemplo: flavonoides, alcaloides, terpenoides, etc.).
- **Selección aleatoria seguida por evaluaciones biológicas.** Fue el principal método usado para la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas. Algunos éxitos importantes conseguidos por este método han sido el paclitaxel y la camptotecina.
- **Seguimiento de reportes de la actividad biológica.** Esta técnica se centra en la búsqueda de extractos vegetales estudiados previamente, pero que los compuestos responsables de la actividad no han sido aislados.
- **Seguimiento de reportes en la etnomedicina.** Fundamentalmente se basa en la selección de plantas usadas en la farmacopea tradicional y sistemas de sanidad indígenas de alguna región. Actualmente, constituye una de las herramientas más importantes para la búsqueda de fármacos; esto es debido a la alta cantidad de compuestos activos que han sido aislados de plantas medicinales, así como a la fuerte correlación que existe entre la actividad biológica detectada en los compuestos y el padecimiento para el cual se usan las plantas medicinales de las que fueron aislados (Fabricant & Farnsworth, 2001; Newman & Cragg, 2007).

Dado el éxito que se tiene usando la etnomedicina en la búsqueda de nuevos fármacos, no es extraordinario que también se esté utilizando esta estrategia para encontrar compuestos anticancerígenos. De hecho, la mayoría de los compuestos descritos en las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 fueron extraídos y/o modelados de productos naturales aislados de plantas medicinales de diversas partes del mundo. Lo anterior apoya el hecho de que la selección de plantas para realizar estudios de tamizaje produciría mayores aciertos si en esta búsqueda se usa como referencia la farmacopea tradicional y los sistemas de saneamiento de los pueblos indígenas (Cragg & Newman, 1999; Ooi *et al.*, 2004).

Adicionalmente, en diversas partes del mundo se están realizando estudios de tamizaje primario en plantas en busca de compuestos con posible actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales y esta búsqueda es

orientada por el uso que tienen en alguna medicina tradicional. Entre las más conocidas y las que han arrojado resultados interesantes encontramos: la de China (Cui *et al.*, 2005), la de India (Kaur *et al.*, 2005), la de Tailandia y Malasia (Houghton, 2005), así como la del Cercano Oriente (Ljubuncic *et al.*, 2005), de África (Kamuhabwa *et al.*, 2000; Steenkamp *et al.*, 2001) y la medicina tradicional de México (Popoca *et al.*, 1998), Argentina (Ruffa *et al.*, 2002) y Panamá (González *et al.*, 1994).

En México, un reporte reciente realizado por Alonso-Castro *et al.* (2010) señala que de 300 especies de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar el cáncer, solamente se han estudiado experimentalmente a 181 plantas (60%). De este porcentaje, 88 plantas (49%) han resultado ser activas en modelos de citotoxicidad *in vitro* y 51 (58%) de estas mismas han sido exploradas fitoquímicamente. Aunque la investigación de plantas mexicanas para el tratamiento del cáncer se encuentra avanzada, la situación en la península de Yucatán es distinta. A pesar de la vasta información etnomédica y la fuerte práctica que todavía tiene la medicina tradicional maya en nuestro tiempo, pocos reportes con respecto al potencial de plantas medicinales mayas han sido realizados (Ankli *et al.*, 2002; Mena-Rejón *et al.*, 2009). Es por esto, que posteriores estudios de tamizaje primario son necesarios con la finalidad de buscar nuevas plantas prospecto para el aislamiento de compuestos con potencial aplicación contra el cáncer.

1.3. MEDICINA TRADICIONAL Y CÁNCER

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional es la suma de conocimientos, habilidades y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias de cada una de las diferentes culturas, usadas para la prevención, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades físicas o mentales. La medicina tradicional fundamentalmente se basa en el uso de plantas que promueven la salud y alivian las enfermedades (Kaur *et al.*, 2005).

En la medicina tradicional maya, las plantas medicinales son de gran importancia y han sido usadas por nuestro pueblo hasta nuestros días, lo cual puede ser considerado como una evidencia de su eficacia para el control de muchos tipos de enfermedades. De igual manera, son una de las alternativas más importantes para tratar de llevar salud a un gran número de personas y por otra parte pueden ser ampliamente aprovechadas como un recurso natural y renovable de fácil acceso para toda la población. Aunado a lo anterior, en los años setenta, la medicina tradicional de los pueblos

indígenas fue reconocida por la OMS, lo que confirió un poderoso impulso a la investigación de plantas medicinales (Lozoya, 1997; Popoca *et al.*, 1998).

La literatura etnobotánica representa una de las fuentes de información con las que contamos para conocer la manera en que las civilizaciones prehispánicas solucionaban sus problemas de salud (Mendieta, 1981). Se ha documentado una vasta cantidad de literatura etnobotánica de la península de Yucatán, como resultado del mantenimiento de fuertes rasgos de la cultura maya. Estas fuentes documentales son estudios históricos o descriptivos, en cuyo contenido predomina un listado de enfermedades y tratamientos conocidos por los curanderos mayas de distintas épocas (Balam, 1992). Gracias a muchas de estas fuentes documentales hoy en día sabemos que los mayas conocían y trataban distintas patologías, incluyendo las de origen infeccioso (infecciones intestinales agudas, dermatitis infecciosa e infecciones respiratorias agudas), enfermedades de tipo crónico (asma, cansancio crónico, diabetes, nefritis e hipertensión) y hasta enfermedades de tipo psicológico (insomnio, nerviosismo e histeria).

Sin embargo, los mayas de la península de Yucatán conocían y trataban otros tipos de padecimientos que se encuentran bien documentados en la literatura, entre los que se encuentran: abscesos, callosidades, callos, protuberancias duras, pólipos, tumores, verrugas o llagas. Estos síntomas generalmente se aplican a condiciones tangibles o visibles de la piel y pueden a veces corresponder a una afección cancerosa (Popoca *et al.*, 1998; Cragg & Newman, 2005).

En la medicina tradicional maya de la península de Yucatán, se le conoce como "cáncer" a un padecimiento o conjunto de padecimientos, que pueden manifestarse como una afección de la piel y de la masa muscular subyacente, o en forma de una dolencia en algún órgano interno. El término alude a un mal de difícil curación y de aspecto desagradable (cuando afecta la piel); si se trata de un cáncer interno, el semblante del paciente revela la enfermedad. Los antiguos pobladores de la península de Yucatán asignaron nombres en maya a este conjunto de síntomas, es por eso que en lengua maya se le conoce como *'tsunuz* o *'tsunuz tacan* al "cáncer" y como *chu'uchum* a las protuberancias duras o tumores (Balam, 1992; Osadao, 1834).

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad citotóxica de extractos de plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes de cáncer, así como realizar el aislamiento, purificación, elucidación y evaluación de la actividad citotóxica y antiproliferativa de los metabolitos del extracto más activo.

1.4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar, identificar, recolectar y procesar las plantas medicinales mayas usadas en el tratamiento de síntomas asociados al cáncer por medio de una búsqueda en la literatura etnobotánica.
- Evaluar la actividad citotóxica a través del ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de todos los extractos metanólicos en líneas celulares normales (MDCK) y tumorales humanas de tipo nasofaríngeo (KB), orofaríngeo (Hep-2) y cervicouterino (HeLa).
- Realizar particiones con diversos disolventes orgánicos del/los extracto(s) que posean una concentración citotóxica media (CC_{50}) igual o menor de 20 $\mu\text{g/mL}$ y evaluarlos en el ensayo citotóxico de MTT.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios de la partición con mayor actividad en el ensayo citotóxico, mediante métodos cromatográficos y elucidar las estructuras químicas mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.
- Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa mediante los ensayos de MTT y sulforodamina B (SRB), respectivamente, de los metabolitos aislados.

1.5. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos, obtenidos de las plantas usadas en la medicina tradicional maya para el tratamiento de síntomas sugerentes de cáncer, que presentan actividad en el bioensayo contra células cancerígenas poseen compuestos químicos citotóxicos.

1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 1.1 se muestra el diagrama general de flujo que fue empleado en el presente trabajo.

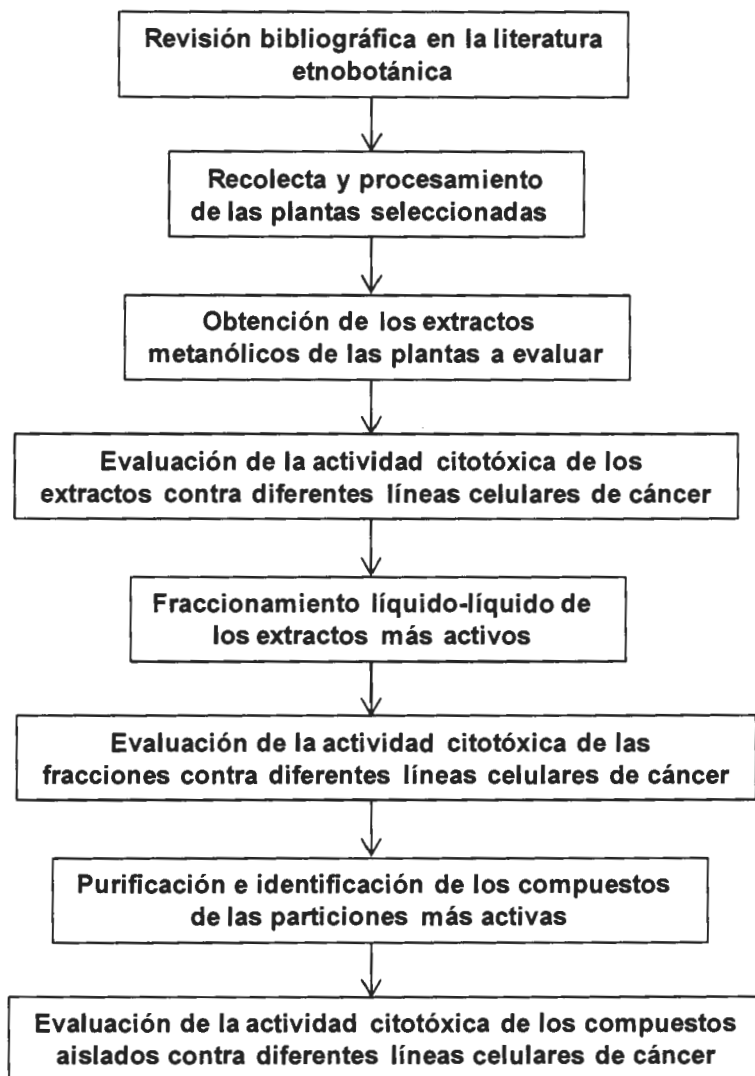


Figura 1.1. Diagrama de la estrategia experimental.

1.7. REFERENCIAS

- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 43-52.
- Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M., Pilarinou. (2003). Cytotoxic activities of some Greek labiatae herbs. *Phytotherapy Research* 17, 472-476.
- Balam, G. (1992). *Cosmogonia y uso actual de las plantas medicinales de Yucatán*. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida Yucatán, México, pp. 11-18.
- Campos, M., Sánchez, A., Femia, P., Navarro, M., Erosa, E., Bonilla, D.M., Domínguez, M.S. (1994). *La Medicina Tradicional de los Pueblos Indígenas de México*, 1a ed.; Instituto Nacional Indigenista: México, pp. 390-391.
- Cassady, J.M. (1990). Natural products as a source of potential cancer chemopreventive agents. *Journal of Natural Products* 53, 23-41.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation* 17, 153-63.
- Cragg, G., Newman, D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72-79.
- Cui, Y.Y., Xie, H., Qi, K.B., He, Y.M., Wang, J.F. (2005). Effects of *Pinus massoniana* bark extract on cell proliferation and apoptosis of human hematoma BEL-7402 cells. *World Journal of Gastroenterology* 11, 5277-5282.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 109, 69-75.
- González, A.G., Moujir, L., Bazzocchi, I. L., Correa, M.D., Gupta, M.P. (1994). Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamanian plants. *Phytomedicine* 1, 149-153.
- Hanson, B.A. (2005). *Understanding Medicinal Plants, Their Chemistry and Therapeutic Action*, 1a ed.; The Haworth Press: New York, pp 231-247.
- Harvey, A. (2007). Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 480-484.
- Houghton, L.P. (2005). Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 237-243.
- Kamuhabwa, A., Nshimo, C., Witte, P. (2000). Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 143-149.

- Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Harkonen, P. L., Kumar, S. (2005). The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala - an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 15-20.
- Kim, J., Park E.J. (2002). Cytotoxic anticancer candidates from natural resources. *Current Medical Chemistry Anticancer Agents* 4, 485-537.
- Lee, K.H., Xiao, Z. (2003). Lignans in treatment of cancer and other diseases. *Phytochemistry Reviews* 2, 341-362.
- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Saleh, K.A., Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 43-47.
- Lopez, M. (2008). Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 103-127.
- Lozoya, X. (1997). Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. *Investigación y Ciencia* 254, 4-10.
- Mena-Rejon, 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* 121, 462-465.
- Mendieta, R.M. (1981). *Plantas Medicinales del Estado de Yucatán: 1ra ed*; CECSA; México, pp. 11-12.
- Newman, D., Cragg, G. (2007). Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70, 461-477.
- Ooi, L., Wang, H., Luk, C.W., Ooi, V. (2004). Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 94, 117-122.
- Osadao, R. (1834). *El Libro del Judío o Medicina Doméstica, Descripción de las Virtudes de las Yervas Medicinales de Yucatán*. Mérida, Yucatán, México, pp. 20-255.
- Popoca, J., Aguilar, A.; Alonso, D., Villarreal, M.L. (1998). Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 59, 173-177.
- Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wagner, M.L., Calcagno, M.L., Campos, R.H., Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 335-339.
- Steenkamp, V., Sterwart, M.J., van der Merwe, S., Zuckerman, M., Crowther, N.J. (2001). The effect of *Senecio latifolius*, a plant used as a South African traditional medicine on a human cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 78, 51-58.

Capítulo II

Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms

Edgar Caamal-Fuentes^a, Luis W. Torres-Tapia^a, Paulino Simá-Polanco^b,
Sergio R. Peraza-Sánchez^a, Rosa Moo-Puc^{c,*}

^a Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, México

^b Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, México

^c Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Calle 41 No. 439, Col. Industrial, Mérida, Yucatán 97200, México

ABSTRACT

Aim of the study: To investigate the potential of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms using the Mayan ethnobotany literature, and evaluate their organic extracts for *in vitro* cytotoxic activity on cancer cell lines.

Materials and methods: The selection of the plants studied in this investigation was based on the Mayan ethnobotanical information provided by different literature sources. Extracts were obtained by maceration with methanol for 72 h of each plant part used and evaporated *in vacuo* to give the corresponding dried extract. Each methanol extract was tested for its cytotoxicity using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay performed in 96-well tissue plates on seven cancer cell lines, lung carcinoma (A549), cervix adenocarcinoma (HeLa), laryngeal carcinoma (Hep-2), nasopharynx carcinoma (KB), breast adenocarcinoma (MCF-7), prostate adenocarcinoma (PC-3), and cervix squamous carcinoma cells (SiHa), as well as normal human embryonic kidney cell line (HEK-293). Cell proliferation/viability was spectrophotometrically assessed at 540 nm after addition of MTT.

Results: 51 plants were found in the literature to be used for the treatment of symptoms suggestive of cancer, 21 were chosen to evaluate the cytotoxic activity. *Aeschynomene fascicularis* root bark extract showed a pronounced cytotoxic activity on HeLa and KB cell lines and *Bonellia macrocarpa* stem

and root bark extracts showed similar prominent activities on KB cells. Conclusion: 21 plants were selected according to their use in the treatment of cancer-like symptoms recorded in the ethnobotanical literature. Plant extracts prepared from *Aeschynomene fascicularis* root bark and *Bonellia macrocarpa* stem and root bark have been selected for extensive studies leading to the isolation of the active constituents.

2.1. INTRODUCTION

About three-quarters of the world population have used traditional medicine for their health care (Gilani and Atta-ur-Rahman, 2005). Plants have been an important part of sophisticated traditional medicine systems for thousands of years (Gurib-Fakim, 2006). Furthermore, 50% of anticancer drugs used in clinical trials have been isolated from natural sources (mostly plants) or are related to them (Newman and Cragg, 2007). Therefore, traditional medicinal plants can serve as potential sources in the development of new, more effective anticancer agents for future therapy. In Mexico, medicinal plants have been used in urban and rural communities as a common practice for the control of many types of diseases, including cancer. Yucatan has extensive records of ethnobotanical bibliography from the middle of the nineteenth century until now (Osadao, 1834; Roys, 1931; Barrera Marin *et al.*, 1976; Mendieta and Amo, 1981; Arellano-Rodriguez *et al.*, 2003). Moreover, these records describe the most frequently used plants in the treatment of conditions consistent with cancer symptomatology: abscesses, calluses, corns, hard swellings, polyps, tumors, or warts. Such symptoms would generally apply to skin with tangible or visible conditions, and may indeed sometimes correspond to a cancerous condition (Popoca *et al.*, 1998; Cragg and Newman, 2005). On the other hand, few studies of potential activity of Mayan medicinal plants have been reported (Ankli *et al.*, 2002; Mena-Rejon *et al.*, 2009). In our continuous effort to search for novel anticancer agents from Mayan medicinal plants of the Yucatan peninsula, we investigated the Mayan ethnobotanical literature for medicinal plants with potential cancer-healing properties and evaluated their cytotoxic activity.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. ETHNOBOTANICAL SEARCH

The selection of the plants studied in this investigation was based on the Mayan ethnobotanical information provided by different literature sources. Plants were chosen according to their use against symptomatology suggestive of cancer, including: abscesses, chronic fatigue, infected wounds, inflammation, pain in internal organs, perforations, skin disorders, and ulcers. Moreover, the following criteria were followed to select the

plants: (1) Plants used against any of the symptoms mentioned above; (2) Plants mentioned in the ethnobotanical literature with full scientific name; (3) Endemic or native plants of Yucatan peninsula; (4) Plants with no more than ten cytotoxic and/or chemical studies.

2.2.2. PLANT MATERIAL

The plants were collected from different locations around the Yucatan peninsula in Mexico (Tabla 2.1). The plant material was identified and authenticated by taxonomists, from the Department of Natural Resources of the Scientific Research Center of Yucatan (CICY). Voucher specimens were deposited at CICY's U Najil Tikin Xiw herbarium.

2.2.3. PREPARATION OF EXTRACTS

The plant material (10 g per plant part) was air dried at room temperature, powdered, and extracted by maceration at room temperature with methanol for 72 h. The supernatants were filtered and evaporated under vacuum by means of a rotary evaporator to obtain methanolic extracts. A total of 41 extracts were prepared. In general, most of the extracts were obtained at a yield of about 10–20%.

2.2.4. PREPARATION OF STOCK SOLUTION

Samples of 10 mg of each extract were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) prior to adding the appropriate culture medium and stocked at a concentration of 10 mg/mL.

2.2.5. CELL CULTURE

Cell lines of lung carcinoma (A549, ATCC-CCL-185), cervix adenocarcinoma (HeLa, ATCC-CCL-2), laryngeal carcinoma (Hep-2, ATCC-CCL-23), nasopharynx carcinoma (KB, ATCC-CCL-17), breast adenocarcinoma (MCF-7, ATCC-HTB-22), prostate adenocarcinoma (PC-3, ATCC-CRL-1435), cervix squamous carcinoma (SiHa, ATCC-HTB-35), and a human cell embryonic kidney cell line (HEK-293, ATCC-CRL-1573), from the American Type Culture Collection (ATCC), were kindly provided by Veronica Vallejo-Ruiz from the East Biomedical Research Center (IMSS, Mexico). The cells were cultured in sterile Costar T75 flasks containing D-MEM medium (Gibco), supplemented with fetal bovine serum (10%, v/v), 100 U/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ (95% humidity).

Tabla 2.1. Plant species included in the present study.^a

Species (voucher number)	Plant part used ^b	Family	Status	Common name	Location	Some ailments treated
<i>Aechmea bracteata</i> (Sw.) Griseb. (P. Simá 2974)	WP	Bromeliaceae	Native	X-cinta ku'uk	Dzemul, Yucatán	Hard swellings
<i>Aeschynomene fascicularis</i> Schlttd. & Cham. (P. Simá 2997)	AP, RB	Leguminosae	Native	Kabal pich	Yaxcabá, Yucatán	Tumors
<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liemb. (P. Simá 2972)	SB	Picramniaceae	Native	X-bel sinik ché	Mocochá, Yucatán	Skin disorders
<i>Bonellia macrocarpa</i> Cav. (P. Simá 2979)	L, SB, RB	Theophrastaceae	Native	Si'ik	Telchac Puerto, Yucatán	Mouth sores
<i>Bourreria pulchra</i> Millsp. (P. Simá 2969)	L, SB	Boraginaceae	Native	Bakal che, sak boj	Chablecal, Yucatán	Skin rashes
<i>Casearia corymbosa</i> Kunth. (P. Simá 2980)	L, SB	Flacourtiaceae	Native	Xi'imché, ixim ché	Othón P. Blanco, Quintana Roo	Skin malignancies
<i>Ficus cotinifolia</i> Kunth (P. Simá 3017)	L, SB	Moraceae	Native	Sak'awaj, akum	Yaxcabá, Yucatán	Tumors
<i>Gouania lupuloides</i> (L.) Urban. (P. Simá 2973)	L, SB, RB	Rhamnaceae	Native	Ich pek'	Mocochá-Baca, Yucatán	Malignant ulcers
<i>Guaiacum sanctum</i> L. (P. Simá 2976)	L, SB	Zygophyllaceae	Native	Guayacán	Dzemul, Yucatán	Sores
<i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. (P. Simá 2978)	B	Amaryllidaceae	Native	Lino K'aax	Telchac Puerto, Yucatán	Tumors
<i>Laetia thamnina</i> L. (P. Simá 2981)	L, SB	Flacourtiaceae	Native	Ixim ché, ch'aw ché	Othón P. Blanco, Quintana Roo	Skin malignancies
<i>Phoradendron vemicosum</i> Greenm. (P. Simá 2999)	L, SB	Viscaceae	Native	K'awis	Kantunil, Yucatán	Abscesses
<i>Phyllanthus nobilis</i> (L. f.) Müll. Arg. (P. Simá 2982)	L	Euphorbiaceae	Native	Ixim ché, sak iximché	Othón P. Blanco, Quintana Roo	Skin malignancies
<i>Piper auritum</i> (L.) HBK. (P. Simá 2975)	L	Piperaceae	Native	X-makulan, kak'ulan	Baca, Yucatán	Wounds
<i>Psittacanthus americanus</i> (L.) Mart. (P. Simá 2970)	L, SB	Loranthaceae	Native	X-k'awis	Chablecal, Yucatán	Abscesses
<i>Rauwolfia tetraphylla</i> R & S. (P. Simá 2971)	L, SB	Apocynaceae	Native	Kaabal muk	Chablecal, Yucatán	Non-healing sore and ulcers
<i>Serjania gonicarpa</i> Radlk. (P. Simá 3000)	L, SB	Sapindaceae	Native	Ch'em pe'ek'	Yaxcabá, Yucatán	Sores on legs
<i>Stachytarpheta frantzii</i> Pol. (P. Simá 2983)	AP, RB	Verbenaceae	Native	X-polk'uy	Othón P. Blanco, Quintana Roo	Wounds
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (L.) Vahl. (P. Simá 2998)	AP, RB	Verbenaceae	Native	Ibin xiu	Sotuta, Yucatán	Sores
<i>Suriana maritima</i> L. (P. Simá 2977)	L, SB, RB	Simaroubaceae	Native	Pats'il	Telchac Puerto, Yucatán	Mouth sores
<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn. (P. Simá 2996)	L, SB, RB	Portulacaceae	Native	K'aax, ts'un yail	Yaxcabá, Yucatán	Tumors

^a (Osadao, 1834; Barrera *et al.*, 1976; Mendieta and Amo, 1981; Arrellano *et al.*, 2003).

^b AP = aerial part, B = bulb, L = leaves, RB = root bark, SB = stem bark, WP = whole plant.

2.2.6. CYTOTOXICITY ASSAY

Cytotoxicity was assessed in the MTT assay as described previously by Rahman *et al.* (2001). At 70–80% confluence, cells were detached from the cultured flask by treatment with 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) and a suspension of 1.5×10^4 cell/mL of viable cells was seeded in a 96-well microtitre plate (Costar) and incubated for 24 h. When cells reached >80% confluence, the medium was replaced and cells were incubated with stock solutions of crude extracts serially diluted to reach concentrations of 50.0, 25.0, 12.5, and 6.25 $\mu\text{g/mL}$. After 72 h of incubation, 10 μl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma) solution (5 mg/mL) were added to each well and incubated at 37 °C for 4 h. The medium was aspirated, and the formazan product was solubilized with acidified isopropanol (0.4N HCl). The amount of MTT-formazan is directly proportional to the number of living cells and was determined by measuring the optical density (OD) at 590 nm using a bioassay reader (BioRad, USA). Docetaxel was used as a positive control, whereas cells incubated only with 0.05% of DMSO was used as a negative control. The final concentration of DMSO never exceeded 0.1% of the culture medium, a concentration which has no effect on the growth of cells (Trivedi *et al.*, 1990). The concentration of the crude extract that killed 50% of the cells (CC_{50}) was calculated by GraphPad Prism 4 software. All determinations were performed in triplicate. An extract is considered active if it exerts a CC_{50} value $\leq 30 \mu\text{g/mL}$, according to the guidance of The National Cancer Institute (Suffness and Pezzuto, 1990). In addition, the level of harmfulness on normal cells was evaluated, by determining the selectivity index (SI) of each extract, which is calculated as the ratio of cytotoxicity on normal cells to cancer cells ($\text{SI} = \text{CC}_{50} \text{ normal cells} / \text{CC}_{50} \text{ cancer cells}$) (Mena-Rejon *et al.*, 2009). It is generally considered that biological efficacy is not due to cytotoxicity when $\text{SI} \geq 10$ (Vonthron-Sénécheau *et al.*, 2003).

