



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**SESQUITERPENOIDES AISLADOS DE *DIOSPYROS*  
*ANISANDRA* Y SU EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER**

Tesis que presenta

**ANA LAURA ARJONA CANUL**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán Octubre 2011





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



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Sesquiterpenoides aislados de *Diospyros anisandra* y su evaluación citotóxica en líneas celulares de cáncer" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela  
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.



Mérida, Yucatán, México; a 21 de Octubre de 2011

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., y que ha 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 A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Ana Laura Arjona Canul



## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por prestarme estos años de vida y permitir realizarme tanto profesionalmente como personalmente.*

*A mis asesoras de tesis: Dra. Rocío Borges y Dra. Rosi Moo; por sus consejos, comprensión y apoyo otorgados, que me permitieron aprender muchas cosas, tanto en conocimiento científico como en la formación de mi carácter.*

*A mis revisores: Dr. Sergio Peraza, Dr. Felipe Barahona y Dr. Gumersindo Mirón, por su valioso tiempo concedido para la revisión de la tesis.*

*A mi familia: Papá, Mamá, Frans y Mary; que siempre me apoyaron y comprendieron todas las horas de fuera de casa. A mi querido sobrino, Antonio, por recordarme lo que es ser niño y así relajarme jugando con él.*

*A mis amigos, especialmente a los nuevos que conocí durante mis estudios: Fabiola, Nelly y Leonel; por el apoyo, los consejos y pláticas que tuvimos, las cuales fueron enriquecedoras ya que aprendí algo nuevo y bueno de cada uno de ellos.*



*Al mejor de mis amigos y novio: Pablo, por estar siempre cuando lo necesito, por su comprensión, consejos y, sobre todo, por el amor que me ha entregado.*

*A los compañeros y técnicos del laboratorio del CICY: Abril, Ana Lilia, Andrés, Ángel, Arely, Azu, Carlos, Edgar, Fabiola, Leonel, Lilian, Mateo, Nacho, Pablo, Luisito, Bella, Ale y Lety; por la compañía, apoyo y consejos brindados. Especialmente, agradezco a Andrés y Edgar, que gustosamente me transmitieron sus conocimientos para que pudiera sacar adelante la parte experimental de la tesis.*

*A los compañeros de laboratorio y seminarios del IMSS-T1: Carlos, Dianela, Edgar, Jhon, Juan, Lilian, Lorena y Teresita; por todos los consejos y apoyo otorgados.*

*Al personal de posgrado que gustosamente atendieron mis dudas y comentarios, para así realizar adecuadamente todos los procedimientos académicos necesarios durante la maestría.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca No. 235998 otorgada para los estudios de maestría, así como por el apoyo para el Proyecto Ciencia Básica (clave 60357) al que perteneció la tesis realizada.*



## ÍNDICE

	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	v
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b>	3
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES GENERALES	6
2.1 CÁNCER	6
2.2 SESQUITERPENOIDES	13
2.3 GÉNERO DIOSPYROS	23
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	26
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
6. REFERENCIAS	28
<b>CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES DE LA CORTEZA DE <i>DIOSPYROS</i> <i>ANISANDRA</i></b>	35
1. INTRODUCCIÓN	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES	36
2.2 MATERIAL VEGETAL	37
2.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS	37
2.4 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS A1 Y A2	38
3. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES	40
3.1 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 1	40

---

3.2 PURIFICACION DEL COMPUESTO 2	41
3.3 PURIFICACION DEL COMPUESTO 3	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5. CONCLUSIONES	68
6. REFERENCIAS	69
<b>CAPÍTULO III. EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES AISLADOS DE <i>DIOSPYROS ANISANDRA</i></b>	71
1. INTRODUCCIÓN	71
2. MATERIALES Y MÉTODOS	74
2.1 CULTIVO CELULAR	74
2.2 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON SRB	74
2.3 ÍNDICE DE SELECTIVIDAD	75
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4. CONCLUSIÓN	78
5. REFERENCIAS	79
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</b>	81
1. DISCUSIÓN GENERAL	81
2. CONCLUSIONES GENERALES	82
3. PERSPECTIVAS	82
4. REFERENCIAS	84

---

**ABREVIATURAS