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

From 51 plants found in the literature used for the treatment of symptoms that are suggestive of cancer, 21 were chosen (Tabla 2.1) and 30 were not selected (Tabla 2.2), based on the previously described criteria. The two main criteria applied to exclude these species were that they are exotic plants and extensive studies of these plants already exist. Of all the species selected for this study, five (*Hymenocallis littoralis*, *Stachytarpheta jamaicensis*, *Piper auritum*, *Rauvolfia tetraphylla*, and *Petiveria alliacea*) have the largest number of conducted studies in a range of 1–9, including cytotoxicity and chemical studies. Of the remaining plants, 16 have not been studied as concerning cytotoxic activity. Four of these plants showed no chemical or biological studies in the literature: *Aeschynomene fascicularis*,

Tabla 2.2. Plant species not included in the present study.^a

Species	Family	status	Common name	Some ailments treated	Biological activity ^b	Compound records ^b
<i>Allium cepa</i> L.	Lilaceae	Exotic	Cucut	Cancer	808	825
<i>Allium sativum</i> L.	Lilaceae	Exotic	Ajo	Tumors	2236	741
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Asteraceae	Exotic	Zisim	Skin disorders	188	400
<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i> L.	Amaranthaceae	Exotic	Acelga	Sores	158	353
<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	Burseraceae	Native	Chacah	Sores	123	15
<i>Capraia biflora</i> L.	Scrophulariaceae	Native	Claudiosa xiu	Vaginal swelling	22	7
<i>Capsicum annum</i> L.	Solanaceae	Native	Maax iik	Hard swelling	134	85
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Native	Papaya	Skin disorders	462	418
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Bombacaceae	Native	Pochote	Skin disorders	66	30
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	Asteraceae	Native	Tok' abam	Sores and tumors	123	184
<i>Citrus aurantium</i> L.	Rutaceae	Exotic	Pakal	Tumors	473	451
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Umbelliferae	Exotic	Cilantro	Sores	358	377
<i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw.	Costaceae	Native	Pahtsab	Kidney cancer	91	18
<i>Croton flavens</i> L.	Euphorbiaceae	Native	Ek' balam	Sores and swelling	16	32
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Poaceae	Native	Grama	Tumors	112	28
<i>Datura stramonium</i> L.	Solanaceae	Exotic	Xtokú	Sores, cancer and swelling	201	439
<i>Dioscorea alata</i> L.	Dioscoreaceae	Exotic	Makal	Tumors	19	22
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	Exotic	Higuera	Tumors	118	215
<i>Gossypium barbadense</i> L.	Malvaceae	Exotic	Taman	Sores and cancer	30	218
<i>Jasminum officinale</i> L.	Oleaceae	Exotic	Jazmin	Malignant sores	26	30
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	Exotic	Higuerrilla	Skin disorders	432	258
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Native	Xconte	Sores	810	338
<i>Ocimum micranthum</i> Willd.	Lamiaceae	Native	Xcaltun	Mouth sores	63	62
<i>Orobancha</i> sp	Orobanchaceae	---	Acam	Hard swelling	---	---
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Native	Pichi	Skin disorders	444	408
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Exotic	Romero	Tumors	450	525
<i>Ruellia tuberosa</i> L.	Acanthaceae	Native	Kabal ya' ax niik	Cancer	7	47
<i>Solanum nigrum</i> L.	Solanaceae	Native	Bacal kan	Sores	366	141
<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum.	Apocynaceae	Native	Acitz	Skin malignant	113	172
<i>Ureia baccifera</i> (L.) Gaud.	Urticaceae	Native	Popox	Sores and malignant ulcers	45	1

^a(Osadao, 1834; Barrera *et al.*, 1976; Miendieta and Amo, 1981; Arrellano *et al.*, 2003).

^bDatabase (Napralet™, Pubmed™, ScienceDirect™). ^cUnidentified.

Bonellia macrocarpa, *Phoradendron vernicosum*, and *Psittacanthus americanus*. Forty-one methanol extracts were processed and obtained from 21 plants selected according to the use of different plant parts in traditional medicine (Tabla 2.1). The cytotoxicity test revealed that twelve extracts (29.2%) of ten plant species showed some cytotoxic activity (<50 µg/mL) in at least one cell line (Tabla 2.3). Interestingly, six extracts exhibited relevant cytotoxic activity (≤30 µg/mL).

Extract of *Aeschynomene fascicularis* root bark showed the highest activity on KB, HeLa, and SiHa with CC₅₀ of 14.0, 17.0, and 24.0 µg/mL, respectively. This extract showed low selectivity on the three tumor lines with SI = 0.8–1.3. These results are consistent with the external use as an ointment of *Aeschynomene fascicularis* for treating superficial tumors (Osadao, 1834) and give support to its use as Mayan folk medicine. Furthermore, we propose the study of this plant using *in vivo* biological models of malignant melanoma. There are no previous studies on *Aeschynomene fascicularis*, however, cytotoxic activity of the ethanol extract obtained from the entire plant of a related species, *Aeschynomene stolzii*, has been reported (Suffness *et al.*, 1988). Additionally, from the species *Aeschynomene mimosifolia* an unusual styrylcycloheptenone has been isolated with moderate cytotoxic activity on KB cells (CC₅₀ = 3.3 µg/mL) (Fullas *et al.*, 1996).

Notable activity was observed when the extract of *Bonellia macrocarpa* root bark was tested on KB and Hep-2 cell lines, with CC₅₀ = 15.3 and 20.0 µg/mL, respectively. Additionally, this extract was moderately active on PC-3, SiHa, MCF-7 and HeLa cell lines (CC₅₀ = 30–40 µg/mL). In addition, extract of *Bonellia macrocarpa* stem bark was active on the KB cell line with a CC₅₀ = 18.6 µg/mL. However, both extracts showed low selectivity on tumor cell lines (SI = 1.1–3.3). In the Mayan traditional medicine, this plant has been used as a topical decoction to treat mouth sores (Osadao, 1834). The activities of *Bonellia macrocarpa* stem and root barks on the KB cell line correlate well with its ethnomedical use to treat symptoms suggestive of mouth cancer. Only two species of genus *Bonellia* has been previously subjected to biological and phytochemical investigations: *Bonellia nervosa*, from which cytotoxic activity of its aerial parts has been found against human cancer cell lines (Calderón *et al.*, 2006) and the specie *Bonellia flammea*, from which a cytotoxic saponin was isolated (Sánchez-Medina *et al.*, 2010). Extracts of *Alvaradoa amorphoides* stem bark, *Phoradendron vernicosum* leaves, and *Serjania gonicarpa* leaves exhibited moderate cytotoxic activity on KB cells at CC₅₀ = 22.4, 29.0, and 23.3 µg/mL, respectively, with moderate selectivity (SI = 3.8–8.0). Additionally, *Alvaradoa amorphoides* showed moderate activity on MCF-7 cells at CC₅₀ = 37.3 µg/mL. The Mayan traditional medicine describes that the decoction of these three plants has been used for external bathing to treat skin disorders.

Table 2.3. Cytotoxicity and selectivity index of the most active extracts

Species (Plant part)	Cell lines CC_{50} $\mu\text{g/mL}$ (SI)							
	HEK-293	A549	HeLa	Hep-2	KB	MCF-7	PC-3	SiHa
<i>Aeschynomene fasciculata</i> (RB)	18.3	--- ^d	17.0 (1.1)	--	14.0 (1.3)	--	--	24.0 (0.8)
<i>Alvaradoa amorphoides</i> (SB)	180.0	--	--	--	22.4 (8)	37.3 (3.6)	--	--
<i>Bonellia macrocarpa</i> (RB)	42.7	--	39.4 (1.1)	20.0 (2.1)	15.3 (2.7)	33.1 (1.3)	30.3 (1.4)	31.5 (1.4)
	61.3	--	--	--	18.6 (3.3)	--	--	--
<i>Casearia corymbosa</i> (SB)	98.7	--	35.4 (2.7)	--	--	--	--	32.3 (3.1)
<i>Hymenocallis littoralis</i> (SB)	103.6	--	--	--	34.4 (3.0)	--	--	33.1 (3.1)
<i>Laetia thamnifera</i> (L)	367.2	--	--	--	40.6 (9.0)	47.6 (7.7)	--	--
	67.3	--	--	--	44.0 (1.5)	--	--	--
<i>Phoradendron vernicosum</i> (L)	123.1	--	--	--	29.0 (4.2)	--	--	--
<i>Serjania gonicalis</i> (L)	89.7	--	--	--	23.3 (3.8)	--	--	--
<i>Stachytarpheta fraxinifera</i> (RB)	67.9	--	--	--	46.9 (1.4)	43.8 (1.6)	--	--
<i>Suriana maritima</i> (RB)	256.8	--	--	--	41.5 (6.2)	--	--	--
Docetaxel	1.6	0.03 (53)	0.08 (20)	0.2 (8)	0.18 (8.8)	0.01 (160)	0.1 (16)	0.23 (6.9)

^a B = bulb, L = leaves, RB = root bark, SB = stem bark, CC_{50} = 50% cytotoxic concentration, SI = selective index, $CC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$

From leaves of *Alvaradoa amorphoides*, chrysophanic acid, chrysophanein, and chaparrin have been isolated (Soto de Villatorio *et al.*, 1974). However, there are not reports of compounds isolated from the stem bark. In addition, a series of cytotoxic anthracenone C-glycosides (alvaradoins A-N) has been isolated from the species *Alvaradoa jamaicensis* and *Alvaradoa haitiensis* (Harding *et al.*, 1999; Phifer *et al.*, 2007).

From the genus *Phoradendron*, isolation of novel small proteins (ligatoxins A-F) exhibiting *in vitro* cytotoxicity against a panel of human cancer cell lines (Mellstrand and Samuelsson, 1973; Li *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2003), as well as a cytotoxic lectin (Endo *et al.*, 1989), and one new cytotoxic triterpene (Rios *et al.*, 2001), have been reported. The cytotoxic activity of *Phoradendron vernicosum* may be due to the presence of low-molecular-weight proteins described in other species of the genus.

Regarding the species *Serjania gonicarpa*, there no reports in the literature about its metabolites or cytotoxic activity. However, in some species of the genus *Serjania* antiprotozoal (Mesquita *et al.*, 2005), antibacterial (De Lima *et al.*, 2006), antioxidant (David *et al.*, 2007), anti-inflammatory (Gomig *et al.*, 2008), and insecticidal (Rodrigues *et al.*, 2006) activities have been reported. In addition, from *Serjania lethalis* saponins with ichthyotoxic activity have been isolated (Teixeira *et al.*, 1984), and from *Serjania salzmänniana* fungicidal and molluscicidal saponins have been reported (Ekabo *et al.*, 1996). Furthermore, there are several reports on cytotoxic saponins (Shibata, 2001; Chen *et al.*, 2009; Yokosuka and Mimaki, 2009); therefore the cytotoxicity observed in this study could be due to this class of compounds.

In addition, moderate activity was exhibited by *Hymenocallis littoralis* bulbs, *Casearia corymbosa* stem bark, *Laetia thamnina* leaves and stem bark, *Stachytarpheta frantzii* root bark, and *Suriana maritima* root bark (Table 3.1). The bulb of *Hymenocallis littoralis*, known as *lirio k'aat*, has been used for tumor treatment. In this study, extract of *Hymenocallis littoralis* bulb demonstrated low cytotoxic activity and selectivity (SI \approx 3) on SiHa and KB cell lines (CC₅₀ = 33.1 and 34.4 μ g/mL, respectively). Cytotoxic activity from *Hymenocallis littoralis* extract has not been previously reported, however, alkaloids have been isolated from this plant which could be responsible for the cytotoxic activity (Lin *et al.*, 1995).

Extract of *Casearia corymbosa* stem bark exhibited moderate cytotoxic activity against HeLa and SiHa cell lines (CC₅₀ = 35.4 and 32.3 μ g/mL, respectively) with low selectivity (SI \approx 3). It is remarkable the specificity of *Casearia corymbosa* extract on cervical cancer cell lines, which could be standardized in further studies as phytomedicine. Previous phytochemical studies of *Casearia corymbosa* stem bark indicated the presence of clerodane diterpenes (Khan *et al.*, 1990). Recent phytochemical and biological studies of the genus *Casearia* indicate that the cytotoxic activity exhibited by the species of this genus is due to the presence of clerodane-

type diterpenes (Beutler *et al.*, 2000; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2010).

Extracts of *Laetia thamnina* leaves and stem bark showed activity on KB cells, the leaves showing good selectivity (SI = 9). Selectivity is important because most anticancer drugs currently in use induce serious adverse effects. There are no chemical or biological studies of *Laetia thamnina* stem bark, but entkaurene diterpenes with moderate activity against a panel of cancer cell lines have been isolated from the leaves (Henry *et al.*, 2006).

Extract of *Stachytarpheta frantzii* root bark showed activity on KB and MCF-7 cells with low selectivity. There are no previous studies on this species. However, some chemical studies of the genus *Stachytarpheta* indicate the presence of alkaloids, iridoids, and phenylpropanoids (Alice *et al.*, 1991; Schapoval *et al.*, 1998). This plant is interesting for further phytochemical studies to isolate cytotoxic compounds.

Finally, extract of *Suriana maritima* root bark showed activity on KB cells, however, moderate selectivity was observed. Previous studies have reported from this plant triterpenes and flavonoid glycosides (Mitchell and Geissman, 1971). In addition, Reynertson *et al.* (2011) isolated protocatechuic acid and the flavonoids rutin and 7-O-methylrutin with cytotoxic effect.

From the selected plants some have Mayan synonymy, for example: *Casearia corymbosa*, *Laetia thamnina*, and *Phyllanthus nobilis* species are all commonly known as *ixim ché* (Tabla 2.1); possibly, this designation was made by the ancient inhabitants due to the morphological similarity of the three plants; either one or the other could have been used for the treatment of skin malignancies (Osadao, 1834).

Despite this Mayan synonymy, we showed that only the species *Casearia corymbosa* and *Laetia thamnina* have cytotoxic activity. Another Mayan synonym is applied to the parasitic plants *Phoradendron vernicosum* and *Phoradendron americanus*, commonly known as *k'awis* (Tabla 2.1), of which only *Phoradendron vernicosum* showed cytotoxic activity. Mayan synonymy is an issue to face in ethnopharmacological studies, and the present work shows the crucial importance of updating the bibliographic data with surveys among the Mayan population or traditional healers, taking into account herbarium specimens.

2.4. CONCLUSIONS

In this study we described the cytotoxic activity of 21 plants, which were selected according to their use in the treatment of cancer-like symptoms recorded in the ethnobotanical literature. The results achieved support their ethnomedical uses in the cure of cancer-like symptoms among the populace. The present preliminary screening justifies continuing with the purification of the crude extracts and isolation of active compounds to improve their potential as anticancer drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the *U Najil Tikin Xiw* herbarium from CICY, and Silvia Andrade-Canto (CICY) and Juan Chalé-Dzul (IMSS) for their technical assistance. This work was supported by grant FIS/IMSS/PROT/472 of Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). The authors are grateful to Dr. Glenn Jackson and Dr. Andrew James for English review of the paper.

2.5. REFERENCES

- Alice, C.B., Vargas, V.M., Silva, G.A., Siqueria, N.C., Schapoval, E.E., Gleeve, J. (1991). Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 165–171.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 43–52.
- Arellano-Rodriguez, J., Flores-Guido, J., Tun-Garrido, J., Cruz-Bojorquez, M. (2003). Leguminosae. In: *Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo y Distribución de las Especies Vegetales de la Península de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 312–380.
- Barrera Marin, A., Barrera Vázquez, A., López Franco, R.M. (1976). *Nomenclatura Etnobotánica Maya*. Instituto Nacional de Antropología e Historia Press, México, pp. 194–301.
- Beutler, J.A., McCall, K.L., Herbert, K., Herald, D.L., Pettit, G.R., Johnson, T., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. (2000). Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. *Journal of Natural Products* 63, 657–661.
- Calderón, A., Vázquez, Y., Solís, P., Caballero-George, C., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Correa, M., Gupta, M. (2006). Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. *Pharmaceutical Biology* 44, 130–140.
- Chen, H.F., Wang, G.H., Luo, Q., Wang, N.L., Yao, X.S. (2009). Two new steroidal saponins from *Allium macrostemon* bunge and their cytotoxicity on different cancer cell lines. *Molecules* 19, 2246–2253.
- Cragg, G., Newman, N. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72–79.
- David, J.P., Meira, M., David, J.M., Brandão, H.N., Branco, A., De Fátima-Agra, M., Barbosa, M.R., De Queiroz, L.P., Giulietti, A.M. (2007). Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia* 78, 215–218.
- De Lima, M.R., De Souza-Luna, J., Dos Santos, A.F., De Andrade, M.C., Goulart Sant'Ana, A.E., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N. (2006). Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 137–147.
- Dos Santos, A.G., Pinheiro Ferreira, P.M., Vieira Jr., G.M., Perez, C.C., Gomes Tininis, A., Silva, G.H., Da Silva Bolzani, S., Costa-Lotufo, L.V., Do Ó Pessoa, C., Cavalheiro, A.J. (2010). Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chemistry & Biodiversity* 7, 205–215.

- Ekabo, O.A., Farnsworth, N.R., Henderson, T.O., Mao, G., Mukherjee, R. (1996). Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *Journal of Natural Products* 59, 431–435.
- Endo, Y., Oka, T., Tsurugi, K., Franz, H. (1989). The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 248, 115–118.
- Fullas, F., Kornberg, L.J., Wani, M.C., Wall, M.E., Farnsworth, N.R., Chagwedera, T.E., Kinghorn, A.D. (1996). Two new aromatic constituents from the rootwood of *Aeschynomene mimosifolia*. *Journal of Natural Products* 59, 190–192.
- Gilani, A., Atta-ur-Rahman. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 43–49.
- Gomig, F., Pietrovski, E.F., Guedes, A., Dalmarco, E.M., Calderari, M.T., Guimarães, C.L., Pinheiro, R.M., Cabrini, D.A., Otuki, M.F. (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 118, 220–224.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1–93.
- Harding, W., Henry, G., Lewis, P., Jacobs, H., McLean, S., Reynolds, W. (1999). Alvaradoins A-D. Anthracenone C arabinosides from *Alvaradoa jamaicensis*. *Journal of Natural Products* 62, 98–101.
- Henry, G.E., Adams, L.S., Rosales, J.C., Jacobs, H., Heber, D., Seeram, N.P. (2006). Kaurene diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Letters* 8, 190–194.
- Johansson, S., Gullbo, J., Lindholm, P., Ek, B., Thunberg, E., Samuelsson, G., Larsson, R., Bohlin, L., Claeson, P. (2003). Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cellular and Molecular Life Science* 60, 165–175.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Buayairaksa, M. (2007). Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. *Journal of Natural Products* 70, 1122–1126.
- Khan, M.R., Gray, A.I., Sadler, I.H., Waterman, P.G. (1990). Clerodane diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. *Phytochemistry* 29, 3591–3595.
- Li, S.S., Gullbo, J., Lindholm, P., Larsson, R., Thunberg, E., Samuelsson, G., Bohlin, L., Claeson, P. (2002). Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *The Biochemical Journal* 366, 405–413.
- Lin, L.Z., Hu, S.F., Chai, H.B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ruangrunsi, N. (1995). Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry* 40, 1295–1298.

- Mellstrand, S.T., Samuelsson, G. (1973). Phoratoxin, a toxic protein from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* subsp. *macrophyllum* (Loranthaceae), improvements in the isolation procedure and further studies on the properties. *European Journal of Biochemistry* 32, 143–147.
- Mena-Rejon, 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* 30, 462–465.
- Mendieta, R., Amo, S. (1981). *Plantas Medicinales del Estado de Yucatán*. Continental-INIREB Press, México, p. 428.
- Mesquita, M.L., Desrivot, J., Bories, C., Fournet, A., Paula, J.E., Grellier, P., Espindola, L.S. (2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 783–787.
- Mitchell, R.E., Geissman, T.A. (1971). Constituents of *Suriana maritima*: a triterpene diol of novel structure and a new flavonol glycoside. *Phytochemistry* 10, 1559–1567.
- 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.
- Osadao, R. (1834). *El Libro del Judío o Medicina Doméstica, Descripción de las Virtudes de las Yervas Medicinales de Yucatán*. Additional notes of Dr. Andrew Heath de Zapata, Mérida, Yucatán, México, pp. 20–255.
- Phifer, S., Lee, D., Seo, E., Kim, N., Graf, T., Kroll, D., Navarro, H., Izydore, R., Jiménez, F., Garcia, R., Rose, W., Fairchild, C., Wild, R., Soejarto, D., Farnsworth, N., Kinghorn, D., Oberlies, N., Wall, M., Wani, M. (2007). Alvaradoins E-N, antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*. *Journal of Natural Products* 70, 954–961.
- Popoca, J., Aguilar, A., Alonso, D., Villarreal, M.L. (1998). Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 59, 173–177.
- Rahman, A., Choudhary, M.I., Thomsen, W.J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. Taylor & Francis Group, Netherlands, pp. 34–35.
- Reynertson, K.A., Charlson, M.E., Gudas, L.J. (2011). Induction of murine embryonic stem cell differentiation by medicinal plant extracts. *Experimental Cell Research* 317, 82–93.
- Rios, M.Y., Salina, 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.

- Rodrigues, A.M., De Paula, J.E., Degallier, N., Molez, J.E., Espindola, L.S. (2006). Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22, 314–317.
- Roys, R. (1931). *The Ethnobotany of the Mayan*. The Tulane University of Louisiana Press, USA, pp. 213–316.
- Sai-Prakash, C.V., Hoch, J.M., Kingston, D.G. (2002). Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products* 65, 100–107.
- Sánchez-Medina, A., Peña-Rodríguez, L.M., May-Pat, F., Karagianis, G., Waterman, P.G., Mallet, A.L., Habtemariam, S. (2010). Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications* 5, 365–368.
- Schapoval, E.E., Vargas, M.R., Chaves, C.G., Bridi, R., Zuanazzi, J.A., Henriques, A.T. (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 53–59.
- Shen, Y.C., Wang, C.H., Cheng, Y.B., Wang, L.T., Guh, J.H., Chien, C.T., Khalil, A.T. (2004). New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. *Journal of Natural Products* 67, 316–321.
- Shibata, S. (2001). Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *Journal of Korean Medical Science* 16, 28–37.
- Soto de Villatorio, B., Gonzalez, F., Polonsky, J., Baskevitch-Varon, Z. (1974). Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from *Alvaradoa amorphoides*. *Phytochemistry* 13, 2018–2019.
- Suffness, M., Abbot, B., Statz, D., Wonilowicz, E., Spjut, R. (1988). The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytotherapy Research* 2, 89–97.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M. (1990). Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, vol. 6. Academic Press, London, pp. 71–133.
- Teixeira, J.R., Lapa, A.J., Souccar, C., Valle, J.R. (1984). Timbós: ichthyotoxic plants used by Brazilian Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 10, 311–318.
- Trivedi, A., Kitabatake, N., Doi, E. (1990). Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 2961–2966.
- Vieira Jr., G.M., De Oliveira Gonc. alves, T., Regasini, L.O., Pinheiro Ferreira, P.M., Do Ó Pessoa, C., Costa Lotufo, L.V., Buzanelli Torres,

- R., Boralle, N., Da Silva Bolzani, V., Cavalheiro, A.J. (2009). Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. *Journal of Natural Products* 72, 1847–1850.
- Vonthron-Sénécheau, C., Bernard-Weniger, B., Ouattara, M., Tra-Bi, F., Kamenan, A., Lobstein, A., Brun, R., Anton, R. (2003). In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 221–222.
- Williams, R.B., Norris, A., Miller, J.S., Birkinshaw, C., Ratovoson, F., Andriantsiferana, R., Rasamison, V.E., Kingston, D.G. (2007). Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. *Journal of Natural Products* 70, 206–209.
- Yokosuka, A., Mimaki, Y. (2009). Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 70, 807–815.

Capítulo III

Bonediol, a new alkyl catechol from *Bonellia macrocarpa*

Edgar Caamal-Fuentes,^a Luis W. Torres-Tapia,^a Roberto Cedillo-Rivera,^b
Rosa Moo-Puc,^b Sergio R. Peraza-Sánchez,^{a,*}

^a Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México 97200

^b Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Calle 41 No. 439, Col. Industrial, Mérida, Yucatán, México 97150

* Corresponding autor: Tel. +52 999 9428330; fax: +52 999 9813900. E-mail address: speraza@cicy.mx (S.R. Peraza-Sánchez).

ABSTRACT

A new alkyl catechol (bonediol) was isolated from root bark of *Bonellia macrocarpa*. The structure of bonediol was characterized by spectral analysis (UV, IR, 1D & 2D NMR, and MS). Bonediol exhibited certain activity and selectivity on three cancer cell lines (KB, Hep-2 and SiHa).

Keywords: *Bonellia macrocarpa*; Theophrastaceae; Alkyl catechol; Bonediol; Antiproliferative activity

3.1. INTRODUCTION

The Theophrastaceae constitutes a family of six genera and about 100 species. The genus *Bonellia* consists of 22 species, distributed in Mesoamerica, northern and western South America, and the Greater Antilles (Ståhl and Källersjö, 2004). In the Yucatan peninsula, this genus is represented by five species (Fernández-Concha *et al.*, 2003), of which *Bonellia macrocarpa* (Cavanilles) Ståhl & Källersjö, is used in Mayan traditional medicine for treating cough and sore throat, mouth sores, and toothache (Osadao, 1834). Few chemical studies have been made on this genus (Rodríguez *et al.*, 1965; Sánchez-Medina *et al.*, 2010) and other genera belonging to this family (Bhattacharyya *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2006). As part of our search for new compounds with biological activity from medicinal plants of the Yucatan Peninsula, we evaluated the antiproliferative

activity of the MeOH extract of *B. macrocarpa* root bark (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011). This extract showed activity against KB, HeLa and Hep-2 human cancer cell lines. No phytochemical studies have been conducted on this species. In this paper, we describe the structure elucidation of one new alkyl catechol isolated from *B. macrocarpa* as well as its antiproliferative activity.

3.2. RESULTS AND DISCUSSION

The active MeOH extract of *B. macrocarpa* root bark was partitioned into hexane, CH₂Cl₂, AcOEt and H₂O-soluble fractions. The active hexane-soluble fraction was submitted to an antiproliferative bioassay-guided purification using a KB cell line, affording a new alkyl catechol (bonediol) as the major constituent.

Bonediol was obtained as brown-reddish oil, showing an [M + H]⁺ peak at *m/z* 295.2267 in the high resolution mass spectrum, corresponding to the molecular formula C₁₈H₃₀O₃. A fragment at *m/z* 77 observed in the EIMS and bands at 1598 and 1485 cm⁻¹ in the IR spectrum demonstrated the presence of an aromatic ring. The ¹³C NMR spectrum also indicated six aromatic carbons (Tabla 3.1). The ¹H NMR spectrum showed signals for only two *ortho*-coupled aromatic protons at δ 6.30 (d, *J* = 8.6 Hz) and δ 6.64 (d, *J* = 8.6 Hz), indicating the aromatic ring to be tetrasubstituted. The ¹H NMR spectrum also exhibited a signal for a methoxy group at δ 3.75, and signals due to a long alkyl side chain at δ 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz), 1.25-1.31 (16H, overlapped), 1.51 (homobenzyl 2H, m), and 2.61 (benzyl 2H, t, *J* = 7.6 Hz). The ¹³C NMR spectrum showed downfield aromatic signals at δ 137.2, δ 145.3, and δ 152.6, which indicated three aromatic carbons to be oxygenated. The presence of phenolic hydroxyl groups was confirmed by the IR spectrum, which showed a strong absorption band at 3410 cm⁻¹. Assignment of each substituent in the aromatic ring was determined by the 2D-NMR techniques. Then, from the HSQC spectrum the aromatic protons at δ 6.30 and δ 6.64 were assigned to carbons at δ 102.1 and δ 112.0, respectively. Two hydroxyl groups were contiguously joined from HMBC correlations at C-1 (δ 137.2) and C-2 (δ 145.3), assembling the molecule with a catechol structure. Also, in the HMBC spectrum, long range correlations of H-1' to C-2 (δ 145.3) and C-4 (δ 152.6), and H-2' to C-3 (δ 118.5), indicated that the side chain group was attached to C-3, while the methoxy group was located at C-4. Based on this analysis, the structure of the new compound was assigned as 4-methoxy-3-undecyl-benzene-1,2-diol and named as bonediol (Figura 3.1). This is the first report on the isolation of an alkyl catechol from this genus and family.

Bonediol was assayed for antiproliferative activity on one normal cell line and four human tumor cell lines (Tabla 3.2). Bonediol showed low cytotoxicity against KB (11.1 µg/mL), Hep-2 (11.1 µg/mL), and SiHa (8.3

$\mu\text{g/mL}$) cancer cell lines, with a selectivity of IS = 4.8, 4.8 and 6.5, respectively.

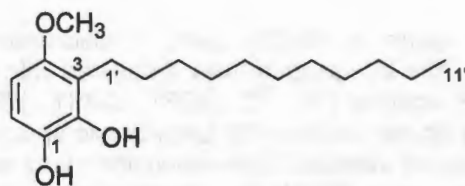


Figure 3.1. Chemical structure of bonediol.

Table 3.1. NMR spectroscopic data of bonediol (CDCl_3).

Position	δ_{H} ($J = \text{Hz}$) ^a	δ_{C} ^b	HMBC	
			² J	³ J
1		137.2		
2		145.3		
3		118.5		
4		152.6		
5	6.30 d (8.6)	102.1		C-1, C-3
6	6.64 d (8.6)	112.0		C-2, C-4
1'	2.61 t (7.6)	23.6	C-3	C-2, C-4
2'	1.51 m	29.3		C-3
3'-10'	1.25-1.31 m	22.8-32.0		
11'	0.88 t (6.8)	14.2		
4-OCH ₃	3.75 s	56.1		C-4

^a400 MHz; multiplicities; J values (Hz) in parentheses. ^b100 MHz.

Table 3.2. Antiproliferative activity of bonediol.

	Cell line IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$ ^a (SI) ^b				
	MDCK	KB	HeLa	Hep-2	SiHa
Bonediol	54.1	11.1 (4.8)	>20	11.1 (4.8)	8.3 (6.5)
Docetaxel	0.11	0.05 (2.2)	0.03 (3.6)	0.06 (1.8)	0.08 (1.3)

^a50% cytotoxic concentration; ^bSI = selective index.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. GENERAL

UV spectra were taken in MeOH using a Beckman Coulter DU-650 spectrophotometer. The IR spectrum was measured with a Nicolet Protégé spectrometer. NMR spectra (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, and HMBC) were acquired on a Bruker Avance 400 Ultra Shield spectrometer, and TMS was used as an internal standard. Low-resolution mass spectra were taken on an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph coupled to a 5975B mass spectrometer (GC-MS). High-resolution mass spectra were generated by positive chemical ionization with a JEOL GCmate 2 mass spectrometer. Column chromatography was carried out on silica gel 60 (70-230 mesh) (Merck) and sephadex LH-20 (Sigma). TLC was performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ (0.25 mm) (Merck). Spots on TLC were visualized under UV light and by spraying with phosphomolybdic acid reagent followed by heating. The optical density of the developed plates with sulforhodamine B (SRB) was read in a ThermoSpectronic spectrophotometer.

3.3.2. PLANT MATERIAL

Root bark of *B. macrocarpa* was collected in October 2007 from Telchac Puerto, Yucatan (Mexico). The plant material was identified and authenticated by taxonomists from the Department of Natural Resources of the Scientific Research Center of Yucatan (CICY). Specimens under the voucher number P.Simá 2979 were deposited at CICY's *U Najil Tikin Xiw* herbarium.

3.3.3. EXTRACTION AND ISOLATION

Dried powdered plant material (10 g) was extracted by maceration at room temperature with MeOH (3 × 500 mL) for 24 h. The supernatants were filtered and evaporated under vacuum by means of a rotary evaporator to obtain a dried extract. The MeOH extract (2 g) was suspended in 150 mL MeOH-H₂O (1:3) and extracted using 300 mL of solvents of increasing polarity: hexane, CH₂Cl₂, and EtOAc. The active hexane extract (64 mg) was chromatographed on a silica gel column (100 × 10 mm) using Hx-An (7:3) as mobile phase, to yield 10 fractions (I-X). Fraction VII (15 mg) was further purified by means of a sephadex LH-20 (100 × 10 mm) column using MeOH as eluent to yield 10 mg of pure bonediol.

3.4. 4-Methoxy-3-undecyl-benzene-1,2-diol: Brown-red oil. UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 260 (5.66), 288 (5.57); IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3410, 2955, 2919, 2842, 1598, 1485, 1454, 1285, 1250, 1122; ^1H (400 MHz, CDCl₃) and ^{13}C

(100 MHz, CDCl₃) NMR: see Table 1; EI-MS 70 eV, *m/z* (rel. int. %): 294 ([M]⁺, 100), 153 (98), 123 (25), 77 (10), 41 (13). HRCIMS: *m/z* 295.2267 [M + 1]⁺ (calcd. for C₁₈H₃₁O₃ *m/z* 295.2273).

3.3.4. ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY

Cell lines of nasopharynx carcinoma (KB, ATCC-CCL-17), cervix adenocarcinoma (HeLa, ATCC-CCL-2), laryngeal carcinoma (Hep-2, ATCC-CCL-23), and cervix squamous carcinoma (SiHa, ATCC-HTB-35), and one normal canine kidney cell line (MDCK, ATCC-CCL-34), from the American Type Culture Collection (ATCC) were kindly provided by Veronica Vallejo-Ruiz from the East Biomedical Research Center – IMSS (Mexico). The cells were cultured in sterile Costar T75 flasks containing D-MEM medium (Gibco), supplemented with fetal bovine serum (10%, v/v), 100 U/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were cultured in 96-well plates at a concentration of 5×10^4 cells per well; after cultured for 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ (95% humidity) cells were incubated with appropriate dilutions of the test compound for 48 h. The growth inhibition of the cell lines was evaluated by the sulforhodamine B method (Skehan *et al.*, 1990). Results are expressed as the concentration of agent that reduces cell growth by 50% (IC₅₀). Docetaxel was used as a positive control. All determinations were performed in triplicate. In addition, the level of harmfulness on normal cells was evaluated, by determining the selectivity index (SI) (Mena *et al.*, 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Paulino Simá-Polanco, from the Department of Natural Resources (CICY) for his help in the identification of the plant material, and Juan Chalé-Dzul (IMSS) for his technical assistance. Also, we are grateful to the Mass Laboratory of School of Chemistry, Autonomous University of Yucatan (UADY), for HRMS. This work was supported by grant FIS/IMSS/PROT/472 (IMSS).

3.4. REFERENCES

- Bhattacharyya, K., Kar, T., Dutta, P.K., Achari, B., Bocellid, G., & Righid, L. (2000). Oleana-12(13),15(16)-diene-3 α ,28-diyl diacetate. *Acta Crystallographica Section C* 56, 60–61.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., 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.
- Fernández-Concha, G.C., Hernández-Aguilar, S., & Tapia-Muñoz, J.L., 2003. A new *Jacquinia* (Theophrastaceae) from the Yucatán peninsula with a synopsis of pale-flowered species in Mesoamerica. *Novon*, 13, 289–295.
- Mena-Rejon, 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* 121, 462–465.
- Osadao, R. (1834). *El Libro del Judío o Medicina Doméstica, Descripción de las Virtudes de las Yervas Medicinales de Yucatán*. Additional notes of Dr. Andrew Heath de Zapata Mérida, Yucatán, México, pp 20–255.
- Rodríguez, L., Sánchez, C., & Romo, J. (1965). Isolation and structure of jacquinic acid. *Tetrahedron* 21, 1735–1750.
- Rojas, R., Caviedes, L., Aponte, J.C., Vaisberg, A.J., Lewis, W.H., Lamas, G., et al. (2006). Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *Journal of Natural Products* 69, 845–846.
- Sánchez-Medina, A., Peña-Rodríguez, L.M., May-Pat, F., Karagianis, G., Waterman, P.G., Mallet, Al., et al. (2010). Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Products. Communications* 5, 365–368.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107–1112.
- Ståhl, B. & Källersjö, M. (2004). Reinstatement of *Bonellia* (Theophrastaceae). *Novon*, 14, 115–118.

Capítulo IV

Estudio fitoquímico de la partición hexánica de *Bonellia macrocarpa*

4.1. ANTECEDENTES

4.1.1. FAMILIA THEOPHRASTACEAE

La familia Theophrastaceae forma una pequeña familia neotropical compuesta de siete géneros (*Clavija*, *Theophrasta*, *Neomezia*, *Deherainia*, *Votschia*, *Jacquinia* y *Bonellia*) y cerca de 100 especies. Esta familia se caracteriza por incluir árboles o arbustos ramificados o poco ramificados con hojas completamente desarrolladas que miden entre 20-120 cm de largo. No se conoce mucho acerca de esta familia de plantas; sin embargo, recientemente el género *Jacquinia* fue dividido en dos géneros distintos: los géneros *Jacquinia* y *Bonellia* (Stahl & Källersjö, 2004).

4.1.2. GENERO BONELLIA

Este género cuenta con al menos 22 especies distribuidas en Mesoamérica, al noroeste de Sudamérica y las Grandes Antillas. Se caracteriza morfológicamente por tener brotes jóvenes con vellosidades cortas uniseriadas o glabras; hojas alternas, por lo general claramente mucronadas; corola de color anaranjado, a veces blanca o blanquecina; semillas aplanadas parcialmente cubiertas por tejido de la placenta; y esclerénquima abaxial foliar adyacente a la epidermis inferior (Stahl & Källersjö, 2004).

4.1.3. ESPECIE BONELLIA MACROCARPA CAV.

La especie *Bonellia macrocarpa* se encuentra ampliamente distribuida en Mesoamérica y en gran parte de la República Mexicana. La especie está conformada por arbustos y su principal característica es el color naranja brillante de sus corolas (Stahl & Källersjö, 2004). No existen estudios químicos ni de la actividad biológica de esta especie.

4.1.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae. División: Magnoliophyta. Clase: Magnoliopsida. Orden: Ericales. Familia: Theophrastaceae. Género: *Bonellia*. Especie: *Bonellia macrocarpa* (Cavanilles) Ståhl & Källersjö (Figura 3.1).



Figura 4.1. Hojas y flores de *Bonellia macrocarpa* (Cavanilles) Ståhl & Källersjö.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para los diferentes procesos de extracción y purificación se usaron disolventes grado técnico, destilados en el laboratorio y disolventes grado analítico de varias marcas. El proceso de eliminación de disolventes se realizó mediante un evaporador rotatorio marca Büchi 461 equipado con un baño de agua y una bomba de alto vacío. Los análisis por cromatografía en capa delgada se llevaron a cabo utilizando placas cromatográficas de gel de sílice 60, de 0.2 mm de espesor, con soporte de aluminio (Merck). Como agentes reveladores se usó una disolución de ácido fosfomolibdico, ácido sulfúrico y sulfato cérico. Antes de revelar las placas fueron visualizadas bajo luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) en un gabinete de la marca Spectroline. Las columnas cromatograficas líquidas al vacío (CLV) fueron empacadas con gel de sílice 60H (Merck). También, se usó gel de sílice 60 (Merck) para empacar columnas cromatográficas de gravedad (CCG) y Sephadex LH-20 (Sigma) para columnas de exclusión molecular. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 para monitorear la composición de los extractos y las fracciones, usando las siguientes condiciones: 1 μ L de la muestra a una concentración al 1%; columnas Ultra 1 y HP-5MS (25 m \times 0.2 mm); flujo de helio de 1.0 mL/min;

programa de temperatura del horno $T_1 = 70\text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), $T_2 = 300\text{ }^\circ\text{C}$ (15 min), rampa de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. La masa molecular y el peso de los fragmentos fueron obtenidos mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un detector másico marca Agilent, modelo 6431. Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C fueron adquiridos a 400 MHz en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear marca Bruker Avance 400 ultrablindado (ppm, J en MHz, usando TMS como estándar interno).

4.2.2. EXTRACCIÓN MASIVA DE *B. MACROCARPA*

4.2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Las raíces de *B. macrocarpa* fueron colectadas en febrero de 2008 en Telchac Puerto, Yucatán. El material vegetal fue identificado por el Téc. Paulino Simá Polanco y el voucher (P.Simá 2979) fue depositado en el herbario "*U Najil Tikin Xiw*" del CICY.

4.2.2.2. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se separaron las raíces del resto de la planta, para a continuación ser secadas a temperatura ambiente y luego en un desecador de muestras vegetales a una temperatura aproximada de $40\text{ }^\circ\text{C}$. Se obtuvo 1,500 g de muestra seca, de la cual se procedió a obtener el extracto metanólico y posteriormente la partición hexánica, como previamente se ha descrito (capítulo III).

4.2.3. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA PARTICIÓN HEXÁNICA

Se utilizó el ensayo estandarizado de MTT, como se describió en el capítulo II.

4.2.4. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS I, III Y LA FRACCION II

El diagrama general de aislamiento de la partición hexánica de *B. macrocarpa* es ilustrada en la Figura 4.2. La fracción BMR-7b fue sometida a una CCG [Hx/An (9:1)] obteniéndose el compuesto I (5 mg). La fracción BMR-7c fue sometida a una CLV para obtener las fracciones BMR-10a y BMR-10b. La fracción II fue obtenida de la fracción BMR-10a utilizando una columna de permeación con Sephadex LH-20 (EtOH 100%). De la misma manera, la fracción BMR-10b fue purificada por una columna de permeación (EtOH 100%), de la cual se obtuvo el compuesto III (5 mg).

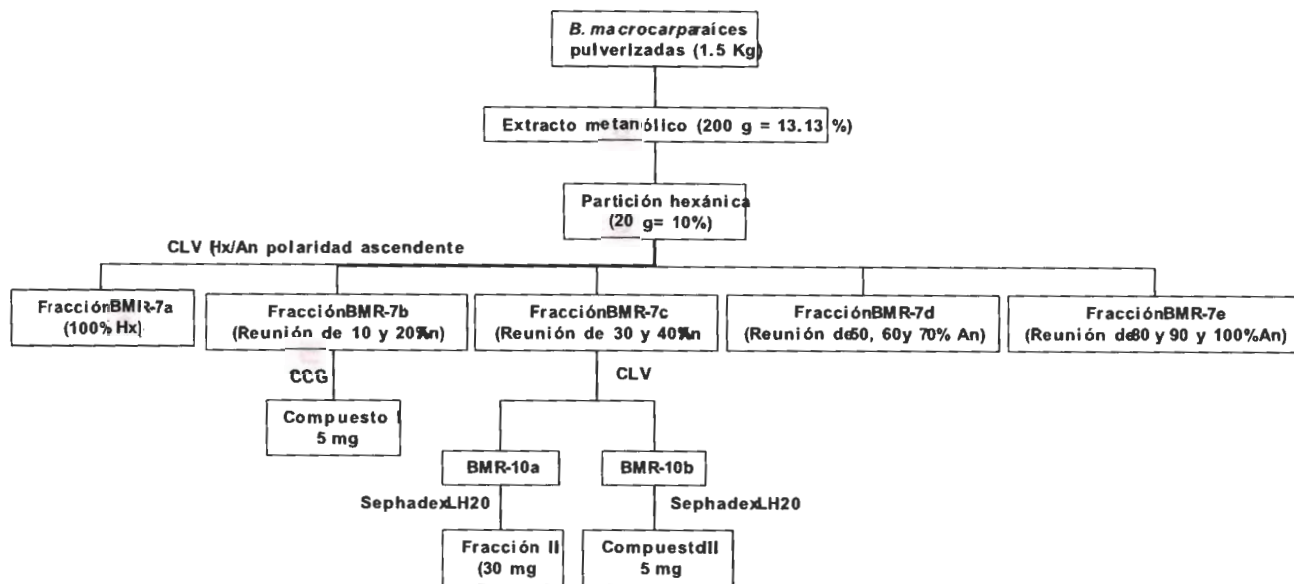


Figura 4.2 Diagrama de aislamiento de metabolitos secundarios de *B. macrocarpa*

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. OBTENCIÓN DE LA COLECTA MASIVA DE *B. MACROCARPA*

En el capítulo anterior se discutió el aislamiento, elucidación estructural y propiedades biológicas del compuesto bonediol. Este compuesto fue aislado de la fracción hexánica activa de *B. macrocarpa*, colectada en el mes de octubre del año 2008 en la comunidad de Telchac Puerto, Yucatán. La colecta masiva se realizó en el mes de febrero del año 2009 en la misma comunidad. Se realizó un perfil por cromatografía en capa delgada al compuesto de interés y a la partición hexánica de la nueva colecta (Figura 4.3). Esta placa revela la ausencia del compuesto bonediol en la nueva colecta. De acuerdo con el resultado obtenido previamente en el capítulo anterior, bonediol es un compuesto aislado de una fracción activa de *B. macrocarpa* y es considerado un compuesto marcador en la bio-actividad de la partición hexánica (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011).

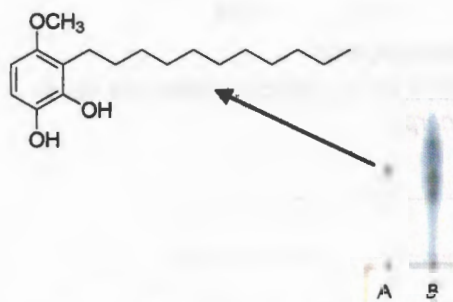


Figura 4.3. Cromatografía en capa delgada de: A) el compuesto bonediol extraído de la partición hexánica activa de *B. macrocarpa* y B) la partición hexánica masiva de *B. macrocarpa*. El sistema de disolventes empleado fue hexano/acetona (8:2).

Con el objetivo de verificar la actividad citotóxica de la partición hexánica de la nueva colecta de *B. macrocarpa*, se evaluó la fracción en el ensayo de MTT contra las líneas celulares Hep-2, KB y SiHa. La Figura 4.4 muestra la actividad citotóxica de la primera partición hexánica. La actividad es presentada en la gráfica como el porcentaje de mortalidad en función de la concentración en $\mu\text{g/mL}$. Un alto porcentaje de mortalidad se observa en la

partición de la primera colecta a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (entre 45-70%), en las tres líneas celulares. Por otro parte, cuando la nueva partición fue evaluada (Figura 4.5), la actividad se pierde drásticamente en las mismas tres líneas celulares.

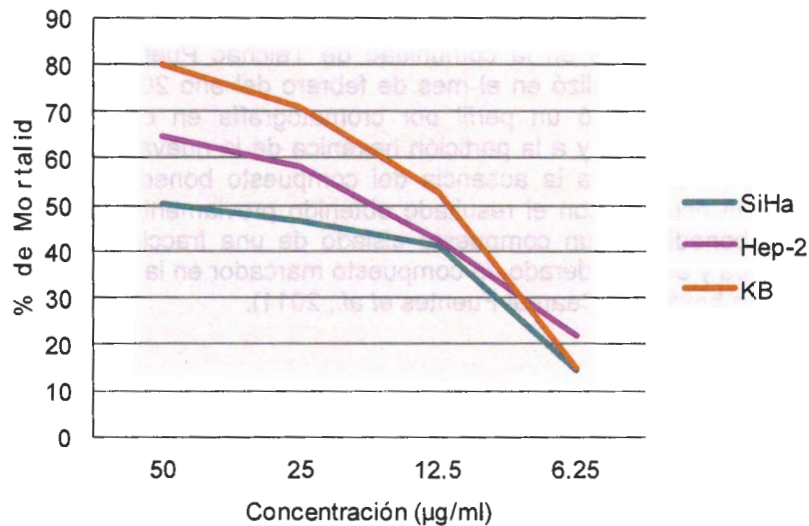


Figura 4.4. Actividad citotóxica de la partición hexánica de la primera colecta de *B. macrocarpa*.

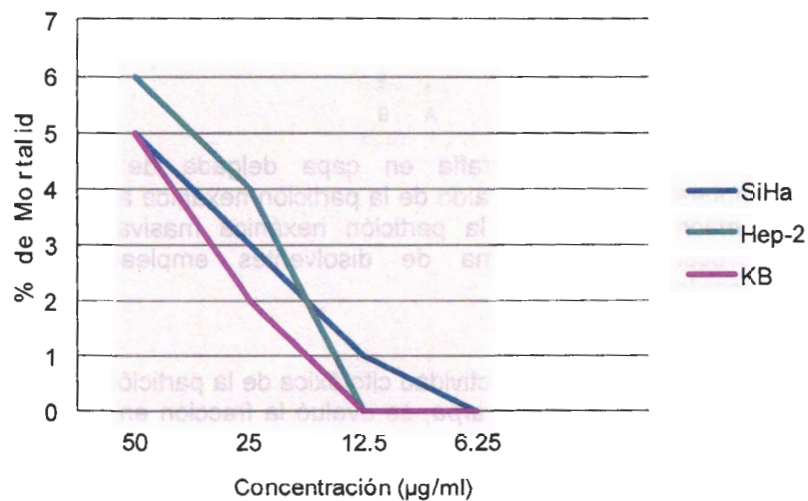


Figura 4.5. Actividad citotóxica de la partición hexánica de la colecta masiva de *B. macrocarpa*.

Los resultados del bioensayo de actividad citotóxica y el perfil cromatográfico comparativo realizado a la partición masiva de *B. macrocarpa* confirman que el bonediol es uno de los principales compuestos que poseen la actividad observada en la planta *B. macrocarpa*.

Así mismo, la ausencia de este compuesto en la partición masiva puede deberse a la discrepancia en el tiempo en el cual esta planta fue colectada. Algunos autores han encontrado diferencias significativas en el contenido de ciertos compuestos como: polifenoles (Salminen *et al.*, 2001), alcaloides (Elgorashi *et al.*, 2002), terpenoides y aceites esenciales (Müller-Riebau *et al.*, 1997), en los distintos meses del año. Más aún, Jagetia & Baliga (2005) demostraron que la disminución en el contenido de alcaloides en cuatro distintas estaciones del año reducía drásticamente la actividad citotóxica del extracto de *Alstonia scholaris*. En el presente trabajo se encontró que la ausencia del compuesto bonediol disminuía drásticamente la actividad citotóxica de la partición hexánica de *B. macrocarpa*. En la península de Yucatán se presenta principalmente tres estaciones climáticas: 1) caluroso y seco (marzo-mayo), 2) temporada de huracanes con períodos cortos de lluvia (noviembre-febrero) y 3) temporada de lluvia (junio-octubre) (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Ambas colectas fueron realizadas en distintas estaciones climáticas, resaltando el hecho que posiblemente esta molécula es sintetizada por la planta en temporada de lluvias y se encuentra ausente en el período de sequía. Estudios posteriores son requeridos para la cuantificación y estandarización del extracto hexánico de *B. macrocarpa* en los distintos meses del año, para una posible aplicación como un fitomedicamento en el tratamiento del cáncer.

Aunque la colecta masiva no resultó tener actividad citotóxica, se realizó el aislamiento de los compuestos mayoritarios presentes en esta partición. Los resultados obtenidos son presentados a continuación.

4.3.2. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LA PARTICIÓN HEXÁNICA DE LA COLECTA MASIVA DE *B. MACROCARPA*

Los rendimientos del extracto metanólico y la partición hexánica fueron los siguientes: extracto metanólico 200 g (13.13% del material original) y 20 g de la partición hexánica (10% del material original).

4.3.2.1. COMPUESTO I

El compuesto I se obtuvo como un sólido amorfo. En el espectro de masas se pudo observar un ion molecular de m/z 426. En su espectro de RMN- ^1H obtenido en CDCl_3 (Tabla 4.1) se puede observar siete señales simples a δ 0.74, 0.80, 0.85, 0.96 (2 \times), 1.60 y 1.68; un doblete a δ 0.87 ($J = 6.5$ Hz). Las señales anteriores son características de metilos de un triterpeno. Además, se pudo observar una señal doble de dobles desplazada a δ 3.24 ($J = 11.2$, 4.0 Hz), correspondiente a un protón base de alcohol y dos señales anchas de protones vinílicos a δ 5.10 y 5.24. De acuerdo con los datos obtenidos y los descritos en la literatura, el compuesto I se identificó como el triterpeno tirucalan-7,24-dien-3 β -ol (Figura 4.6).

Tabla 4.1. Comparación de las señales de RMN- ^1H descritas para tirucalanos y las obtenidas para el compuesto I.

Tirucalol ^a	Tirucalan-7,24-dien-3 β -ol ^b	Compuesto I ^c
δ ($J = \text{Hz}$)	δ ($J = \text{Hz}$)	δ ($J = \text{Hz}$)
0.73 s	0.76 s	0.74 s
0.78 s	0.82 s	0.80 s
0.84 s	---	0.85 s
0.89 d (6.4)	0.87 s	0.87 d (6.5)
0.93 s	---	---
0.98 s	0.99 s \times 2	0.96 s \times 2
1.58 s	1.62 s	1.6 s
1.66 s	1.67 s	1.68 s
3.22 dd (11.7, 4.5)	3.22 m	3.24 dd (11.2, 4.0)
5.08 t (7.1)	5.12 m	5.10 s.a
---	5.26 m	5.24 s.a

^a RMN- ^1H a 500 MHz obtenidas en CDCl_3 por Lin *et al.*

^b RMN- ^1H a 60 MHz obtenidas en CDCl_3 por Itoh *et al.*

^c RMN- ^1H a 400 MHz obtenidas en CDCl_3 .

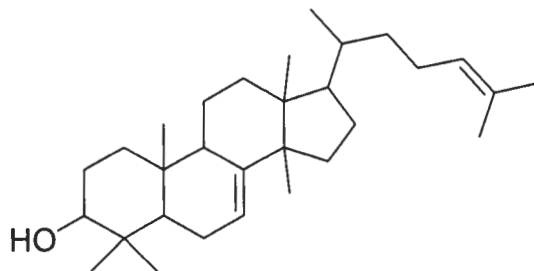


Figura 4.6. Estructura de tirucalan-7,24-dien-3 β -ol (compuesto I).

4.3.2.2. FRACCIÓN II

En el análisis por CCD de la fracción II se observó una sola mancha con un $R_f = 0.75$ en el sistema Hx/An (8:2) (Figura 4.7). Sin embargo, cuando la fracción fue sometida a CG-EM (Figura 4.7), el cromatograma mostró tres picos, los cuales fueron tentativamente identificados como: ácido dodecanoico (75%, $T_r = 14.06$ min), ácido tridecanoico (19%, $T_r = 15.09$ min) y ácido undecanoico (6%, $T_r = 12.74$ min) por comparación de su espectro de masas con los de la base de datos.

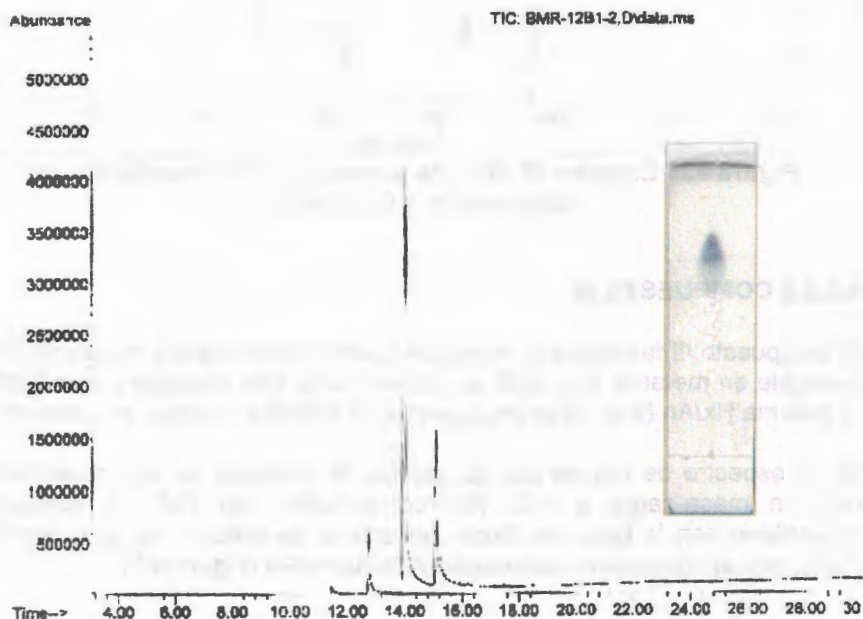


Figura 4.7. CCD y CG-EM de la mezcla de ácido undecanoico, dodecanoico y tridecanoico.

Por medio del análisis de IR de la fracción II (Figura 4.8) se pudo confirmar la presencia de ácidos grasos al exhibir una señal característica de grupo carbonilo (1705 cm^{-1}). No se observa la presencia de señales a 3500 cm^{-1} , característica de grupos OH, debido a que los ácidos carboxílicos forman puentes de hidrógeno entre sí y sólo a bajas concentraciones se puede observar dicha señal en ácidos carboxílicos. Con base en lo anterior y al CG-EM, se confirma la presencia de una mezcla de ácidos grasos en la fracción II.

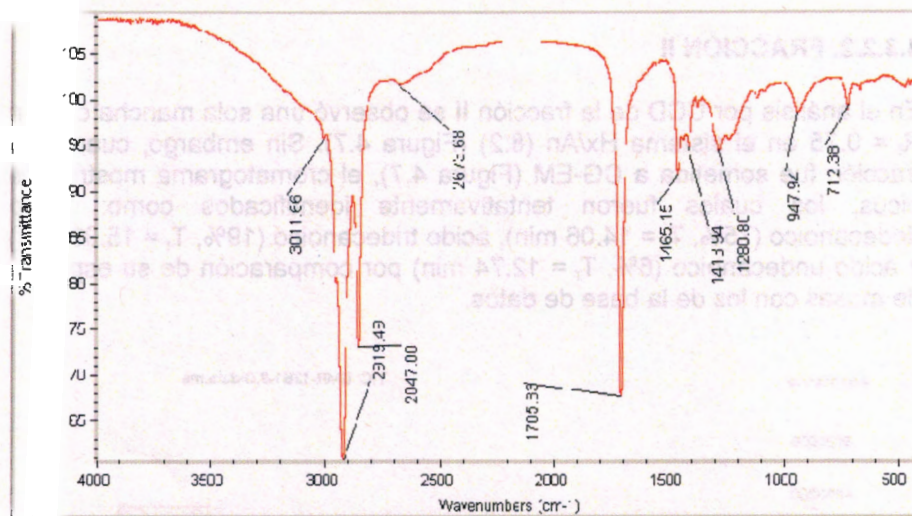


Figura 4.8. Espectro IR (film) de la mezcla de ácido undecanoico, dodecanoico y tridecanoico.

4.3.2.3 COMPUESTO III

El compuesto III fue obtenido como un sólido blanco soluble en cloroformo e insoluble en metanol. Por CCD se observa una sola mancha a $R_f = 0.33$ en el sistema Hx/An (8:2). El cromatograma de CG-EM muestra un solo pico.

En el espectro de masas del compuesto III presenta un ion molecular de relación masa-carga a 412. Por comparación del EM del compuesto mayoritario con la base de datos del equipo se obtuvo una gran similitud (94%) con el compuesto estigmaste-7,16-dien-3-ol (Figura 4.9).

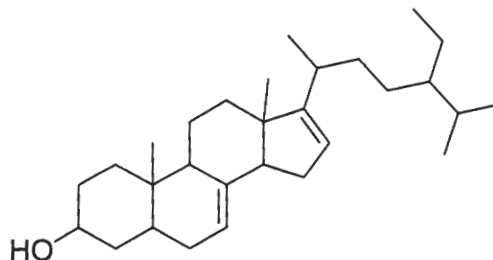


Figura 4.9. Estructura del estigmaste-7,16-dien-3-ol (compuesto III).

4.4. CONCLUSIONES

Del extracto hexánico obtenido de la colecta masiva de las raíces de *B. macrocarpa* se aisló el triterpeno tirucalan-7,24-dien-3 β -ol (compuesto I) y el esteroil estigmaste-7,16-dien-3-ol (compuesto III), así como una mezcla de ácidos grasos (fracción II).

4.5. REFERENCIAS

- Correia, S.J., David, J.M., David, J.P., Chai, H.B., Pezzuto, J.M., Cordell, G. A. (2001). Alkil phenols and derivatives from *Tapirira obtuse*. *Phytochemistry* 56, 781-784.
- Elgorashia, E.E., Drewesb, S.E., Van Staden, J. (2002). Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. *Fitoterapia* 73, 490-495.
- Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1976). Proton magnetic resonance spectra of tetracyclic triterpene alcohols under the influence of a lanthanide shift reagent. *Steroids* 27, 275-285.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S. (2005). The effect of seasonal variation on the antineoplastic activity of *Alstonia scholaris* R. Br. in HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 37-42.
- Lin, J., Ku, Y., Lin, Y., Teng, S., Wen, K., Liao, C. (2000). Preparative isolation and gas chromatography-mass spectrometry analysis of triterpenoids in Kansui Radix. *Journal of Food and Drug Analysis* 8, 278-282.
- Mossa, J.S., Muhammad, I., Ramadan, A.F., Mirza, H.H., El-Ferally, F.S., Hufford, C.D. 1999. Alkylated benzoquinone derivatives from *Maesa lanceolata*. *Phytochemistry* 50, 1063-1068.
- Müller-Riebau, F.G., Berger, B.M., Yegen, O., Cakir, C. (1997). Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45, 4821-4825.
- Salminen, J.P., Ossipova, V., Haukiojab, E., Pihlaja, K. (2001). Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry* 57, 15-22.
- Schmitter-Soto, J.J., Comín, F.A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L.E Steinich, B. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* 467, 215-228.
- Stahl, B., Kallersjo, M., 2004. Reinstatement of *Bonellia* (Theophrastaceae). *Novon* 14, 115-118.

Capítulo V

Estudio fitoquímico de la partición hexánica de *Aeschynomene fascicularis*

5.1. ANTECEDENTES

5.1.1. FAMILIA FABACEAE

La relación del hombre peninsular con esta familia data de la época prehispánica; esto se demuestra con el conocimiento y manejo que de ellas se hace aún en la actualidad. De las 260 especies descritas en la península que pertenecen a esta familia, existen indicios de que los mayas conocieron 230, debido a que aún prevalece el nombre maya, además de que es la familia cuyas especies tienen más usos, entre los que destacan los medicinales. En Yucatán las podemos localizar en la selva baja caducifolia y caducifolia espinosa, que se encuentra a lo largo de la costa norte del Estado así como la parte norte de Campeche y en una pequeña parte del estado de Quintana Roo (Flores & Espejel, 1994; Mendez & Duran, 1997; Flores, 2001).

La familia Fabaceae es la tercera más grande de plantas con flores (después de la Asteraceae y Orchidaceae), de distribución cosmopolita con algunas especies introducidas en varias partes del mundo (Flores, 2001). La familia se divide en tres grandes subfamilias (Mimosoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae), 650 géneros y 18,000 especies. Las plantas de esta familia son muy variadas y las podemos encontrar en forma de hierbas, arbustos o árboles. Se caracterizan por tener hojas estipuladas, alternas y compuestas (trifoliadas, pinnadas o bipinnadas). Las flores en su mayoría son irregulares, hermafroditas, radiadas o simétricas. El cáliz por lo regular es bibracteado, compuesto por sépalos regulares. La corola es irregular, generalmente con cinco pétalos muy desiguales y de formas diferentes. Poseen generalmente el doble de estambres que de pétalos y generalmente tienen un pistilo. Los frutos son legumbres con frutos bivalvos, a menudo indehiscentes, con semillas de una a varias, el endospermo es nulo o escaso (Matuda, 1981).

Económicamente, esta familia es importante como fuente de comida en todo el mundo (géneros: *Cicer*, *Vicia*, *Lupinus*, *Pisum*, *Glycine*, *Phaseolus*, *Pithecellobium*, *Rhynchosia*), así como de productos industrializados: gomas, resinas y aceites (Duke, 1981). La familia cuenta con una gran variedad de metabolitos secundarios, entre los más abundantes destacan: alcaloides, cumarinas, cromonas, terpenos, flavonoides, neoflavononas,

saponinas, quinonas, taninos y antraquinonas (Dixon & Sumner, 2003; Gazard *et al.*, 2003).

5.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *AESCHYNOMENE FASCICULARIS* SCHLTDL. & CHAM.

Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Fabales, Familia: Fabaceae, Subfamilia: Papilionoideae. Tribu: Dalbergieae, Género: *Aeschynomene*, Especie: *Aeschynomene fascicularis* Schltld. & Cham. (Figura 5.1).



Figura 5.1. *Aeschynomene fascicularis* Schltld. & Cham.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para los diferentes procesos de extracción y purificación se usaron disolventes grado técnico, destilados en el laboratorio, y disolventes grado analítico de varias marcas. El proceso de eliminación de disolventes se realizó mediante un evaporador rotatorio marca Büchi 461 equipado con un baño de agua y una bomba de alto vacío. Los análisis por cromatografía en capa delgada se llevaron a cabo utilizando placas cromatográficas de gel de sílice 60, de 0.2 mm de espesor, con soporte de aluminio. Como agente

revelador se usó una disolución preparada con 20 g de ácido fosfomolibdico y 2.5 g de sulfato cérico en 500 mL de ácido sulfúrico acuoso al 5%. Antes de revelarlas, las placas fueron visualizadas bajo luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) en un gabinete de marca Spectroline. Las columnas cromatográficas líquidas al vacío (CCLV) fueron realizadas usando gel de sílice 60H (Merck). También, se usó gel de sílice 60 (Merck) para realizar columnas cromatográficas de gravedad (CCG) y Sephadex LH-20 (Sigma) para realizar columnas de exclusión molecular. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 para monitorear la composición de los extractos y las fracciones, usando las siguientes condiciones: 1 µL de la muestra a una concentración al 1%; columnas Ultra 1 y HP-5MS (25 m × 0.2 mm); flujo de helio de 1.0 mL/min; programa de temperatura del horno T₁ = 70 °C (3 min), T₂ = 300 °C (15 min), rampa de 10 °C/min. La masa molecular y los fragmentos se obtuvieron con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector másico marca Agilent, modelo 6431. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN fueron analizados a 400 MHz en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear marca Bruker Avance 400 ultrablindado (ppm, J en MHz, usando TMS como estándar interno).

5.2.2. ESTUDIO QUÍMICO DE LA PARTICIÓN HEXÁNICA DE *A. FASCICULARIS*

El extracto metanólico fue obtenido como se señala en el capítulo II. Un posterior fraccionamiento líquido-líquido fue realizado a este extracto obteniéndose cuatro particiones orgánicas de polaridad ascendente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y fracción acuosa). Estas fracciones fueron evaluadas en el bioensayo citotóxico de MTT, resultando activa la hexánica.

5.2.2.1. OBTENCIÓN DEL COMPUESTO IV

La purificación del compuesto IV se realizó mediante una columna de Sephadex LH-20 (MeOH 100%); las fracciones obtenidas se reunieron en cuatro fracciones finales por similitud observada en CCD (AFR-3a – AFR-3d). La fracción AFR-3d (15 mg) fue sometida a una CCG utilizando mezclas de Hx/An (8:2). Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por CCD y reunidas por similitud, observando que tres fracciones contenían el compuesto IV (5 mg) (Figura 5.2).

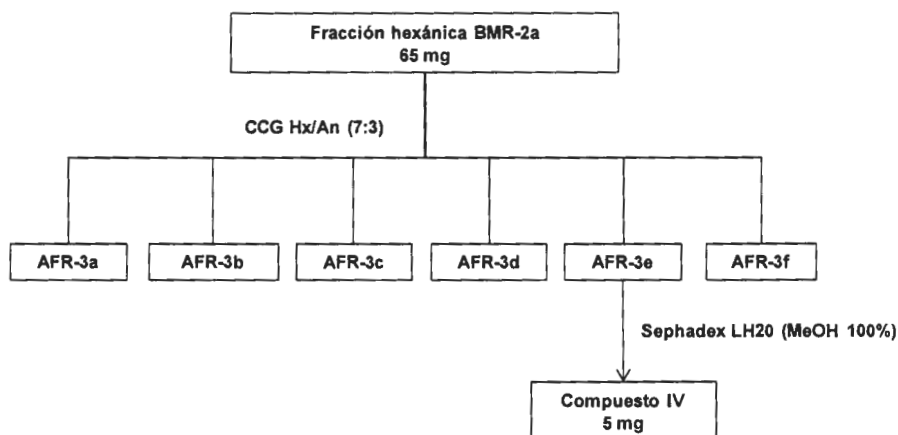


Figura 5.2. Aislamiento del compuesto IV.

5.2.3. COLECTA MASIVA DE *A. FASCICULARIS*

5.2.3.1. MATERIAL VEGETAL

Las raíces de *A. fascicularis* fueron colectadas en mayo de 2009 entre los poblados de Libre Unión y Yaxcabá, Yucatán. El material vegetal fue identificado por el Téc. Paulino Simá Polanco y el voucher (P.Simá 2997) fue depositado en el herbario “*U Najil Tikin Xiw*” del CICY.

5.2.3.2. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se separaron las raíces del resto de la planta, para a continuación ser secadas a temperatura ambiente y luego en un desecador de muestras vegetales a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvieron 594 g de muestra seca, de la cual se procedió a obtener el extracto metanólico y posteriormente la partición hexánica, como se describió previamente (capítulos I y II). Los rendimientos fueron los siguientes: extracto metanólico 84 g (14.14% del material original) y 1.07% de la partición hexánica (6.4 g del material original).

5.2.3.3. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS V-IX

Se realizó una CLV usando mezclas de polaridad ascendente de Hx/An. De esta columna se obtuvieron seis fracciones: AFR-8a – AFR-8f. Los compuestos V y VI (60 y 65 mg, respectivamente) se obtuvieron por CCG [Hx/An (9:1)] de las fracciones AFR-8b y AFR-8c, respectivamente. Se le realizó una CCG a la fracción AFR-8e obteniéndose las fracciones: AFR-11a, AFR-11b y AFR-11c. Posteriormente se sometió la fracción AFR-11c a una columna de exclusión molecular y de esta manera se obtuvo el

compuesto VII (10 mg). La fracción AFR-11b fue sometida a una CCG usando el sistema de disolventes Hx/An (7:3); de esta columna se obtuvieron tres fracciones y de éstas la fracción AFR-13b fue escogida para realizarle una columna de exclusión molecular con Sephadex LH-20, para finalmente purificar el compuesto VIII (10 mg). Por último, al realizar la partición con hexano al extracto metanólico se observó un precipitado aceitoso, el cual fue separado y denominado como la fracción AFR-8f. El compuesto IX fue aislado de esta última fracción por medio de una CCG usando el sistema de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (Figura 5.3).

5.2.4. DERIVATIZACIÓN

Como parte del apoyo para la elucidación estructural de las moléculas obtenidas se realizaron diversas técnicas químicas de derivatización, con el fin de confirmar la presencia de grupos hidroxilos en los compuestos aislados.

5.2.4.1. ACETILACIÓN DE LOS COMPUESTOS V y VI

Por cada 10 mg de muestra, aproximadamente, se adicionó 0.3 mL de piridina (Aldrich) y 0.3 mL de anhídrido acético (Baker). La mezcla de reacción fue colocada en agitación a temperatura ambiente durante 12 h; la reacción fue monitoreada por medio de CCD para constatar que la reacción se había completado. Finalizada la reacción, se adicionó a la mezcla 30 mL de agua y posteriormente se extrajo con acetato de etilo tres veces. La fracción orgánica resultante fue sucesivamente lavada, primero con una disolución de HCl al 5% (1:1, v/v), después con una disolución de NaHCO_3 al 2.5% y finalmente con una disolución saturada de NaCl.

5.2.4.2. METILACIÓN DE LOS COMPUESTOS V y VI

Por cada 10 mg de muestra, aproximadamente, se adicionó 0.25 mL de CH_3I (Aldrich), 50 mg de K_2CO_3 (Baker) y 0.6 mL de acetona en 300 mL de agua. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 12 h; la reacción fue monitoreada por medio de CCD para constatar que la reacción se haya completado. Después de constatar que la reacción finalizó, la disolución fue extraída con acetato de etilo tres veces.

5.2.5. Compuesto IV (Isocordoína)

Sólido amorfo amarillo. IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3231, 1629, 1613, 1480, 1444, 1362, 1234; ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR: ver Tabla 5.1; EI-MS 70 eV, m/z (rel. int. %): 308 ($[\text{M}]^+$, 55), 265 (90), 231 (12), 149 (100), 131 (37), 103 (40), 77 (20).

5.2.6. Compuesto V (Espinochalcona C)

Aceite anaranjado viscoso. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl_3) nm: 239, 308; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3385, 1649, 1600, 1450, 1332, 1122; ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR: ver Tabla 5.2; EI-MS 70 eV, m/z (rel. int. %): 374 ($[\text{M}]^+$, 30), 359 (100), 303 (25), 255 (20), 131 (15), 103 (17).

5.2.6.1 Compuesto Va (Espinochalcona C acetilada)

Aceite amarillo viscoso. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl_3) nm: 239, 296; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 1767, 1649, 1598, 1460, 1362, 1188, 1122; ^1H (400 MHz, CDCl_3) NMR: δ 7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H- β), 7.59 (2H, m, H-2, H-6), 7.40 (3H, m, H-3, H-4 y H-5), 7.32 (1H, s, H-6'), 7.24 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H- α), 6.32 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4''), 5.64 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3'''), 5.10 (1H, m, H-2'''), 3.24 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 2.27 (3H, s, OAc-2'), 1.77 (3H, s, CH_3 -3'''), 1.68 (3H, s, CH_3 -3'''), 1.46 (6H, s, CH_3 -2'').

5.2.6.2 Compuesto Vb (Espinochalcona C metilada)

Aceite amarillo viscoso. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl_3) nm: 239, 270; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 1654, 1603, 1460, 11372, 1178, 1127; ^1H (400 MHz, CDCl_3) NMR: δ 7.73 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H- β), 7.60 (2H, m, H-2, H-6), 7.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H- α), 7.40 (3H, m, H-3, H-4 y H-5), 7.28 (1H, s, H-6'), 6.32 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4''), 5.60 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3'''), 5.19 (1H, m, H-2'''), 3.68 (3H, s, OCH_3 -2'), 3.35 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.81 (3H, s, CH_3 -3'''), 1.69 (3H, s, CH_3 -3'''), 1.44 (6H, s, CH_3 -2'').

5.2.7. Compuesto VI (Espinochalcona A)

Sólido amorfo color amarillo. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl_3) nm: 238, 322; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3390, 1634, 1608, 1567, 1362, 1147; ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR: ver Tabla 5.3; EI-MS 70 eV, m/z (rel. int. %): 376 ($[\text{M}]^+$, 100), 333 (40), 305 (45), 265 (30), 201 (40), 161 (60), 131 (40), 103 (35).

5.2.7.1 Compuesto VIa (Espinochalcona A acetilada)

Aceite amarillo viscoso. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl₃) nm: 239, 296; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 1767, 1598, 1460, 1362, 1188, 1122; ¹H (400 MHz, CDCl₃) NMR: δ 7.61 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- β), 7.58 (2H, m, H-2, H-6), 7.41 (3H, m, H-3, H-4 y H-5), 7.26 (1H, s, H-6'), 7.14 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- α), 5.22 (1H, m, H-2'''), 5.01 (1H, m, H-2''), 3.21 (2H, d, J = 7.1 Hz), 2.33 (3H, s, OAc-2'), 2.21 (3H, s, OAc-3'), 1.72 (6H, d, J = 6.0 Hz, CH₃-3''), 1.67 (6H, s, CH₃-3''').

5.2.7.2 Compuesto VIb (Espinochalcona A metilada)

Aceite amarillo viscoso. UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl₃) nm: 239, 296; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 1654, 1603, 1460, 11372, 1178, 1127; ¹H (400 MHz, CDCl₃) NMR: δ 7.68 (1H, d, J = 16.0 Hz, H- β), 7.61 (2H, m, H-2, H-6), 7.47 (1H, d, J = 16.0 Hz, H- α), 7.40 (3H, m, H-3, H-4 y H-5), 7.35 (1H, s, H-6'), 5.27 (1H, m, H-2'''), 5.21 (1H, m, H-2''), 3.76 (3H, s, OCH₃-2'), 3.67 (3H, s, OCH₃-4'), 3.41 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-2''), 3.35 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-2'''), 2.33 (3H, s, OAc-2'), 2.21 (3H, s, OAc-3'), 1.72 (6H, d, J = 6.0 Hz, CH₃-3''), 1.45 (6H, s, CH₃-3''').

5.2.8. Compuesto VII (Aeschynocarpina)

Sólido amorfo amarillo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 44$ (c 0.005, CHCl₃); UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl₃) nm: 217, 291; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3436, 1639, 1475, 1378, 1275, 1132, 1081; ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR: ver Tabla 5.4; HRCIMS: m/z 367.9934 [M]⁺ (calcd. para C₂₁H₂₀O₆ m/z 368.1260)

5.2.9. Compuesto VIII (2-Metoxi-medicago)

Sólido amorfo amarillo pálido. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 40$ (c 0.01, CHCl₃); UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl₃) nm: 236, 291; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3411, 1618, 1495, 1275, 1147, 1081; ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR: ver Tabla 5.5; EI-MS 70 eV, m/z (rel. int. %): 300 ([M]⁺, 100), 285 (40), 215 (10), 148 (35), 69 (15).

5.2.10. Compuesto IX (Secundiflorol G)

Sólido amorfo café-rojizo. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 9.5$ (c 0.02, CHCl₃); UV $\lambda_{\text{máx}}$ (CHCl₃) nm: 238, 283; IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3385, 1618, 1598, 1506, 1454, 1275, 1157, 1116; ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) NMR: ver Tabla 5.6.

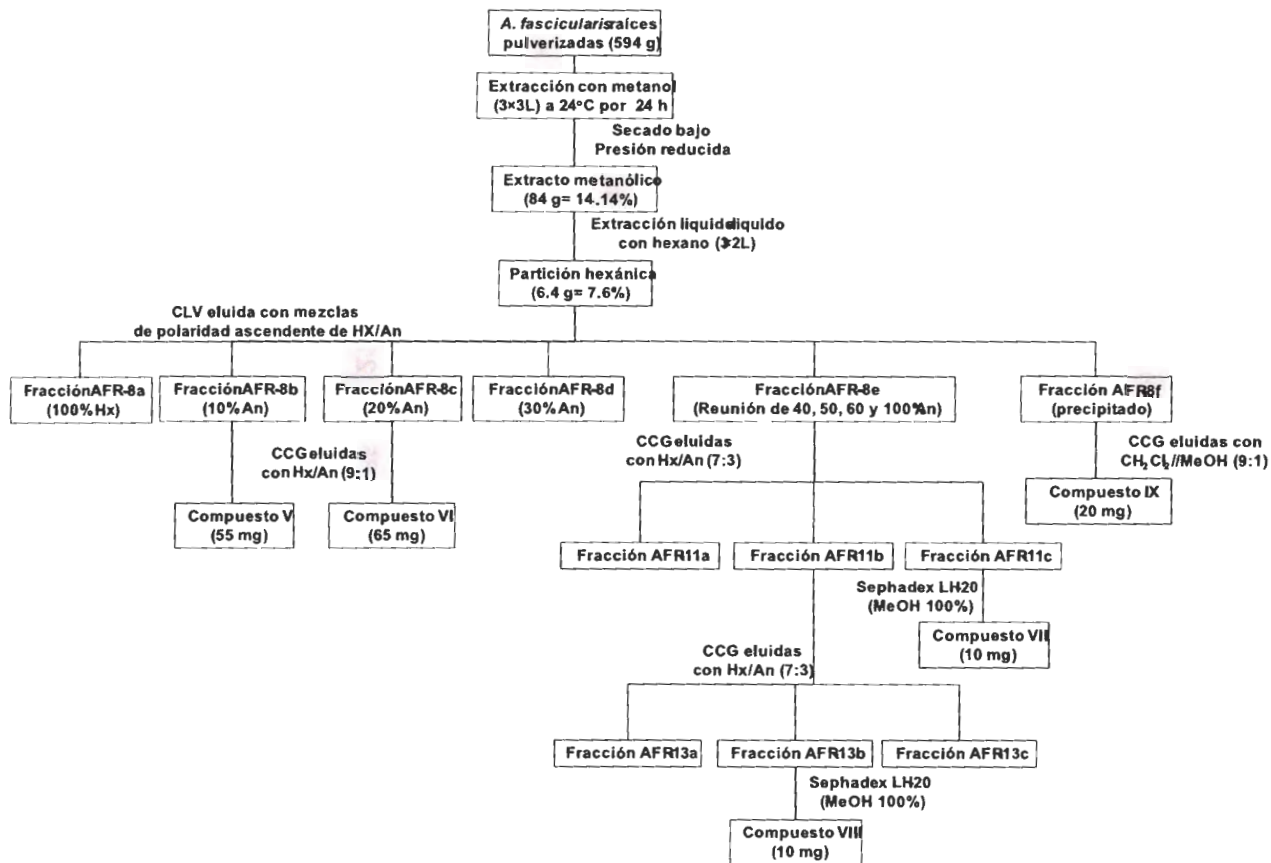


Figura 5.3. Diagrama de aislamiento de los compuestos V, VI, VII, VIII y IX de *A. fascicularis*

5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

5.3.1. COMPUESTO IV (Isocordioína)

El compuesto IV (5 mg) se obtuvo como un polvo amarillo. Su factor de retención (Rf) en el sistema de disolventes Hx/An (8:2) es de 0.34. En el espectro de masas el ion molecular obtenido fue de m/z 308. En el espectro de RMN- ^1H (Figura 5.4) se observó un conjunto de señales características de un grupo isoprenilo a δ 1.71 (3H, s) y δ 1.80 (3H, s), una señal a δ 3.42 (2H, d, $J = 6.9$ Hz) y a δ 5.26 (1H, m). También aparecen señales características de un sistema vinílico cuyos protones están en posición *trans* a δ 7.58 (1H, d, $J = 15.5$ Hz) y δ 7.84 (1H, d, $J = 15.5$ Hz). Adicionalmente, se observó la señal característica de un protón quelatado a δ 13.60 (s). Todas estas señales de RMN aunadas a señales del IR a 3231 cm^{-1} (OH), 1629 cm^{-1} (CH=CH-C=O) permiten determinar que el núcleo básico del compuesto IV es una chalcona prenilada. Además, existen señales que indican la presencia de un anillo tetra sustituido a δ 6.40 (1H, d, $J = 8.9$ Hz) y δ 7.69 (1H, d, $J = 8.9$ Hz) que corresponden a protones sobre anillo aromático en posición *orto*; y señales a δ 7.40 (m) y δ 7.62 (m) sugerentes de un anillo B mono-sustituido.

El espectro de RMN- ^{13}C muestra 20 carbonos; con el experimento DEPT-135 se pudo detectar la presencia de dos metilos, un metileno, diez metinos (todos sp^2) y por comparación con el espectro de ^{13}C , siete carbonos cuaternarios (seis sp^2 y un carbonilo tipo cetona).

Los datos espectroscópicos mostrados anteriormente concuerdan con lo reportado para el compuesto conocido como isocordioína (Tabla 5.1), una chalcona previamente aislada de *Cordia piaca* (De Lima *et al.*, 1973), así como de las especies *Lonchocarpus xuul* y *L. yucatanensis* (Borges *et al.*, 2002).

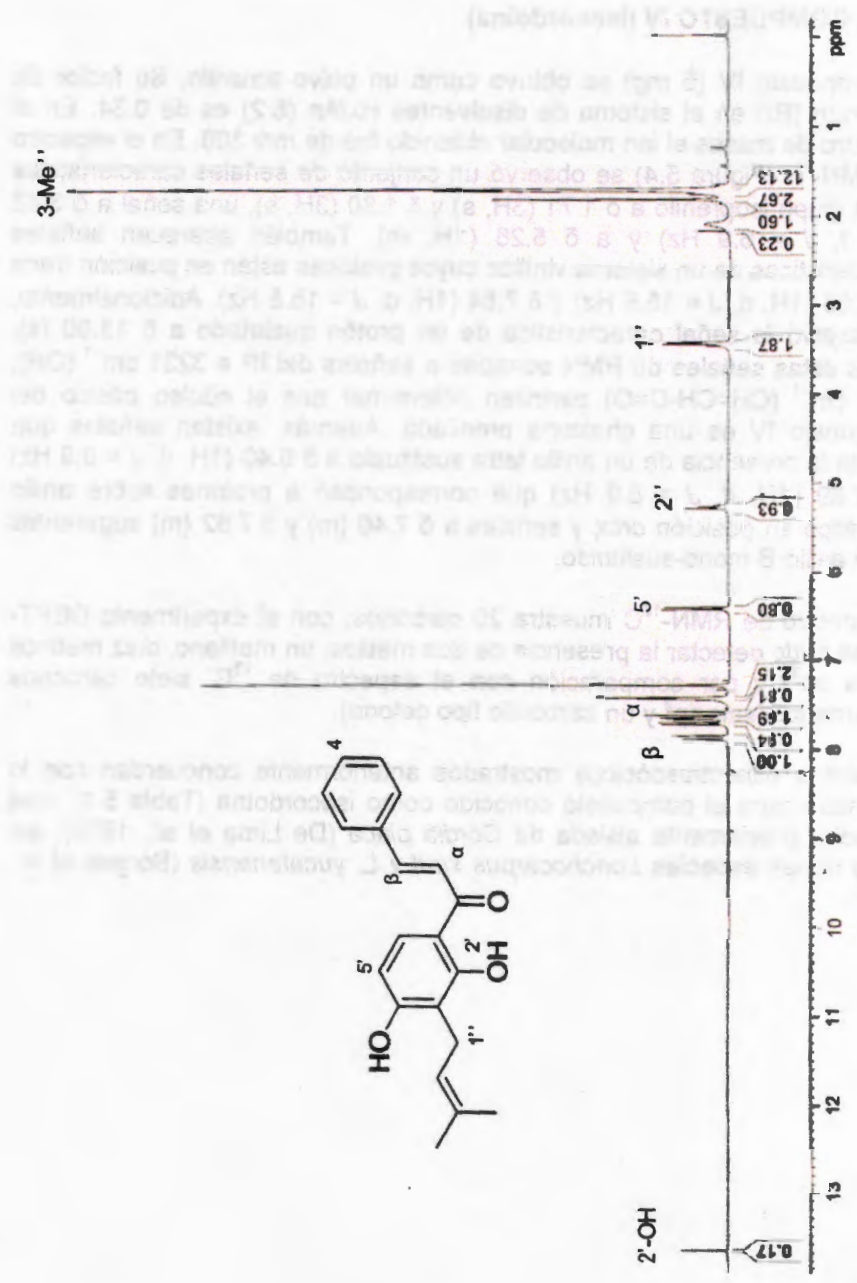


Figura 5.4 Espectro de RMNH y estructura del compuesto

Tabla 5.1. Comparación de las señales de RMN-¹H obtenidas del compuesto IV e isocordioina.

Posición	Isocordioina ^a	Compuesto IV ^b
	δ_H ($J = \text{Hz}$)	
1		
2	7.60 m	7.62 m
3	7.60 m	7.40 m
4	7.60 m	7.40 m
5	7.60 m	7.40 m
6	7.60 m	7.62 m
α	7.60 d (15.4)	7.58 d (15.5)
β	7.80 d (15.4)	7.84 d (15.5)
C=O		
1'		
2'		
3'		
4'		
5'	6.40 d (8.9)	6,40 d (8.9)
6'	7.70 d (8.8)	7.69 d (8.9)
1''	3.50 d (7)	3.42 d (6.9)
2''	5.30 d (7)	5.26 m
3''		
3''-(CH ₃) ₂	1.70 s	1.71 s
	1.80 s	1.80 s
2'-OH	13.70 s	13.60 s

^aSeñales por Borges *et al.* (2002).

^bSeñales de RMN-¹H obtenidas en CD₃Cl corridas a 400 MHz.

5.3.2. COMPUESTO V (Espinochalcona C)

El compuesto V (60 mg) fue obtenido como un aceite anaranjado con un R_f = 0.75 en el sistema Hx/An (8:2). Por espectrometría de masas se obtuvo un ion molecular de m/z 374. Las bandas del IR a 1629 y 3290 cm⁻¹, en conjunto con las señales de RMN-¹H (Figura 5.5) de un protón quelado a δ 13.74 (1H, s), dos protones *trans*-olefinicos a δ 7.57 (1H, d, $J = 15.4$ Hz) y 7.86 (1H, d, $J = 15.4$ Hz), así como una señal de carbonilo α,β insaturado a δ 191.9 en el espectro de RMN-¹³C (Figura 5.6), confirman la estructura de una chalcona (Venkata & Rajendra, 1992a). Adicionalmente, el espectro de RMN-¹H revela señales en la región de los protones aromáticos pertenecientes a un singulete a δ 7.40 y dos series de multipletes a δ 7.43 (3H) y 7.65 (2H) característicos de protones en un anillo penta-sustituido y mono-sustituido, respectivamente. La presencia de dos protones *cis*-

olefinicos a δ 5.59 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) y δ 6.32 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) junto con dos señales en el espectro de RMN- ^{13}C de metilos y un carbono cuaternario a δ 77.8 son consistentes con la presencia de un anillo 2,2-dimetil-pirano. Además, señales a δ 1.46 (6H), δ 3.36 (1H, d, $J = 7.3$ Hz) y un multiplete a δ 5.26 (1H) indican la presencia de un grupo isoprenilo. La presencia de un grupo hidroxilo en la molécula fue corroborada realizando dos reacciones de derivatización, resultando en un solo producto en ambas reacciones.

El acetato del compuesto V (Va) se obtuvo como un aceite amarillo (10 mg). La cromatografía de gases acoplada a masas mostró un pico mayoritario con un ion molecular de m/z 416, indicando el incremento de 42 uma, concernientes a la adición de un grupo acetilo a la molécula. Por espectroscopía de IR se pudo constatar la transformación de la molécula al observarse la desaparición de la banda ancha a 3290 cm^{-1} , típica de grupos hidroxilo, y la aparición de una señal a 1720 cm^{-1} , característica de grupos carbonilo tipo éster. La acetilación fue confirmada por el espectro de RMN- ^1H (Figura 5.7), en el que se observa una señal a δ 2.28, atribuida a los protones del metilo unido a un grupo carbonilo. Así mismo, la ausencia del protón quelatado a δ 13.74 confirma la acetilación completa del grupo hidroxilo.

El derivado éter del compuesto V (Vb) fue obtenido como un aceite de color amarillo (10 mg). Por cromatografía de gases-masas se confirmó la relativa pureza del compuesto, al observarse un solo pico. Su espectro de masas mostró un ion molecular a m/z 388 indicando la ganancia de un grupo metilo; por otra parte, la desaparición de la señal a 3290 cm^{-1} del IR confirma la conversión del alcohol a un éter. Este es el primer reporte de un derivado metilado de espinochalcona C. La metilación fue confirmada por el espectro de RMN- ^1H (Figura 5.8), en el cual se observa una señal a δ 3.68, característica del metoxilo. Así mismo, la ausencia del protón quelatado a δ 13.74 confirma la metilación completa del grupo hidroxilo.

La posición y lugar de todos los protones y carbonos fue establecida por combinación de los experimentos bidimensionales HSQC y HMBC (Tabla 5.2). La estructura asignada corresponde a una molécula ya reportada de *Tephrosia spinosa* y conocida como espinochalcona C (Venkata & Rajendra, 1993).

Tabla 5.2. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto V.^a

Posición	δ_H^b (J = Hz)	δ_C^c	HMBC	
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1		135.0		
2	7.65 m	128.6		C β , C4
3	7.43 m	129.0		C1
4	7.43 m	130.6		C2, C6
5	7.43 m	129.0		C1
6	7.65 m	128.6		C β , C4
α	7.57 d (15.4)	120.6	C=O	C1
β	7.86 d (15.4)	144.0	C1	C=O
1'		113.8		
2'		164.4		
3'		117.1		
4'		158.0		
5'		113.2		
6'	7.40 s	125.2		C=O, C2', C4', C4''
2''		77.8		
3''	5.59 d (9.8)	128.7	C2''	C5'
4''	6.32 d (9.8)	121.7	C5'	C2'', C4', C6'
2''-(CH ₃) ₂	1.46 s	28.6	C2''	C3''
1'''	3.36 d (7.3)	21.6	C3', C2'''	C2', C4', C3'''
2'''	5.26 m	122.0		3-CH ₃ '''
3'''		131.7		
3'''-(CH ₃) ₂	1.69 s	25.9		
	1.82 s	18.0	C3'''	C2''
2'-OH	13.74 s		C2'	C1', C3'
C=O		191.9		

^a Señales obtenidas en CD₃Cl.

^b RMN-¹H a 400 MHz.

^c RMN-¹³C a 100 MHz.

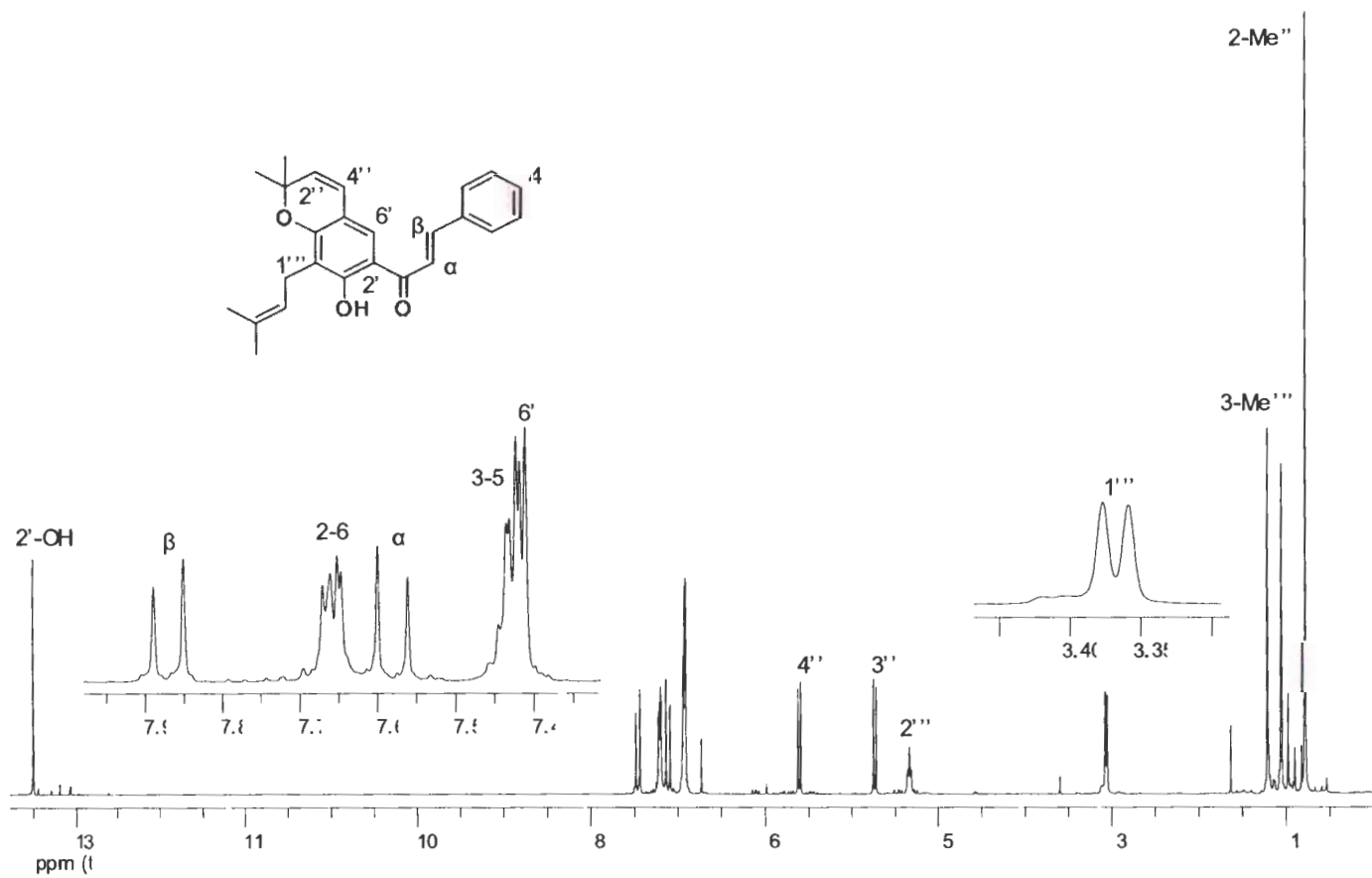


Figura 5.5. Espectro de RMN^1H y estructura del compuesto 5.

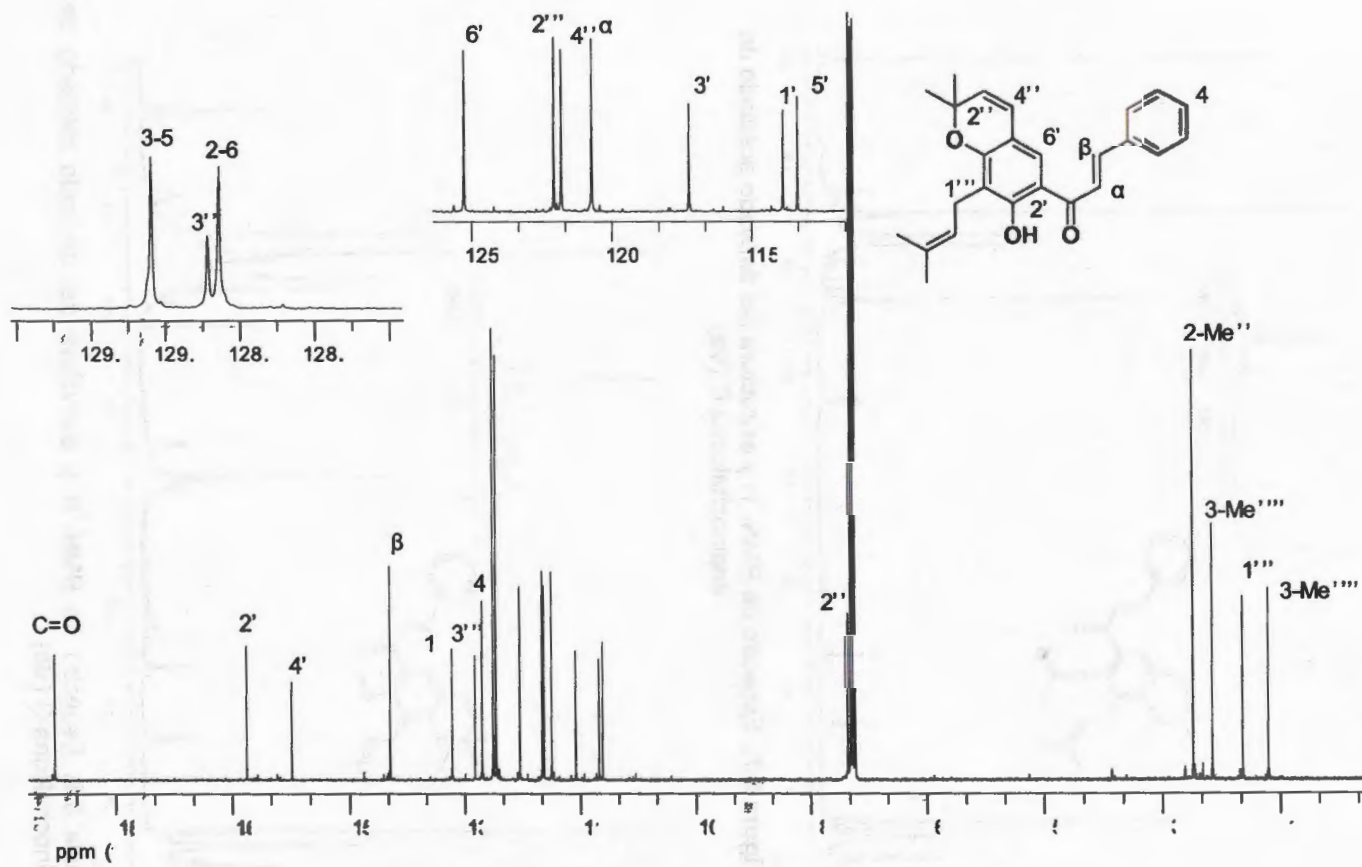


Figura 5.6. Espectro de RMN- ^{13}C y estructura del compuesto

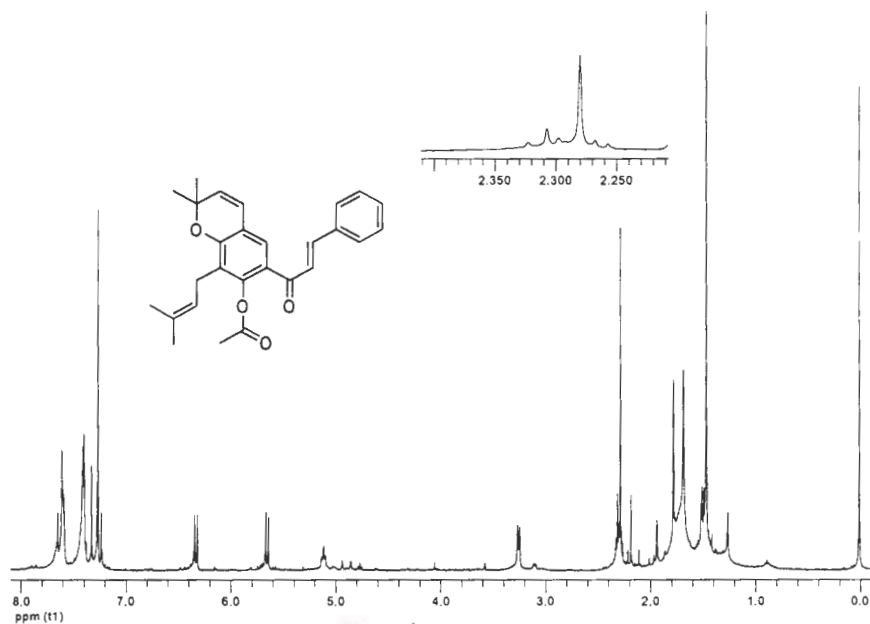


Figura 5.7. Espectro de RMN- ^1H y estructura del derivado acetilado de espinochalcona C (Va).

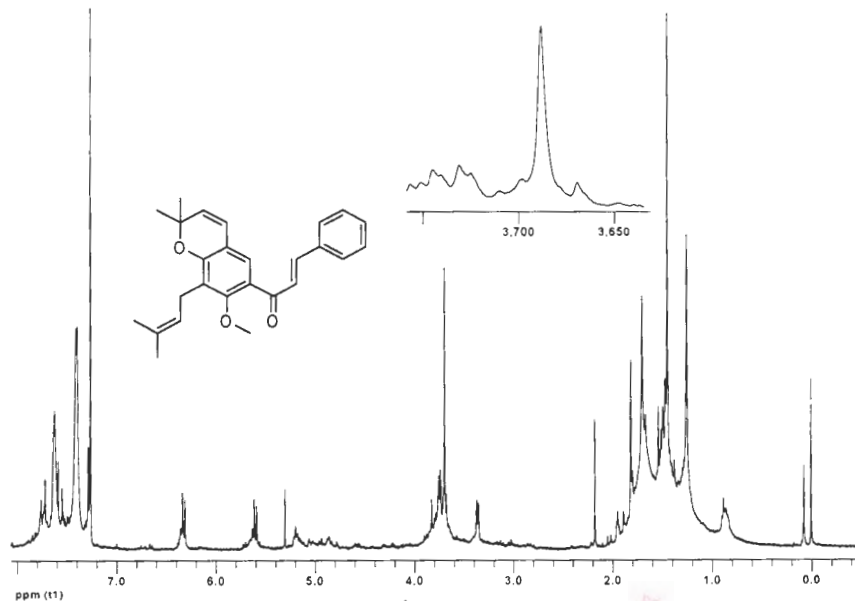


Figura 5.8. Espectro de RMN- ^1H y estructura del derivado metilado de espinochalcona C (Vb).

5.3.3. COMPUESTO VI (Espinochalcona A)

Se obtuvo como un sólido amorfo amarillo (65 mg) con un $R_f = 0.63$ en Hx/An (8:2). Su espectrometría de masas indica un ion molecular de m/z 376. En el IR se observaron señales a 3390 (OH) y 1634 (carbonilo quelatado) cm^{-1} .

El espectro de RMN- ^1H (Figura 5.9) muestra un par de protones vinílicos con una constante de acoplamiento *trans* a δ 7.56 y δ 7.86 (1H, d, $J = 15.4$ Hz); además, se observa un protón quelatado a δ 13.63 (s), confirmando un esqueleto de chalcona. Más aún, se observa la presencia de dos grupos isoprenilos [cuatro singuletes a δ 1.76, 1.79, 1.80 y 1.84 (3H), dos dobles a δ 3.33 y δ 3.46 (2H, $J = 7.0$ Hz) y un multiplete a δ 5.30 (2H)] y un protón aromático aislado a δ 7.55 (1H) característico de un anillo aromático penta-sustituido. Un pico observado a δ 6.31 (1H) es atribuido a un hidroxilo de tipo fenol. Adicional a lo anterior, dos señales no resueltas para cinco protones aromáticos a δ 7.40 (m) y δ 7.62 (m) sugieren un segundo anillo aromático mono-sustituido.

El espectro de RMN- ^{13}C muestra 23 carbonos (Figura 5.10). Sin embargo, dos señales se encuentran traslapadas, siendo 25 el número real de carbonos; con el experimento DEPT-135 se pudo detectar a cuatro metilos, dos metilenos, diez metinos tipo sp^2 y por comparación con el espectro de RMN- ^{13}C , diez carbonos cuaternarios. De estos últimos, tres son carbonos sp^2 a campo bajo (δ 160.4, 162.6 y 192.1), correspondiendo uno a un carbonilo (δ 192.0), y siete son sp^2 a campo alto. La presencia de dos carbonos desplazados a campo bajo indican la presencia de dos grupos hidroxilo en la molécula; esto fue confirmado por medio de dos reacciones de derivatización.

El derivado acetilado del compuesto VI (VIa) se obtuvo como un aceite amarillo (12 mg). La cromatografía de gases acoplada a masas mostró un pico mayoritario a $T_r = 15.9$ min, con un ion molecular de m/z 460, indicando el incremento de 84 uma, concerniente a la adición de dos grupos acetilo a la molécula. El espectro de RMN- ^1H (Figura 5.11) e IR confirmaron la acetilación completa de la molécula, por la desaparición de la señal a δ 13.63 y la aparición de dos señales características de metilos desprotegidos unidos a carbonilo a δ 2.21 (s) y δ 2.32 (s) en RMN- ^1H . Así mismo, la ausencia de la banda ancha a 3390 cm^{-1} y la aparición de una señal a 1767 cm^{-1} en el espectro de IR indica la sustitución de los grupos hidroxilo por una reacción de esterificación.

El derivado éter del compuesto VI (VIb) (35 mg) fue obtenido como un aceite de color amarillo. Por cromatografía de gases-masas se confirmó la

relativa pureza del compuesto al observarse un solo pico a $T_r = 14.33$ min. Su espectro de masas mostró un ion molecular de m/z 404 y un fragmento de m/z 373, siendo consistentes con la ganancia y pérdida de dos grupos metilo. El espectro de RMN- ^1H (Figura 5.12) confirmó la presencia de grupos metoxilo a δ 3.68 (s) y δ 3.76 (s). Conjuntamente, la desaparición de la señal a 3390 cm^{-1} en el IR confirma la metilación de los dos grupos hidroxilo. Este es el primer reporte del derivado metilado de espinochalcona A.

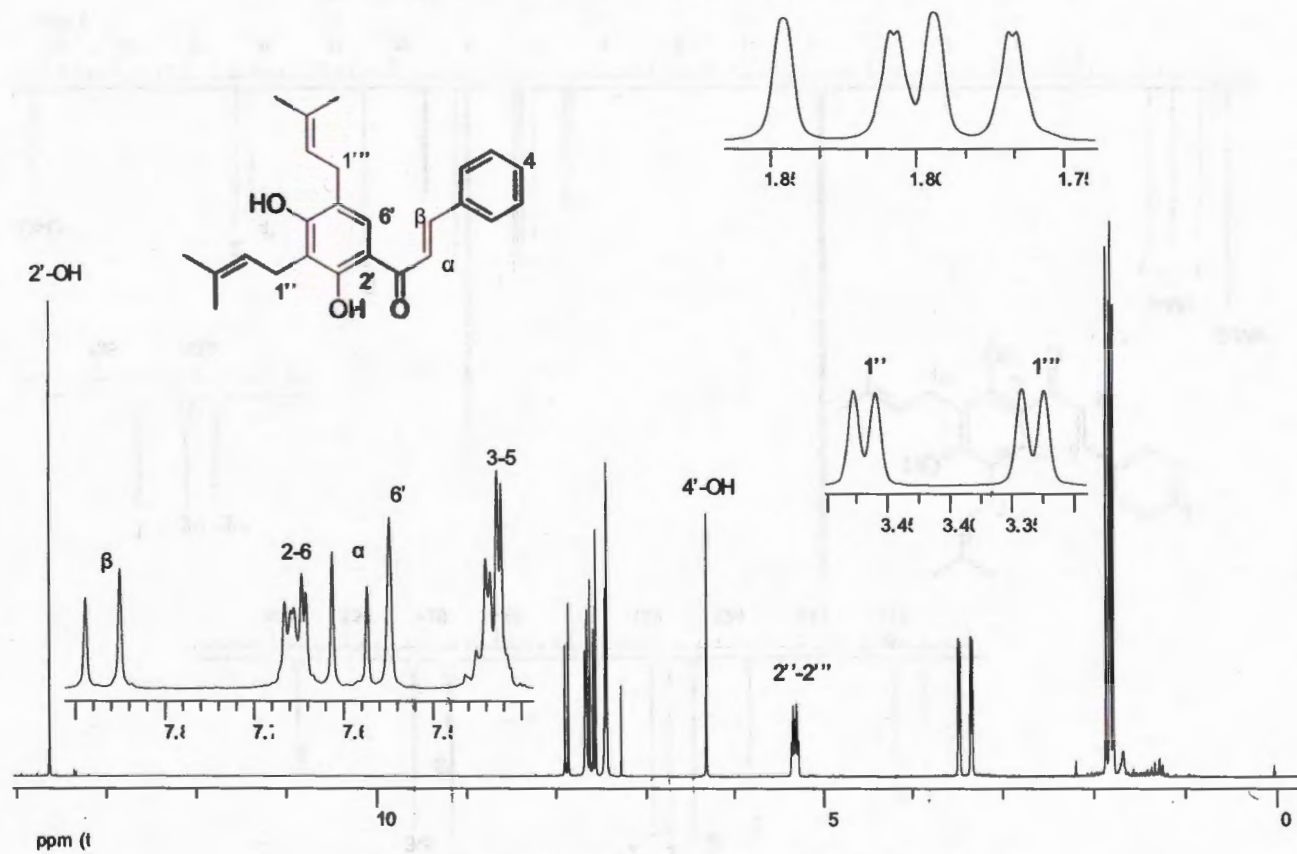


Figura 5.9. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ y estructura del compuesto VI

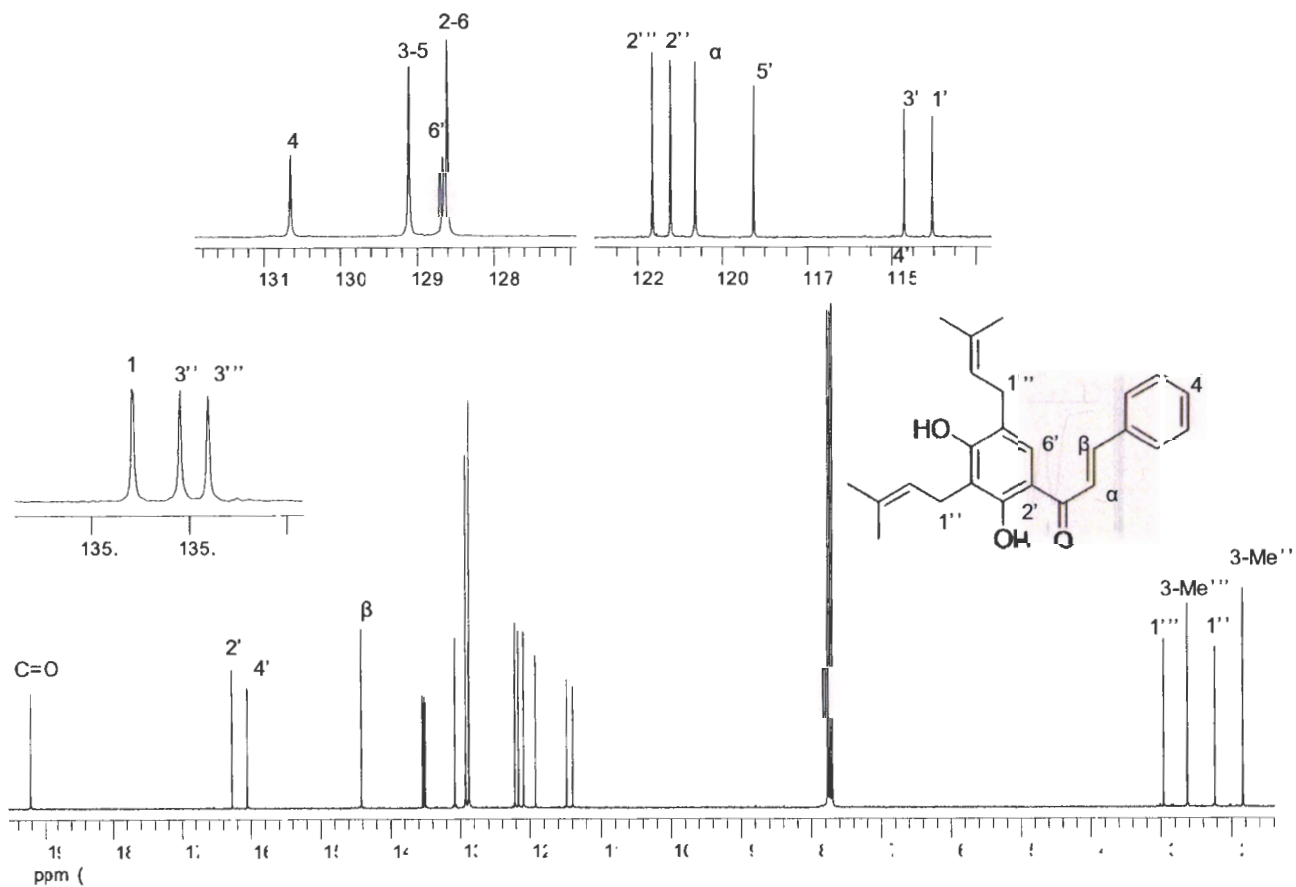


Figura 5.10. Espectro de RMN- C^{13} y estructura del compuesto VI.

La asignación de todos los protones y carbonos fue establecida por el análisis de los experimentos bidimensionales HMBC y HSQC (Tabla 5.3). El compuesto obtenido resultó ser una chalcona nombrada como espinochalcona A, previamente aislada de las raíces de *Tephrosia spinosa* (Venkata & Rajendra, 1992).

Tabla 5.3. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto VI.^a

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (J = Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	HMBC	
			$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1		135.2		
2	7.62 m	128.5		C β , C4
3	7.40 m	129.0	C2	C1
4	7.40 m	130.6		C2, C6
5	7.40 m	129.0	C6	C1
6	7.62 m	128.5		C β , C4
α	7.56 d (15.4)	120.7	C=O, C β	C1
β	7.86 d (15.4)	144.0	C α , C1	C=O
1'		113.7		
2'		162.6		
3'		114.5		
4'		160.4		
5'		119.0		
6'	7.55 s	128.6	C1', C5'	C2', C4'
1''	3.46 d (7.0)	22.0	C3', C2''	C4', C3''
2''	5.30 m	121.4		
3''		135.0		
3''-(CH ₃) ₂	1.76 s	18.0	C3''	C2''
	1.84 s			
1'''	3.33 d (7.0)	29.3	C3'''	C2'''
2'''	5.30 m	122.0		
3'''		134.8		
3'''-(CH ₃) ₂	1.79 s	25.9	C3'''	C2'''
	1.80 s			
4'-OH	6.31 s		C4'	C3', C5'
2'-OH	13.63 s		C2'	C1', C3'
C=O		192.1		

^a Señales obtenidas en CD₃Cl.

^b RMN-¹H a 400 MHz

^c RMN-¹³C a 100 MHz

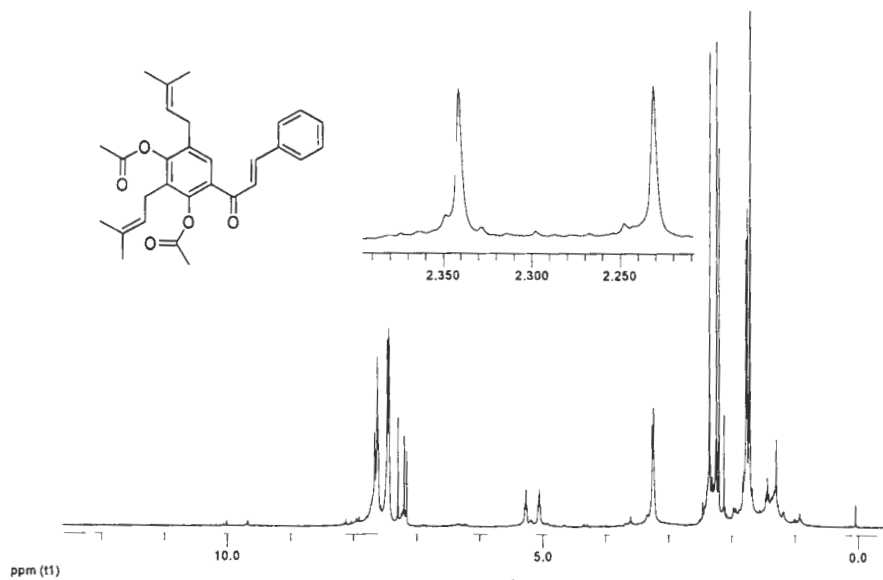


Figura 5.11. Espectro de RMN-¹H y estructura del derivado acetilado de espinochalcona A (VIa).

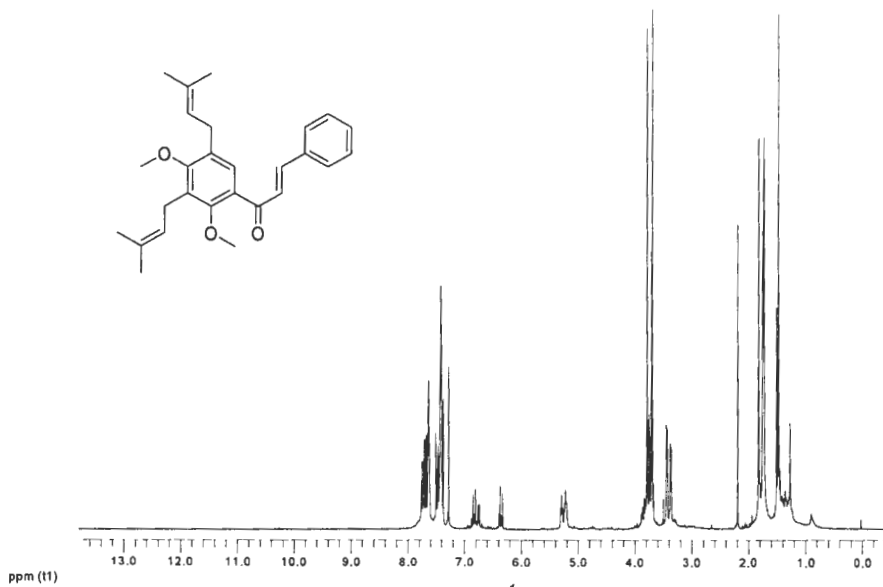


Figura 5.12. Espectro de RMN-¹H y estructura del derivado metilado de espinochalcona A (VIb).

5.3.4. COMPUESTO VII (Aeschynocarpina)

El compuesto VII (10 mg) fue obtenido como un sólido amorfo de color amarillo con un $R_f = 0.25$ en Hx/An (8:2). Un conjunto de señales observadas en el espectro de RMN- ^1H (Figura 5.13 y Tabla 5.4) a δ 3.54 (1H, m), δ 3.62 (1H, t, $J = 10.8$ Hz), δ 4.23 (1H, dd, $J = 4.8, 10.6$ Hz) y δ 5.50 (1H, d, $J = 6.7$ Hz), en conjunto con señales de carbonos a δ 40.4, δ 66.7 y δ 79.6 en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 5.14 y Tabla 5.4), sugirieron que el compuesto VII posee un esqueleto de pterocarpano (Rukachaisirikul *et al.*, 2008). El espectro COSY (Figura 5.15) confirmó el acoplamiento entre los protones geminales de H-6 (δ 3.62 y 4.23). De la misma manera, se observó acoplamiento entre un protón de H-6 (δ 4.23) con H-6a (δ 3.54) y de H-6a con H-11a (δ 5.50), confirmando el esqueleto de pterocarpano del compuesto VII. Además, en su espectro de RMN- ^1H se observó la presencia de señales típicas de un sistema 2,2-dimetil-pirano, con desplazamientos de metilos desprotegidos a δ 1.34 (6H, s) y dos protones vinílicos con acoplamiento *cis* a δ 5.57 (1H, d, $J = 10.0$ Hz) y δ 6.61 (1H, d, $J = 10.0$ Hz). En la molécula se encuentra un anillo aromático penta-sustituido y otro tetra-sustituido, siendo inferido por la presencia de un protón aislado a δ 7.02 (1H, s) y dos señales a δ 6.44 (1H, d, $J = 8.0$ Hz) y δ 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz) con acoplamiento en *orto*.

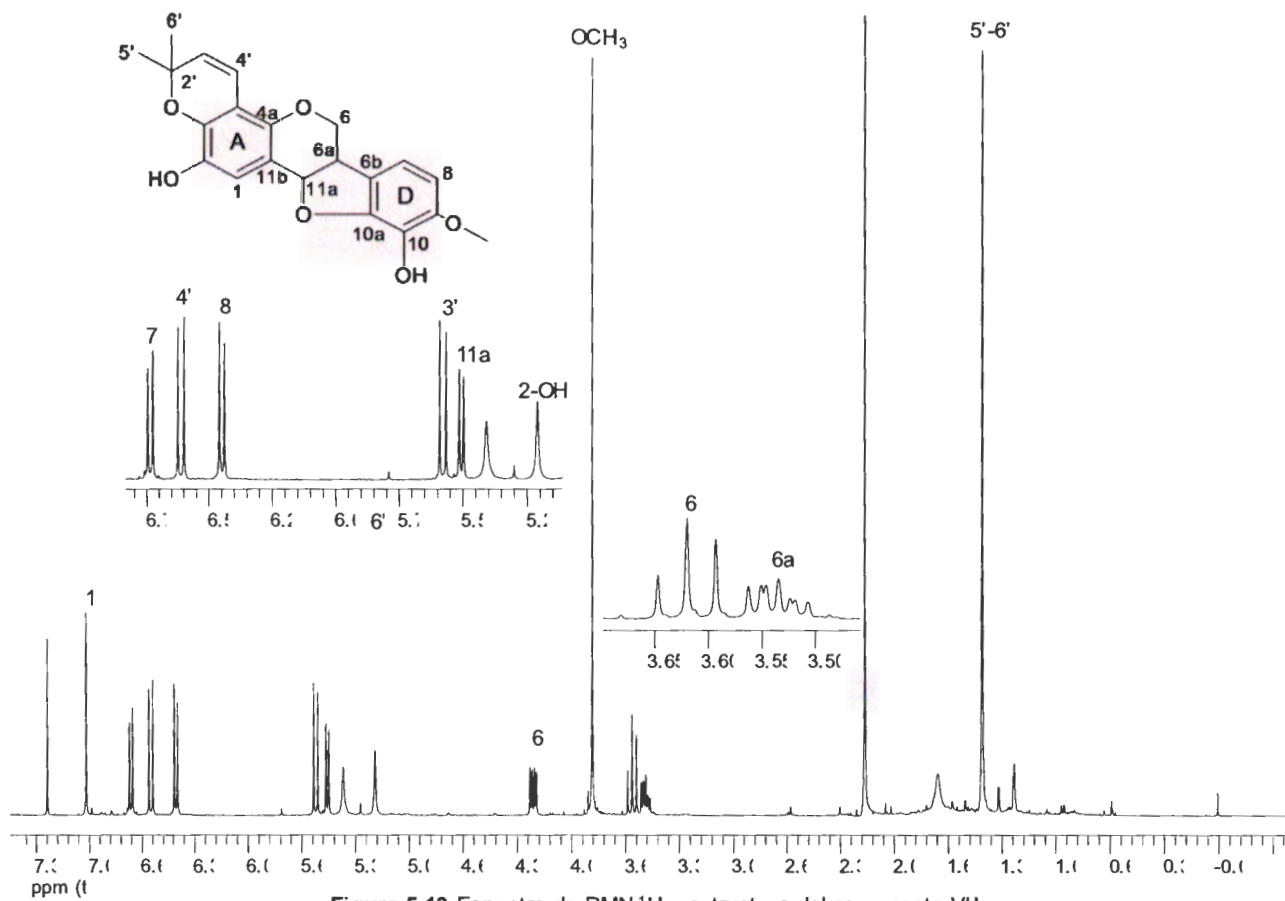


Figura 5.13. Espectro de RMN- ^1H y estructura del compuesto VII.

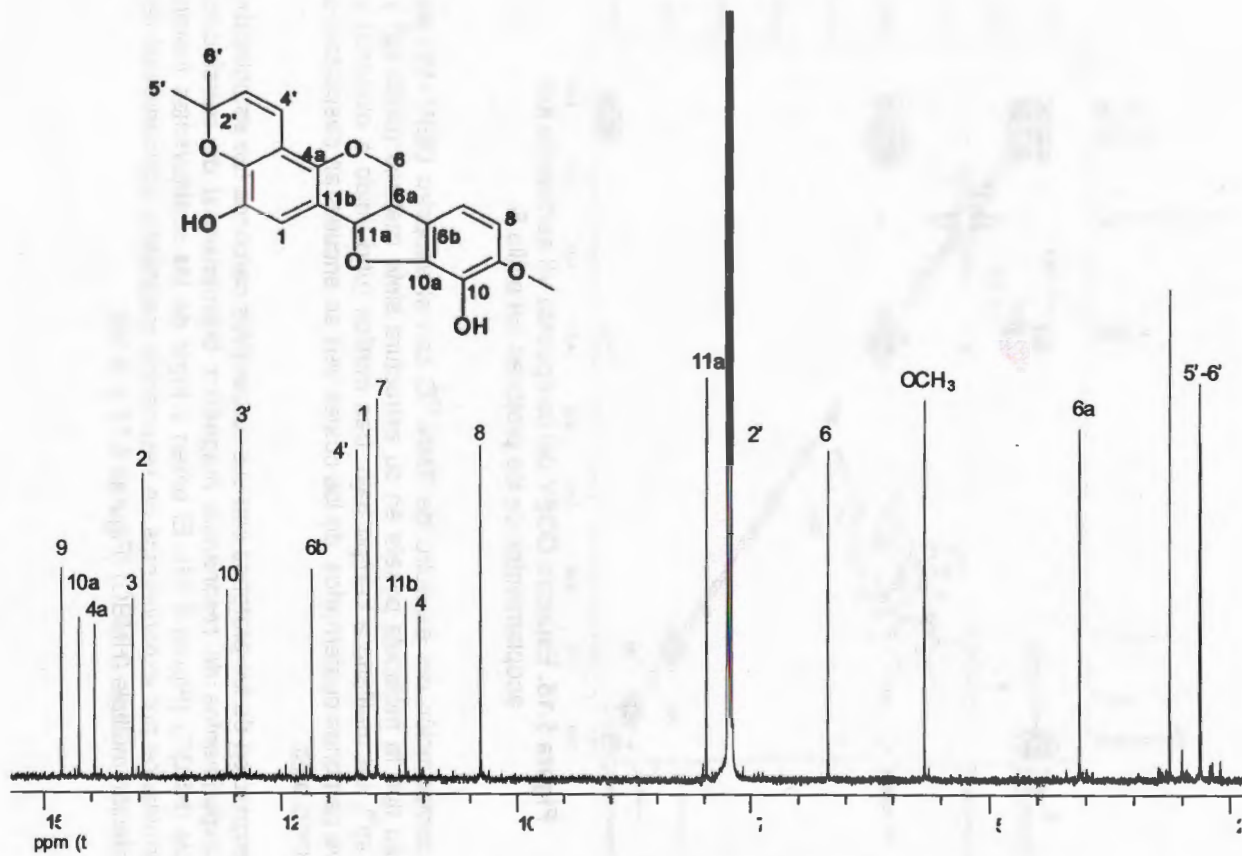


Figura 5.14. Espectro de RMN-¹³C y estructura del compuesto VI.

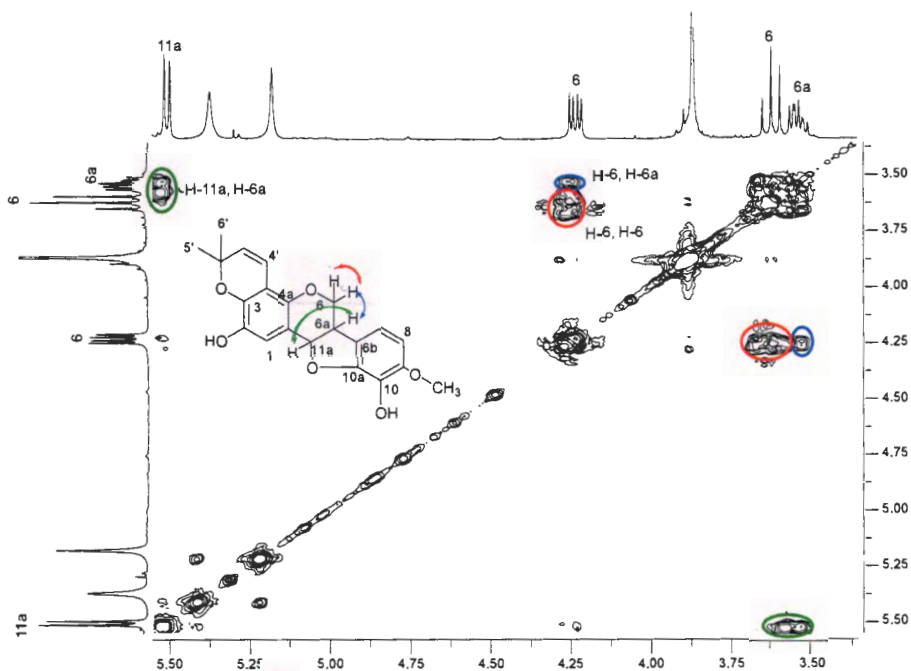


Figura 5.15. Espectro COSY del compuesto VII señalando los acoplamientos de los protones del anillo B.

Por comparación del espectro de RMN- ^{13}C con el espectro DEPT-135 se dedujo que la molécula poseía en su estructura siete metinos (cinco sp^2 y dos sp^3), un metileno a campo bajo, tres metilos (uno unido a oxígeno) y nueve carbonos cuaternarios, de los cuales seis se encuentran desplazados a campo bajo.

La asignación de los protones con sus respectivos carbonos fue establecida por experimentos de resonancia magnética bidimensional de correlación simple (HSQC) (Figura 5.16). El orden y lugar de los sustituyentes fueron determinados por experimentos de resonancia magnética bidimensional de correlación múltiple (HMBC) (Figuras 5.17 y 5.18).

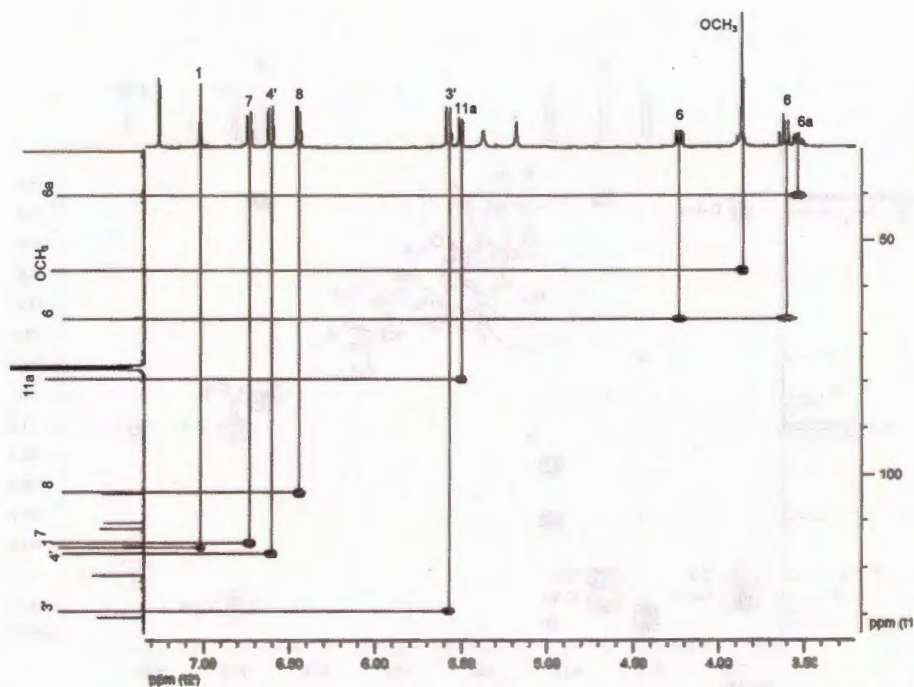


Figura 5.16. Espectro HSQC del compuesto VII.

Quando se comparó el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto VII, con el RMN- ^{13}C reportado en la literatura para el compuesto 2-hidroxielocarpina (Chin *et al.*, 2006) se encontró una estrecha similitud de ambos pterocarpanos en el anillo A, siendo la sustitución en C-2 de un hidroxilo y un anillo pirano en las posiciones 3 y 4, las sugerentes para el compuesto VII. Sin embargo, estas posiciones fueron constatadas por medio del empleo de experimentos bidimensionales de HMBC, los cuales son discutidos a continuación.

La posición del anillo pirano en el anillo A del compuesto VII fue confirmada en las posiciones 3 y 4, por las correlaciones mostradas en el espectro de HMBC (Figura 5.17) de H-4' con C-3 (δ 140.5), C-4 (δ 110.3) y C4a (δ 144.5); así como de H-3' con C-4. Así mismo, la localización de un hidroxilo en la posición dos en la molécula se confirmó por la correlación del protón 2-OH a $^3J_{\text{CH}}$ con C-1 (δ 115.6) y C-3 (δ 140.5). Además, la posición de H-1 fue inferida por las correlaciones obtenidas en el espectro de HMBC con C-11a (δ 79.6) y C-4a.

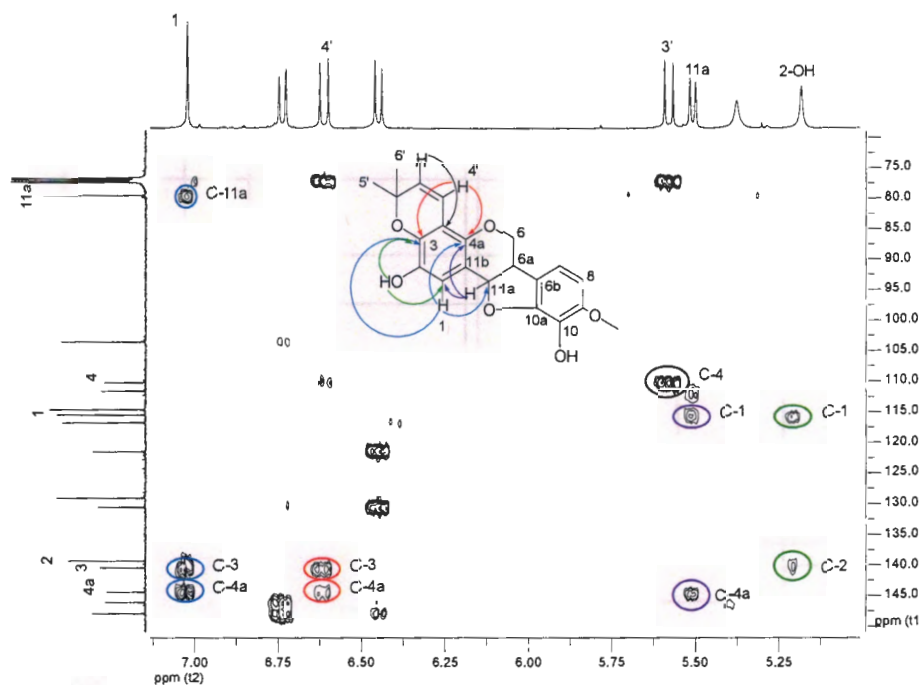


Figura 5.17. Espectro HMBC del compuesto VII señalando las correlaciones en el anillo A.

En tanto que los dos protones con acoplamiento en *orto* (δ 6.44 y 6.73) en el anillo D fueron asignados a las posiciones 7 y 8, respectivamente, dada la correlación de H-7 (δ 5.73) con C-6a (δ 40.4) y C-10a (δ 146.2) (Figura 5.18). Además, un segundo hidroxilo en la molécula fue colocado en posición C-10 (δ 130.6) por la correlación existente a $^3J_{CH}$ del protón H-8 con este carbono, y la cual no es observada entre H-7 y C-10 (δ 130.6). Por último, la posición de un grupo metoxilo fue designada por la correlación observada de los protones a δ 3.86 con su carbono base a C-9 (δ 148.1). No se encontró reportes en la literatura de este compuesto, por lo cual este es un nuevo piran-pterocarpano, el cual se denominó aeschynocarpina.

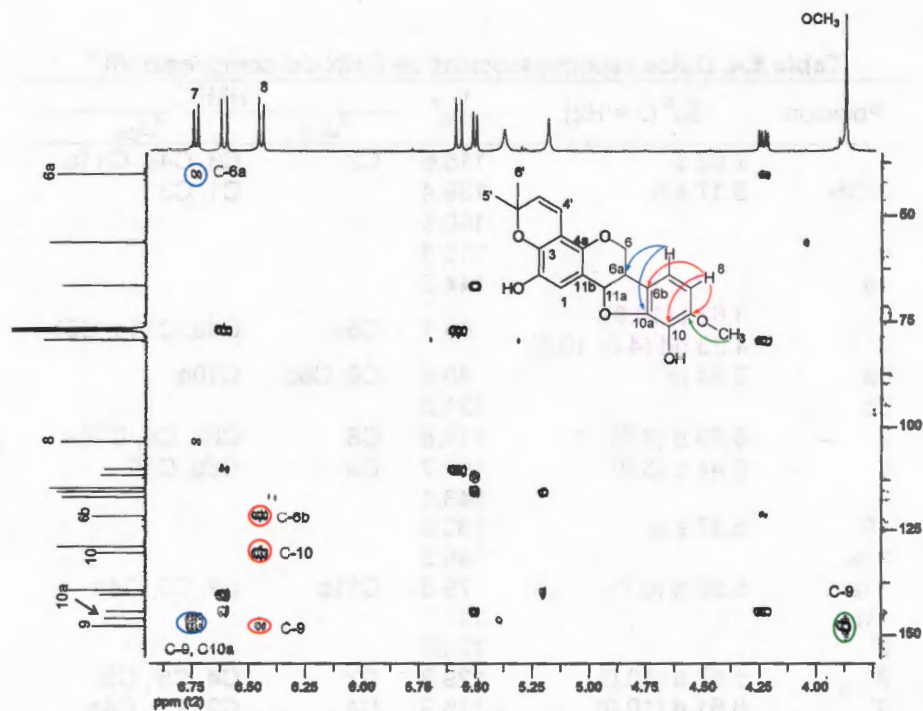


Figura 5.18. Espectro de HMBC del compuesto VII señalando las correlaciones en el anillo D.

Tabla 5.4. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto VII.^a

Posición	δ_H^b ($J = \text{Hz}$)	δ_C^c	HMBC	
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	7.02 s	115.6	C2	C3, C4a, C11a
2-OH	5.17 s.a	139.4		C1, C3
3		140.5		
4		110.3		
4a		144.5		
6'	3.62 t (10.8)			
6''	4.23 dd (4.8, 10.6)	66.7	C6a	C4a, C11a, C6b
6a	3.54 m	40.4	C6, C6b	C10a
6b		121.6		
7	6.73 d (8.0)	114.8	C8	C6a, C9, C10a
8	6.44 d (8.0)	103.7	C9	C6b, C10
9		148.1		
10	5.37 s.a	130.6		
10a		146.2		
11a	5.50 d (6.7)	79.6	C11b	C1, C6, C4a
11b		111.7		
2'		77.38		
3'	5.57 d (10.0)	129.2	C2'	C4, C5', C6'
4'	6.61 d (10.0)	116.9	C4	C2', C3, C4a
2'-(CH ₃) ₂	1.34 s	27.9		C2'
OCH ₃	3.86 s	56.5		C9

^a Señales obtenidas en CD₃Cl.

^b RMN-¹H a 400 MHz.

^c RMN-¹³C a 100 MHz.

5.3.5. COMPUESTO VIII (2-Metoxi-medicarpina)

Se obtuvieron 7 mg del compuesto VIII como un sólido amorfo de color amarillo con un $R_f = 0.4$ en Hx/An (8:2). En su espectro de RMN- ^1H (Figura 5.19) se muestran señales características de un esqueleto de pterocarpano (Rukachaisirikul *et al.*, 2008) a δ 3.53 (1H, m), δ 3.55 (1H, t, $J = 11.0$ Hz), δ 4.21 (1H, dd, $J = 4.2, 10.0$ Hz) y δ 5.48 (1H, d, $J = 6.3$ Hz). Adicionalmente, dos señales a δ 3.77 (3H, s) y δ 3.91 (3H, s) revelan la presencia de grupos metoxilo en la molécula. En la región de protones aromáticos se encuentran dos señales aisladas a δ 6.54 (1H, s) y δ 6.96 (1H, s), junto con otras tres señales a δ 6.44 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.46 (1H, dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz) y δ 7.13 (1H, d, $J = 8.8$ Hz).

Los datos de RMN- ^1H concuerdan con lo descrito en la literatura (Tabla 5.5) para el compuesto 2-metoxi-medicarpina (Figura 5.19), un pterocarpano aislado previamente de los epicotiledones de *Pisum sativum* (Pueppke & VanEtten, 1975). En el estudio realizado por Pueppke no se observan las señales típicas del esqueleto pterocarpano a δ 3.53, 3.55, 4.21 y 5.48, debido probablemente a la pobre resolución con la cual se obtuvo el espectro (90 MHz). Sin embargo, el autor llegó a la estructura por distintas reacciones de derivatización y por el estudio de la espectrometría de masas de la molécula. Por lo anterior, este estudio es un aporte a la espectroscopía de la molécula. Asimismo, se reporta por primera vez el aislamiento de este compuesto en el género *Aeschynomene*, siendo un aporte para la química del género.

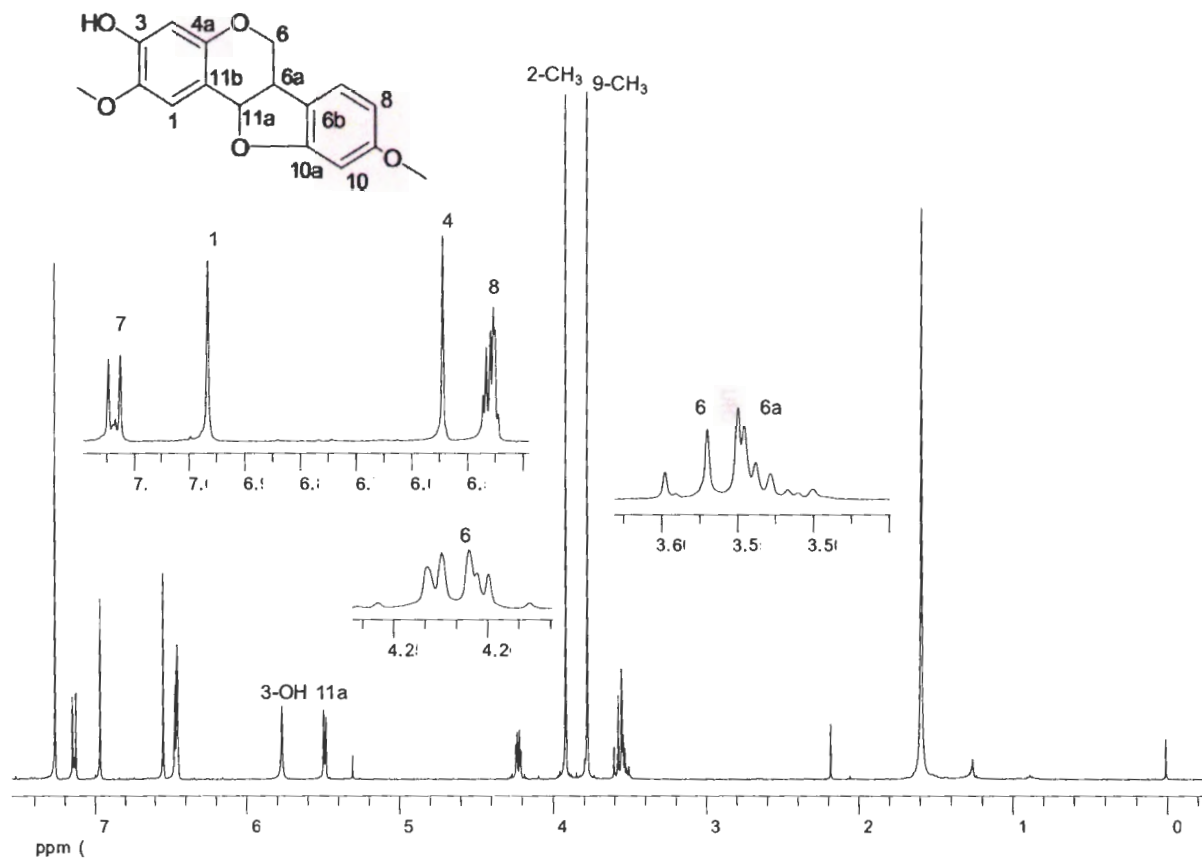


Figura 5.19. Espectro de RMN¹H y estructura del compuesto V.

Tabla 5.5. Comparación de las señales de RMN-¹H obtenidas del compuesto VIII y 2-metoxi-medicarpina.

Posición	δ_H (J = Hz)	
	2-metoxi-medicarpina ^a	Compuesto VIII ^b
1	6.96 s	6.96 s
4	6.52 s	6.54 s
6		3.55 t (11.0) 4.21 dd (4.2, 10.0)
6a		3.53 m
7	7.12 d (8.8)	7.13 d (8.8)
8	6.43 dd (8.8, 2.3)	6.46 dd (8.8, 2.3)
10	6.44 d (2.3)	6.44 d (2.3)
11a		5.48 d (6.3)
2-OCH ₃	3.90 s	3.91 s
9-OCH ₃	3.77 s	3.77 s
3-OH	5.86 sa	5.76 sa

^a Señales obtenidas por Pueppke & VanEtten, 1975.

^b Señales obtenidas en CDCl₃ a 400 MHz.

5.3.6. COMPUESTO IX (Secundiflorol G)

El compuesto IX se obtuvo como un aceite amarillo (20 mg) con un R_f = 0.13 en Hx/An (8:2). En el espectro de RMN-¹H (Figura 5.20) se observa un conjunto de múltiples acoplamientos de cinco protones [δ 2.88 (1H, dd, J = 15.0, 4.0 Hz), δ 3.02 (1H, ddd, J = 17.0, 10.0, 3.0 Hz), δ 3.52 (1H, m), δ 4.09 (1H, t, J = 10.0 Hz) y δ 4.36 (1H, d, J = 10.0 Hz)], sugiriendo un esqueleto de isoflavano (Tanaka *et al.*, 1998). También, se observa la presencia de un metoxilo a δ 3.74 (s) y señales típicas de un grupo α,α -dimetil-alilo [δ 1.37 (3H, s), δ 1.51 (3H, s), δ 4.97 (1H, dd, J = 18.0, 1.0 Hz), δ 5.02 (1H, dd, J = 11.0, 1.0 Hz) y δ 6.13 (1H, ddd, J = 18.0, 11.0, 3.0 Hz)], así como un protón aromático aislado a δ 6.56 (1H, s) y tres protones en un sistema ABC [δ 6.36 (1H, d, J = 3.0 Hz), δ 6.38 (1H, dd, J = 8.0, 3.0 Hz) y δ 6.92 (1H, d, J = 8.0 Hz)]; lo anterior, señala que un anillo aromático se encuentra penta-sustituido y otro anillo está tri-sustituido.

Los datos descritos anteriormente concuerdan con lo reportado en la literatura para el compuesto secundiflorol G (Tabla 5.6), un isoflavano previamente aislado de la corteza de *Sophora arizona* (Tanaka *et al.*, 1998). Este es el primer reporte del aislamiento de un isoflavano en el género *Aeschynomene*.

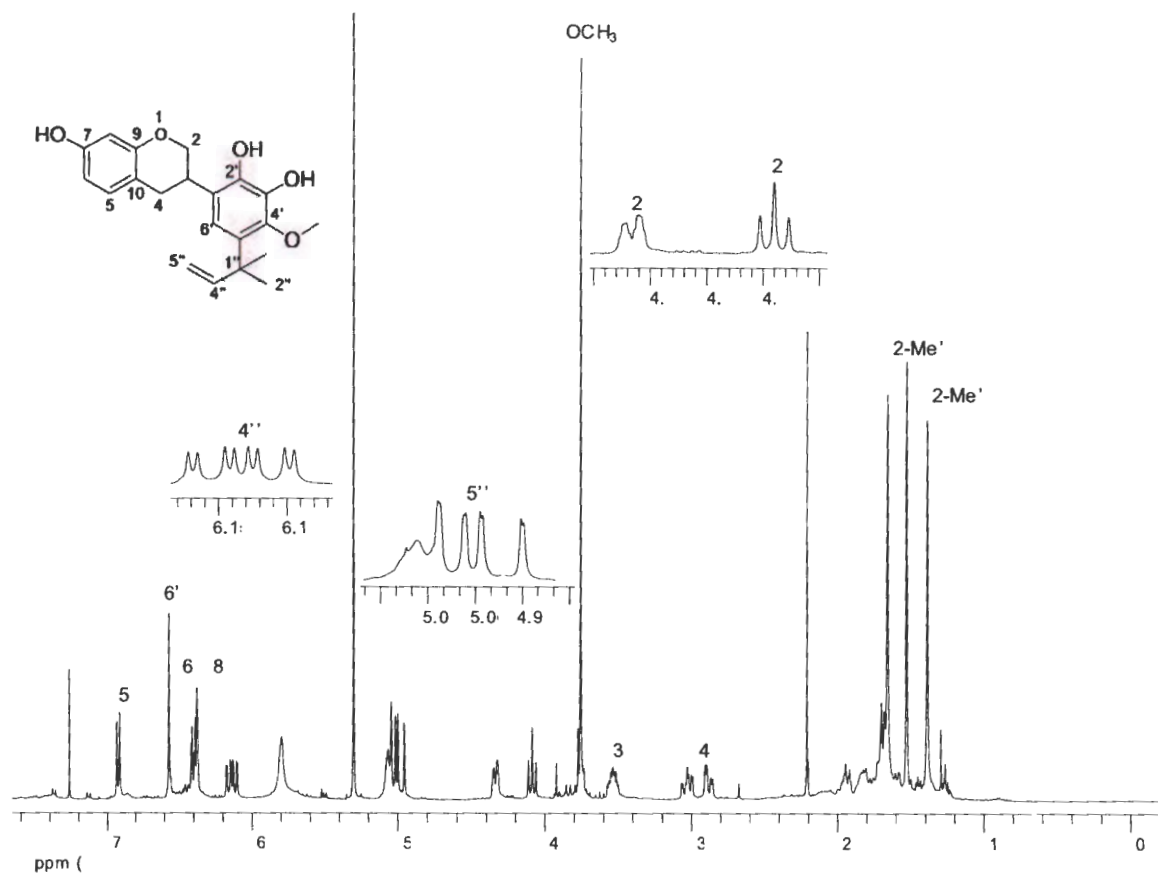


Figura 5.20. Espectro de RMN¹H y estructura del compuesto IX.

Tabla 5.6. Comparación de las señales de RMN-¹H obtenidas del compuesto IX y secundiflorol G.

Posición	secundiflorol G ^a	Compuesto IX ^b
	δ_H (J = Hz)	
1		
2	4.05 dd (10.0, 10.0) 4.32 d (10.0)	4.09 t (10.0) 4.36 d (10.0)
3	3.51 m	3.52 m
4	2.86 dd (16.0, 4.0) 2.98 dd (16.0, 11.0)	2.88 dd (15.0, 4.0) 3.02 ddd (17.0, 10.0, 3.0)
5	6.90 d (8.0)	6.92 d (8.0)
6	6.38 dd (8.0, 2.0)	6.38 dd (8.0, 3.0)
7		
8	6.36 d (2.0)	6.36 d (3.0)
9		
10		
1'		
2'		
3'		
4'		
5'		
6'	6.60 s	6.56 s
1''		
2''	1.39 s	1.37 s
3''	1.39 s	1.51 s
4''	6.08 dd (18.0, 11.0)	6.13 ddd (18.0, 11.0, 3.0)
5''	4.95 dd (18.0, 1.0) 4.97 dd (11.0, 1.0)	4.97 dd (18.0, 1.0) 5.02 dd (11.0, 1.0)
OCH ₃	3.75 s	3.74 s

^a Señales obtenidas por Tanaka *et al.*, 1998.

^b Señales obtenidas en CDCl₃ a 400 MHz.

5.4. DISCUSIONES GENERALES

Son pocos los estudios que se han realizado al género *Aeschynomene*. De hecho, tan sólo se ha descrito el aislamiento del flavonol glicosilado reynoutrin de la especie *A. indica*, en tanto que de la especie *A. mimosifolia* se han aislado un neoflavonoide llamado mimosifoliol y una C16-estiril-cicloheptenona denominada mimosifolenona (Fullas *et al.*, 1996). No existen reportes en la literatura del estudio fitoquímico de *A. fascicularis*, siendo éste el primer reporte de la composición química de esta especie y el primer reporte de la presencia de chalconas, pterocarpanos e isoflavanos en el género.

Las chalconas son un grupo de compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides y son considerados metabolitos clave en la biosíntesis de las demás subclases de flavonoides. Tienen una amplia distribución en el reino vegetal (sobre todo en la familia Fabaceae) y conforman parte de los pigmentos naturales (Nowakowska, 2007). Las tres chalconas aisladas en el presente estudio han sido aisladas de otros géneros de la familia Fabaceae, como por ejemplo: la chalcona isocordoína ha sido aislada previamente de especies del género *Lonchocarpus* (De Lima *et al.*, 1973; Borges *et al.*, 2002), en tanto que espinochalcona A y C sólo habían sido aisladas de la especie *Tephrosia spinosa* (Venkata & Rajendra, 1992; Venkata & Rajendra, 1993). Aunque se sabe que este tipo de compuestos son enormemente apreciados en la industria farmacéutica por las diversas propiedades farmacológicas que poseen, no es muy claro el papel que desempeñan las chalconas en las plantas. Sin embargo, Simmonds (2001) demostró que las chalconas poseían una potente actividad anti-alimentaria en contra de larvas del género *Spodoptera*. Es posible que este tipo de compuestos le sirvan a *A. fascicularis* no sólo como intermediarios del metabolismo secundario, sino además, tengan la función de ser anti-alimentarios contra el ataque hacia la planta.

Los isoflavonoides son una subclase de flavonoides encontrados primordialmente en la subfamilia Papilionoideae de la familia Fabaceae. Están implicados en los mecanismos de defensa de la planta ante el herbivorismo, ante el ataque de fitopatógenos y también funcionan como señales químicas en la fijación de nitrógeno. Estos metabolitos se dividen en grupos, entre los que se encuentran: isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos, pterocarpanos, rotenoides, oligómeros de isoflavonoides, coumarin-cromonas, isoflav-3-eno, arilcoumarinas, coumestanos y arilbenzofuranos (Boland & Donnelly, 1998). En este estudio se reportan tres compuestos pertenecientes a esta subclase de compuestos, uno (secundiflorol G) perteneciente al grupo de los isoflavanos y otros dos (2-metoxi-medicarpina y aeschynocarpina) concerniente al grupo de los

pterocarpanos, de los cuales, aescynocarpina es presentado como un nuevo producto natural.

Los isoflavanos se encuentran exclusivamente en la familia Fabaceae y éstos fungen como alexinas. Los géneros de la familia Fabaceae en los cuales ha sido aislado este grupo de compuestos se encuentran: *Astragalus*, *Colutea*, *Glycyrrhiza*, *Millettia*, *Maackia* y *Sophora*, siendo ésta la primera vez que se reporta este grupo de metabolitos secundarios en el género *Aeschynomene*.

Los pterocarpanos contienen un sistema de anillos tetracíclicos derivados del esqueleto básico de isoflavonoides por un enlace éter entre las posiciones C-4 y C-2'. Este grupo de isoflavonoides se producen después de cualquier infección dada por hongos o algún tratamiento con elicitores abióticos. Son ampliamente distribuidos en la familia Fabaceae, en especial en la subfamilia Papilionoideae, principalmente en los géneros *Erythrina*, *Glycyrrhiza*, *Petalostemon*, *Sophora* y *Tephrosia*. Sin embargo, se han encontrado pterocarpanos en otras familias de plantas, como en el caso de las familias Myricaceae, Myristicaceae y Zingiberaceae. Debido a su amplia actividad antifúngica, algunos autores proponen que este tipo de compuestos fungen como fitoalexinas (Boland & Donnelly, 1998; Dixon & Summer, 2003; Reynaud *et al.*, 2005; Veitch, 2009). El compuesto conocido como 2-metoxi-medicago y el nuevo metabolito denominado aescynocarpina son pterocarpanos que probablemente sean fitoalexinas antifúngicas propias de la especie *A. fascicularis*.

5.5. CONCLUSIONES

De la fracción hexánica activa de las raíces de *A. fascicularis* se aislaron seis compuestos, incluyendo tres chalconas: isocordoína (compuesto IV), espinochalcona A (compuesto V) y espinochalcona C (compuesto VI), así como el pterocarpano 2-metoxi-medicarpina (compuesto VIII) y el isoflavano secundiflorol G (compuesto IX), reportados previamente en la literatura, además del nuevo pterocarpano aeschynocarpina (compuesto VII). Adicionalmente, se obtuvieron los derivados acetilados y metilados de espinochalcona A y C.

5.6. REFERENCIAS

- Boland, G.M., Donnelly, D.M. (1998). Isoflavonoids and related compounds. *Natural Product Reports* 15, 241-260.
- Borges-Argáez R., Peña-Rodríguez L., Waterman P. (2002). Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. *Phytochemistry*, 60, 533-540.
- Chin, Y.W., Mdee, L.K., Mbwambo, Z.H., Mi, Q., Chai, H.B., Cragg, G.M., Swanson, S.M., Kinghorn, D. (2006). Prenylated flavonoids from the root bark of *Berchemia discolor*, a Tanzanian medicinal plant. *Journal of Natural Products*, 69, 1649-1652.
- Dixon, R., Sumner, L. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131, 878-885.
- Duke, J. (1981). *Handbook of Legumes of World Economic Importance*, 1a ed.; Plenum Press: New York.
- Flores, J. (2001). *Etnoflora Yucatanense: Leguminosae*. Florística, Etnobotánica y Ecología; Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Dirección General de Desarrollo Académico. Subdirección de Extensión. Departamento Editorial: Mérida, Yucatán, México, Fascículo 18.
- Flores, J., Espejel-Carvajal, I. (1994). *Etnoflora Yucatanense: Tipos de Vegetación de la Península de Yucatán*; Universidad Autónoma de Yucatán, Sostenibilidad Maya: Mérida, Yucatán, México, Fascículo 3.
- Garazd, M., Garazd, Y., Khilya, V. (2003). Neoflavones: natural distribution and spectral and biological properties. *Chemistry of Natural Compounds* 39, 54-121.
- Gonçalves, O., De Mélo, J., De Barros, J., De Andrade, F., Machado, M., Marini-Bettólo, G., Delle Monache, G., Delle Monache, F. (1975). New prenylated chalcones from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. (*Cordia piaca*). *Il Farmaco* 30, 326-42.
- Matuda, E. (1981). *Las leguminosas del Estado de México*; CODAMEX, SAIMEX, Dirección de Recursos Naturales: México, pp 1-4.
- Méndez, M.; Durán, R. (1997). Diagnóstico del conocimiento etnobotánico actual de las plantas medicinales de la Península de Yucatán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60, 15-24.
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42, 125-137.
- Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M., Walchshofer, N. (2005). Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural Product Reports* 22, 504-515.

- Rukachaisirikul, T., Innok, P., Suksamrarn, A. (2008). Erythrina alkaloids and a pterocarpan from the bark of *Erythrina subumbrans*. *Journal of Natural Products* 71, 156-158.
- Simmonds, M.S. (2001). Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56, 245-252.
- Veitch, N.C. (2009). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports* 26, 776-802.
- Venkata, E., Rajendra, R. (1992). Two chalcones from *Tephrosia spinosa*. *Phytochemistry* 31, 2121-2122.
- Venkata, E., Rajendra, R. (1993). Prenylated flavonoids from *Tephrosia spinosa*. *Phytochemistry* 32, 183-185.

Capítulo VI

Actividad biológica de los compuestos aislados de *Aeschinome fascicularis*

6.1. ANTECEDENTES

6.1.2. TIPOS DE ENSAYOS CITOTÓXICOS

Para el estudio de compuestos con actividad antineoplásica *in vitro* se emplean varios métodos, que pueden ser pruebas moleculares o celulares. Las pruebas moleculares son dirigidas sobre estructuras subcelulares blanco y son sumamente específicas, siendo importantes para el descubrimiento del mecanismo específico del compuesto analizado. Las pruebas celulares se dividen en: ensayos de citotoxicidad y ensayos de otro tipo (incluidos los morfológicos). En estos se mide la concentración efectiva 50 y sirve como tamizaje primario para otros estudios. Existen cuatro grandes tipos de pruebas para medir el crecimiento celular y la actividad citotóxica: 1) Conteo de colonias celulares; 2) Prueba de colorantes unidos a macromoléculas (SRB); 3) Pruebas del metabolismo celular (MTT); y 4) Integridad de la membrana (Rahman *et al.*, 2001).

6.1.3. BIOENSAYO CON MTT

El bioensayo con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio] es un ensayo colorimétrico de punto final. Se utiliza para cuantificar la viabilidad celular en estudios de proliferación celular y citotoxicidad en protocolos de rastreo de drogas antineoplásicas. Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tienen las células vivas de reducir las sales amarillas de tetrazolio a un derivado del formazán de color azul intenso e insoluble en medio acuoso; esta reducción es producida por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Figura 6.1). Esta prueba puede usarse para determinar de forma precisa la sensibilidad de drogas antitumorales, por la relación directa entre el número de células viables y la producción de formazán, la cual puede ser medible con un espectrofotómetro (Rahman *et al.*, 2001; Denizot & Lang, 1986; Pluma *et al.*, 1989).

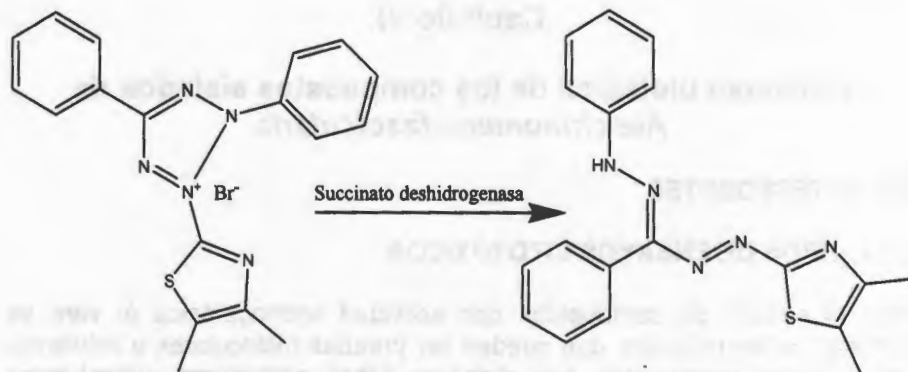


Figura 6.1. Esquema de la conversión del MTT al producto reducido formazán.

6.1.4. BIOENSAYO CON SULFORODAMINA B

La sulforodamina B (SRB) que se utiliza en este bioensayo es un colorante rosa brillante de aminoxanteno (Figura 6.2). El bioensayo es utilizado por *The National Cancer Institute* (NCI) para el rastreo de drogas a gran escala. Se caracteriza por ser una prueba colorimétrica de punto final, indefinidamente estable y observable a simple vista. Su fundamento se basa en la habilidad del colorante de unirse electrostáticamente a los residuos de aminoácidos de las proteínas. Esta unión se da bajo condiciones medianamente ácidas, en tanto que la extracción y solubilización del complejo se hace bajo condiciones medianamente básicas. Esta prueba determina la viabilidad celular, por una relación indirecta entre el número de células y la concentración de proteínas totales presentes y es fácilmente medible en un espectrofotómetro (Skehan *et al.*, 1990; Voigt, 2005).

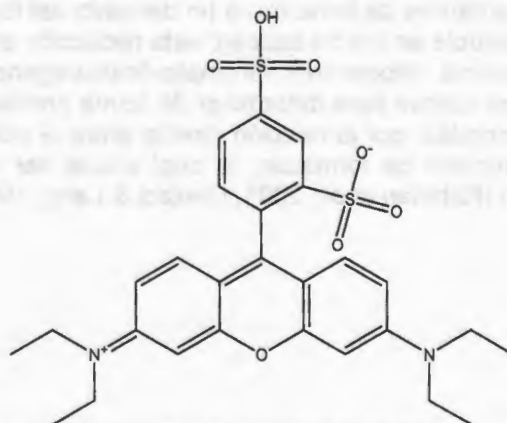


Figura 6.2. Estructura molecular del colorante de sulforodamina B.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para la realización de los bioensayos se utilizó MTT (Sigma) y SRB (Sigma). Las densidades ópticas de las placas reveladas con MTT y SRB fueron obtenidas en un espectrofotómetro marca ThermoSpectronic (Vis-UV).

6.2.2. BIOENSAYO CON MTT: CITOTOXICIDAD

Las células fueron incubadas en placas para cultivo celular de 96 pozos y a cada pozo se le adicionó 100 μ L de medio con una densidad celular de 50,000 células/mL, 24 horas después se retiró el medio y se adicionó 100 μ L de medio sin suero fetal bovino (SFB). Posteriormente, se adicionó 100 μ L de la disolución de trabajo y se realizó las respectivas diluciones seriadas (50, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL) con una pipeta multicanal. Las placas se incubaron por 48 h, al término de las mismas se desechó el medio y se adicionaron 100 μ L de medio con 10 μ L de MTT al 0.5% y 20 μ L de PMS (fenil fenazona) al 0.5% como catalizador. Se incubó por 1 hora más a 37 °C. Seguidamente se eliminó el medio de cultivo y se añadió 100 μ L de DMSO (100%). Finalmente, se midió la densidad óptica de la disolución a 540 nm usando un espectrofotómetro (Denizot *et al.*, 2003). La inhibición del crecimiento se determinó usando la siguiente fórmula: $[(D.O \text{ control} - D.O \text{ extracto})/D.O \text{ control}] \times 100$.

6.2.3. BIOENSAYO CON SRB: ANTIPROLIFERATIVO

Las células fueron incubadas en placas para cultivo celular de 96 pozos y a cada pozo se le adicionó 100 μ L de medio con una densidad celular de 50,000 células/mL, 24 horas después se retiró el medio y se adicionó 100 μ L de medio con SRB al 10%. Posteriormente, se adicionó 100 μ L de la disolución de trabajo y se realizaron las respectivas diluciones seriadas (50, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL) con una pipeta multicanal. Las placas se incubaron por 48 h. Al término del tiempo se desechó el medio y se fijaron las células con 50 μ L de ácido tricloroacético al 10%, conservándolas a 4 °C por 30 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante, para después adicionar 50 μ L de SRB (0.1% SRB en ácido acético al 1%) dejándolas por 15 min. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se lavó 4 veces con ácido acético al 1%. La tinción se solubilizó con 200 μ L de tris-base (10 mM) y posteriormente se midió la densidad óptica de la disolución a 540 nm usando un espectrofotómetro (Skehan *et al.*, 1990). La inhibición de la proliferación celular se determinó usando la siguiente fórmula: $[(D.O \text{ control} - D.O \text{ extracto})/D.O \text{ control}] \times 100$. Cada concentración fue evaluada por duplicado y cada experimento por triplicado.

6.2.4. ANÁLISIS DE DATOS

Las mortalidades medias fueron procesadas en el programa estadístico Graphpad Prism (versión 5), para determinar la concentración citotóxica (CC_{50}) e inhibitoria (CI_{50}) media de cada compuesto. El compuesto que presente una CI_{50} o $CC_{50} \leq 10 \mu M$ será considerado activo según lo sugerido por Bugelski *et al.* (2000). Adicionalmente, el nivel de daño hacia las células normales fue establecido, determinando el índice de selectividad (IS) de cada compuesto; éste fue calculado como el rango de citotoxicidad de la línea normal entre la citotoxicidad de la línea cancerígena (Mena-Rejón *et al.*, 2009). Un compuesto es considerado selectivo cuando su $IS \geq 10$ (Vonhron-Sénécheau *et al.*, 2003). Por último, se calculó la razón entre la actividad citotóxica y la actividad antiproliferativa (C/A), lo anterior con el fin de conocer la tendencia del mecanismo de acción de cada compuesto. Un $C/A \leq 1$ indica un mecanismo esencialmente citotóxico, un $C/A \geq 10$ indicará un mecanismo básicamente antiproliferativo.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Los resultados de la actividad citotóxica e IS (índice de selectividad) de los compuestos sobre las cinco líneas celulares utilizando el bioensayo de MTT son mostrados en la Tabla 6.1. Como se puede observar, de los compuestos aislados de *A. fascicularis* el compuesto IX identificado como secundiflorol G demostró tener moderada actividad y selectividad hacia las líneas celulares Hela ($CC_{50} = 23 \mu M$, $IS = 3.6$), KB ($CC_{50} = 15 \mu M$, $IS = 5.6$) y Hep-2 ($CC_{50} = 11 \mu M$, $IS = 7.6$), así mismo, el compuesto IV (isocordoína) mostró una baja actividad y no tuvo selectividad hacia las líneas celulares KB ($CC_{50} = 27 \mu M$, $IS = 0.5$) y Hep-2 ($CC_{50} = 20 \mu M$, $IS = 0.7$).

De esta manera, se puede concluir que los compuestos que le confieren propiedades citotóxicas tanto al extracto metanólico como a la fracción hexánica de la raíz de *A. fascicularis* son los compuestos secundiflorol G y en menor medida isocordoína (Tabla 6.2).

Tabla 6.1. Actividad citotóxica de los compuestos obtenidos de *A. fascicularis*

Compuesto	Líneas celulares CC ₅₀ µM (IS)				
	MDCK	HeLa	Hep-2	KB	SiHa
Compuesto IV	14.0	—	20.0 (0.7)	27.0 (0.5)	—
Compuesto V	—	—	—	—	—
Compuesto V acetilado	63.0	11.5 (5.5)	40.1 (1.6)	47.0 (1.3)	27.0 (2.3)
Compuesto V metilado	67.5	42.2 (1.6)	—	—	45.0 (1.5)
Compuesto VI	245.0	—	—	114.4	—
Compuesto VI acetilado	1751.0	1374.0 (1.3)	—	86.0 (20.4)	205.0 (8.5)
Compuesto VI metilado	389.2	613.2 (0.6)	—	84.0 (4.6)	148.3 (2.6)
Compuesto VII	—	—	—	—	—
Compuesto VIII	—	—	—	—	—
Compuesto IX	83.4	23.0 (3.6)	11.0 (7.6)	15 (5.6)	41.3 (2.0)
Docetaxel	1.4	0.25 (5.6)	0.1 (14)	0.3 (4.6)	0.22 (6.3)

CC₅₀ = concentración citotóxica media; IS = índice de selectividad; — = >60 µM

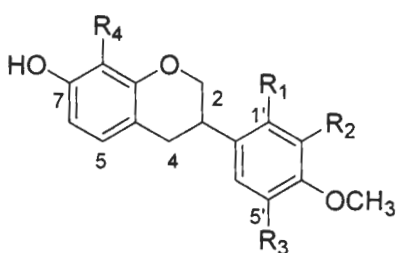
Tabla 6.2. Comparación de la actividad citotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *A. fascicularis*

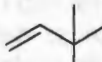
Compuesto	Líneas celulares CC ₅₀ µg/mL (IS)				
	MDCK	HeLa	Hep-2	KB	SiHa
Extracto metanólico	18.3	16.7 (1.1)	—	11 (1.3)	—
Fracción hexánica	175.4	18.9 (9.3)	—	—	—
Compuesto M	4.2	—	6.1 (0.7)	8.2 (0.5)	16.3 (0.3)
Compuesto IX	29.7	8.1 (3.7)	3.9 (7.6)	5.3 (5.6)	14.7 (2.0)

CC₅₀ = concentración citotóxica media; IS = índice de selectividad; — = >20 µg/mL

Este es el primer reporte de la actividad biológica del compuesto secundiflorol G, siendo este trabajo una aportación hacia la farmacología de esta molécula. Sin embargo, ha sido reportada previamente la actividad citotóxica de varios isoflavanos análogos a esta molécula (Tabla 6.3). Resulta particularmente interesante la actividad que presentan algunos de estos compuestos en líneas de cáncer de boca, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo con secundiflorol G hacia líneas KB y Hep-2. Dado los resultados de este estudio, así como los obtenidos en otros trabajos, se propone el posible potencial de secundiflorol G en la quimioterapia del cáncer oro-laríngeo. Así mismo, esta molécula podría ser usada como una molécula marcadora para la estandarización de un posible fitofármaco de *A. fascicularis*. La Tabla 6.3 muestra la estructura y la actividad reportada para isoflavanos análogos del secundiflorol G. Realizando un breve análisis estructura-actividad se puede deducir lo siguiente: la sustitución de un hidroxilo o metoxilo en posición 2' es importante para la actividad citotóxica; de la misma manera, la no sustitución en posición 4' favorece dicha actividad; la presencia de grupos adicionales en posición 8 no parece afectar significativamente la actividad observada. Lo anterior destaca la importancia de realizar estudios de estructura-actividad en derivados sintéticos de secundiflorol G con el fin de aumentar la potencia y selectividad de esta molécula.

Tabla 6.3. Actividad citotóxica de compuestos análogos del secundiflorol G.

Compuesto	Actividad en líneas celulares CC ₅₀ (μM)
 <p data-bbox="391 1209 957 1310">7-Hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavan; R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃, R₄ = OCH₃.</p>	Activo en líneas KB (10.1) ^a
5'-Metoxi-duartina; R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OCH ₃ .	Activo en líneas KB (8.3) ^a
Isoduartina; R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₃ , R ₃ = H, R ₄ = OCH ₃ .	Activo en líneas KB (8) ^a

5'-Metoxi-vestitol ; R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = H.	Inactivo en células MES-SA/DX5, HCT15 y HTC15/CL02 ^b
Mucronulatol ; R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = H, R ₄ = H.	Activo en líneas MES-SA/DX5 (6), HCT15 (12.2) y HTC15/CL02 (12.2) ^b
 Secundiflorol G ; R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₃ = R, R ₄ = H.	Activo en líneas KB (15) y Hep-2 (11) ^c

^a Dtos obtenidos por Alvarez *et al.*, 1998.

^b Datos obtenidos por Choi *et al.*, 2009.

^c Datos obtenidos en este estudio.

MES-SA = Sarcoma uterino humano.

MES-SA/Dx5 = Sarcoma uterino humano multi-farmacorresistente.

HCT-15 = Adenocarcinoma de colon humano.

HCT-15/CL02 = Adenocarcinoma de colon humano multi-farmacorresistente.

Con respecto a la isocordofina, han sido documentados reportes de su actividad citotóxica en líneas de cáncer humano de ovario, próstata y leucemia (Borges *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2009). Principalmente, esta molécula ha sido activa contra los parásitos *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* (Borges *et al.*, 2009). En el presente trabajo se contribuyó con el estudio citotóxico de isocordofina en líneas Hep-2, HeLa y SiHa, en las cuales esta molécula no había sido probada.

Muy interesante fue observar la moderada actividad del derivado acetilado de la espinochalcona C hacia la línea celular HeLa (CC₅₀ = 11.5 μM, IS = 5.5), en tanto que la molécula molde no presenta actividad citotóxica en ninguna línea celular. Lo anterior indica que la acetilación favorece la actividad citotóxica de esta molécula. Trabajos realizados por Borges *et al.* (2009) y Liu *et al.* (2001) señalan que la actividad biológica de las chalconas evaluadas es favorecida si los grupos hidroxilo son alcoxilados o acilados. Asociado a lo anterior, Liu *et al.* (2001) proponen que los derivados acilados son más lipofílicos que los hidroxilados, logrando de esta manera atravesar más fácilmente las membranas biológicas y aumentando la biodisponibilidad del compuesto. Además, Landis *et al.* (2007) lograron demostrar la estabilidad de los derivados bajo condiciones alcalinas de pH; así mismo, documentaron la capacidad que tienen las células de metabolizar los derivados acetilados y acumularlos como compuestos hidroxilados en el interior de las mismas. Probablemente la actividad observada con el

análogo acetilado se deba a la mayor disponibilidad de este compuesto dentro de las células.

Aún no se conoce el mecanismo de acción por el cual estas moléculas podrían estar ejerciendo su acción citotóxica. Existen reportes de flavonoides, cuyo principal mecanismo de acción es la apoptosis (Iwashita *et al.*, 2000; Brusselmans *et al.*, 2005). Más aún, Sabzevari *et al.* (2004) describen en compuestos de tipo chalcona un mecanismo de toxicidad por radicales libres. Aunado a lo anterior, se ha elucidado como principal mecanismo de acción de las chalconas la inducción de apoptosis *in vitro* e *in vivo* a través de la vía mitocondrial dependiente de caspasa 9 (Tabata *et al.*, 2005; Zi & Simoneau, 2005; Nishimura *et al.*, 2007). Por consiguiente, el mecanismo por el cual isocordoína y espinochalcona C ejercen su acción citotóxica podría ser la apoptosis mediada por la vía dependiente de caspasa 9. Por el contrario, el mecanismo por el cual los isoflavanos ejercen su mecanismo de citotoxicidad no está muy bien elucidado. Sería importante elucidar el mecanismo de acción del secundiflorol G, así como de las chalconas isocordoína y espinochalcona C.

6.3.2. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

Los resultados de la actividad antiproliferativa e IS (índice de selectividad) de los compuestos sobre las cinco líneas celulares utilizando el bioensayo de SRB son mostrados en la Tabla 6.4. Contrastando con lo observado en la actividad citotóxica, sólo se observa moderada actividad antiproliferativa del compuesto IV (espinochalcona A) y sus derivados sintéticos. El compuesto natural espinochalcona A fue moderadamente activo y selectivo hacia células KB ($IC_{50} = 16.0 \mu M$ y $IS = 3.1$, respectivamente). No existen reportes de la actividad biológica de esta molécula, constituyendo este estudio una aportación a la actividad biológica de este compuesto.

La espinochalcona A es el compuesto más abundante presente en la fracción hexánica de raíces de *A. fascicularis*, representando aproximadamente un 30% de la fracción total, esto podría ser aprovechado para ser desarrollado como una posible molécula marcadora (en conjunto con el secundiflorol G) para estandarizar un fitofármaco. Aunado a lo anterior, destaca el interesante efecto antiproliferativo que esta molécula presenta hacia la línea celular KB, constituyendo un valor agregado al desarrollo de un fitofármaco para el tratamiento de cáncer oro-faríngeo. En la actualidad, en la terapéutica del cáncer se usan varios fármacos citotóxicos que actúen de forma sinérgica, con el fin de aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas. Sin embargo, esto trae consigo un incremento en la toxicidad hacia las células sanas, aumentando los

efectos adversos y disminuyendo la calidad de vida de los pacientes (Caribé *et al.*, 2003). Lo anterior, destaca la utilidad que tendría un fitofármaco con dos moléculas: una citocida (secundiflorol G) y otra citostática (espinochalcona A), proporcionando de esta forma una mayor efectividad.

Cuando se realizaron derivatizaciones a la molécula de espinochalcona A, no se observó diferencias en la actividad antiproliferativa hacia células KB, entre la molécula molde y sus análogos (Tabla 6.4). Sin embargo, se pudo constatar que ambos derivados presentaban actividad adicional en las líneas SiHa y HeLa. Tanto el derivado metilado como el acetilado mostraron ser moderadamente activos frente a la línea celular SiHa, con IC_{50} de 15.6 y 15.2 μM , respectivamente, pero sólo el análogo acetilado mostró una relevante actividad y moderada selectividad hacia células HeLa ($IC_{50} = 9.0 \mu M$, $IS = 3.0$). La potente actividad del análogo acetilado podría explicarse con la teoría del pro fármaco propuesta por Landis *et al.* (2007), la cual ha sido discutida previamente para el análogo acetilado de espinochalcona C. Sin embargo, siguiendo esta propuesta, en el presente trabajo se esperaría que esta molécula no presentara potente actividad hacia la línea celular HeLa, sino, que fuera más activa contra la línea celular KB. La explicación de este inesperado resultado podría ser: 1) la molécula acetilada no es rápidamente degradada o expulsada de las células HeLa, tal y como ocurre por acción de diversas enzimas (glutación-transferasa) y bombas de salida de fármacos (glicoproteínas P); 2) el análogo acetilado tiene una alta selectividad hacia esta línea celular y por consiguiente podría poseer un singular mecanismo de acción.

Tabla 6.4. Actividad antiproliferativa de los compuestos obtenidos de *A. fascicularis*

Compuesto	Líneas celulares IC ₅₀ μM (IS)				
	MDCK	HeLa	Hep-2	KB	SiHa
Compuesto IV	103.3	---	125.2 (0.8)	ND	---
Compuesto V	---	---	---	---	---
Compuesto V acetilado	100.0	83.3 (1.2)	---	ND	25.2 (4.0)
Compuesto V metilado	110.1	92.0 (1.1)	---	---	36.3 (3.0)
Compuesto VI	50.0	---	---	16.0 (3.1)	---
Compuesto VI acetilado	27.0	9.0 (3.0)	---	13.5 (2)	15.2 (1.8)
Compuesto VI metilado	26.0	17.3 (1.5)	---	16.0 (1.7)	15.6 (1.7)
Compuesto VII	---	---	---	---	---
Compuesto VIII	---	---	---	---	---
Compuesto IX	72.0	97.0 (0.7)	108.8 (0.6)	ND	60.0 (1.2)
Docetaxel	0.14	0.04 (3.5)	0.07 (2)	0.06 (2.3)	0.1 (1.4)

IC₅₀ = concentración inhibitoria media; IS = índice de selectividad; --- = > 50 μM; ND = No determinado.

Con respecto a la relación C/A, se encontró que los tres compuestos más activos (la isocordofina, el secundiflorol G y el derivado acetilado de la espinochalcona C) presentan una marcada tendencia hacia un mecanismo general de citotoxicidad en las líneas celulares en las cuales presentaron actividad con una C/A < 1 (Tabla 6.5). En tanto que la relación C/A para la espinochalcona A y sus dos análogos semisintéticos muestran una marcada tendencia hacia un mecanismo puramente antiproliferativo (C/A > 10) en líneas de cáncer cervicouterino (Tabla 6.5) y una moderada C/A < 10 en líneas celulares KB.

Tabla 6.5. Relaciones selectas entre la actividad citotóxica/antiproliferativa (C/A) de los compuestos evaluados.

Compuesto	Líneas celulares: Relación C/A				
	MDCK	HeLa	Hep-2	KB	SiHa
Compuesto IV	0.1	—	0.1	—	—
Compuesto V	0.6	0.1	—	—	1.1
Compuesto V acetilado	0.6	0.4	—	—	1.3
Compuesto V metilado	5.0	—	—	7.1	—
Compuesto VI	65.0	153.0	—	6.4	14.0
Compuesto VI acetilado	15.0	35.4	—	5.3	10.0
Compuesto VI metilado	1.1	0.2	0.1	—	0.6
Docetaxel	10	6.6	1.3	4.6	2.3

— = no calculado.

Con respecto a lo anterior, las líneas celulares SiHa y HeLa se caracterizan por contener ADN del virus de papiloma humano (VPH) en su genoma. El genoma del VPH expresa las proteínas oncogénicas E6 y E7; estas proteínas inhiben a las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb, respectivamente. Una alta incidencia de carcinogénesis por los VPH tipo 16 y 18 (VPH-16 y VPH-18, respectivamente) ha sido descrita. El ADN del VPH-16 se encuentra insertado de 1 a 2 veces en el genoma de las líneas celulares SiHa; así mismo, en estas líneas tanto la p53 como la pRb se encuentran constitutivamente inhibidas. En tanto, el VPH-18 comúnmente se encuentra insertado entre 10-50 copias de ADN viral en las líneas celulares HeLa, y a diferencia de las líneas celulares SiHa, sólo la proteína p53 se encuentra constitutivamente inhibida (Boshart *et al.*, 1984; Yee *et al.*, 1985; Woodworth *et al.*, 1988; Scheffner *et al.*, 1991; Ganguly & Parihar., 2009).

Además de lo anterior, ciertas características hacen singulares a las líneas celulares HeLa, entre las que se encuentra: el uso de glutamina como principal fuente de carbono (Reitzer *et al.*, 1979) y la alta inserción de material viral en regiones frágiles del genoma celular que codifican normalmente para el proto-oncogén c-myc (Macville *et al.*, 1999). Esta alta

inserción a fragmentos frágiles hace más propensa la delección del cromosoma y por consiguiente se ha observado una sobreexpresión del oncogén c-myc. El oncogén c-myc está altamente relacionado con cáncer de cérvix, y su expresión conlleva a una alta tasa de proliferación celular (por activación de factores mitógenos) y una baja respuesta a la apoptosis (por inhibición de proteínas proapoptóticas) (Ocadiz *et al.*, 1987; Hanahan & Weinberg, 2000). Los datos anteriores, en conjunto con la actividad antiproliferativa hacia células HeLa exhibida en este estudio por el análogo acetilado de la espinochalcona A, sugieren la posibilidad de que este derivado inhiba la expresión de c-myc y/o proteínas relacionadas con la proliferación celular. También, este compuesto podría estar relacionado con la inhibición en la degradación de p53 por parte de las proteínas oncogénicas E6. Con base en lo anterior, se propone elucidar el mecanismo de acción del análogo acetilado de la espinochalcona A dirigido hacia las proteínas c-myc y p53.

Compuesto	IC50 (nM)	IC50 (μM)	IC50 (nM)	IC50 (μM)	Actividad
1	—	—	47	0.047	inhibición de proliferación
2	13	—	—	0.013	inhibición de proliferación
3	1.8	—	0.0018	0.00018	inhibición de proliferación
4	0.01	—	0.00001	0.0000001	inhibición de proliferación
5	—	0.01	—	—	inhibición de proliferación
6	0.01	0.01	0.01	0.01	inhibición de proliferación

El estudio de la actividad antiproliferativa de los compuestos 1-6 se realizó en células HeLa. Los resultados mostraron que los compuestos 1-6 inhibieron el crecimiento celular de manera dosis-dependiente. El compuesto 1 presentó la mayor actividad antiproliferativa, con un IC50 de 47 nM. Los compuestos 2-6 también mostraron actividad antiproliferativa, con IC50 de 13 nM, 1.8 nM, 0.01 nM, 0.01 nM y 0.01 nM, respectivamente. Estos resultados sugieren que los compuestos 1-6 podrían ser útiles como agentes antiproliferativos en el tratamiento del cáncer de cérvix.

El estudio de la actividad antiproliferativa de los compuestos 1-6 se realizó en células HeLa. Los resultados mostraron que los compuestos 1-6 inhibieron el crecimiento celular de manera dosis-dependiente. El compuesto 1 presentó la mayor actividad antiproliferativa, con un IC50 de 47 nM. Los compuestos 2-6 también mostraron actividad antiproliferativa, con IC50 de 13 nM, 1.8 nM, 0.01 nM, 0.01 nM y 0.01 nM, respectivamente. Estos resultados sugieren que los compuestos 1-6 podrían ser útiles como agentes antiproliferativos en el tratamiento del cáncer de cérvix.

6.4. CONCLUSIONES

En el bioensayo de citotoxicidad los compuestos evaluados no revelaron actividad significativa. En el bioensayo antiproliferativo los compuestos espinochalcona A y sus análogos mostraron moderada actividad contra las líneas KB, HeLa y SiHa y el secundiflorol G lo hizo contra las líneas KB, Hep-2 y SiHa.

6.5. REFERENCIAS

- Alvarez, L., Rios, M.Y., Esquivel, C., Chávez, M.I., Delgado, G., Aguilar, M.I., Villarreal, M.L., Navarro, V. (1998). Cytotoxic isoflavans from *Eysenhardtia polystachya*. *Journal of Natural Products* 61, 767-770.
- Boshartb, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The European Molecular Biology Organization Journal* 3, 1151-1157.
- Borges-Argáez, R., Balnburry, L., Flowers, A., Giménez-Turba, A., Ruiz, G., Waterman, P.G., Peña-Rodríguez, L.M. (2007). Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. *Phytomedicine* 14, 530-533.
- Borges-Argáez, R., Vela-Catzín, T., Yam-Puc, A., Chan-Bacab, M., Moo-Puc, R.M., Cáceres-Farfán, M. (2009). Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. *Planta Medica* 75, 1336-1338.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 5636-5645.
- 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 *in vitro* models. *Pharmaceutical Research* 17, 1265-1272.

apia y quimioterapia

Cárispe, F., Chimenos, E., López, J., y otros.
odontológico de las complicaciones de la radioterapia

- Iwashita, K., Kobori, M., Yamaki, K., Tsushida, T. (2000). Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1813-1820.
- Landis-Piwowar, K.R., Huo, K., Chen, D., Milacic, V., Shi, G., Chan, T.H., Dou, Q.P. (2007). A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Research* 67, 4303-4310.
- Liu, M., Wilairat, P., Go, M.L. (2001). Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 4443-4452.
- Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* 59, 141-150.
- Nishimura, R., Tabata, K., Arakawa, M., Ito, Y., Kimura, Y., Akihisa, T., Nagai, H., Sakuma, A., Kohno, H Suzuki, T. (2007). Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30, 1878-1883.
- Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., Graef, A.M., Ganglio, P. (1987). High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Research* 47, 4173-4177.
- Pluma, J. A., Milroy, R., Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research* 15, 4435-4440.
- Rahman, A., Choudhary, M.L., Thonsen, W.J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*; Harwood Academic Publishers, USA, pp 28-29.
- Reitzer, L.J., Wice B.M., Kennell D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* 254, 2669-2676.
- Sabzevari, O., Galati, G., Moridani, M.Y., Siraki, A., O'Brien, P.J. (2004). Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-Biological Interactions* 148, 57-67.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C., Howley, P.M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5523-5527.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd M. R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. 1990, 82, 1107-1112.
- Tabata, K., Motani, K., Takayanagi, N., Nishimura, R., Asami, S., Kimura, Y., Ukiya, M., Hasegawa, D., Akihisa, T., Suzuki, T. (2005).

- Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1404-1407.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine* 110, 39-48.
- Woodworth, C.D., Bowden, P.E., Doniger, J., Pirisi, L., Barnes, W., Lancaster, W.D., DiPaolo, J.A. (1988). Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized *in vitro* by papilloma virus types 16 and 18 DNA. *Cancer Research* 48, 4620-4628.
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R., Howley, P.M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American Journal of Pathology* 119, 361-366.
- Zi, X., Simoneau, A.R. (2005). Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Research* 65, 3479-3486.

Capítulo VII

7.1. CONCLUSIONES GENERALES

- En este estudio se describe la actividad citotóxica de 21 plantas medicinales seleccionadas de acuerdo a sus usos en el tratamiento de síntomas sugerentes de cáncer. Aproximadamente un 50% del total de las plantas evaluadas tienen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano. Los resultados obtenidos promueven el uso de la etnomedicina en la cura de síntomas sugerentes a cáncer entre la población. Así mismo, se corrobora que el uso de la Etnobotánica es una exitosa estrategia para encontrar posibles plantas, de las que se podrían aislar moléculas activas contra algún tipo de cáncer.
- Las fracciones hexánicas de raíces de las plantas *Bonellia macrocarpa* y *Aeschynomene fascicularis* tienen una prometedora actividad citotóxica en líneas de cáncer humano.
- De *Bonellia macrocarpa* se aisló un nuevo catechol denominado bonediol, el cual es responsable de la actividad biológica presentada por esta planta, el cual puede ser usado como un posible marcador en la estandarización de un fitomedicamento.
- Se aislaron seis flavonoides de la planta *Aeschynomene fascicularis*, tres del tipo chalcona, un isoflavano y dos pterocarpanos, siendo uno de ellos nuevo (aeschynocarpina). Los compuestos isocordoina y secundiflorol G confieren a esta planta la actividad citotóxica observada. Por lo tanto, ambos compuestos son idóneos para ser utilizados como marcadores de la actividad biológica de esta especie vegetal.
- Los derivados semisintéticos de espinochalcona A inhibieron la proliferación de líneas de cáncer de cérvix.

7.2. PERSPECTIVAS

- Con base en los resultados obtenidos se propone elucidar el mecanismo de acción citotóxico y/o estudios en modelos de cáncer *in vivo* de los compuestos isocordofina y secundiflorol G.
- La actividad antiproliferativa específica de los compuestos bonediol, espinochalcona A y su derivado acetilado resulta muy interesante, dada la potencial aplicación que estos compuestos podrían tener en la terapéutica del cáncer. Por lo tanto, se propone investigar el posible mecanismo de acción antiproliferativo y/o estudios en modelos de cáncer *in vivo* de las tres moléculas.
- Dado que se conoce el/los compuestos activos de las plantas *Bonellia macrocarpa* y *Aeschynomene fascicularis* es posible estandarizar los extractos orgánicos de ambas plantas, para aplicarlas como fitomedicamentos.
- Dada la sobresaliente actividad presentada por el derivado acetilado de espinochalcona A, se sugiere la obtención de más derivados de esta molécula, con la finalidad de realizar estudios de QSAR y observar si la actividad aumenta y/o disminuye la toxicidad a células normales.

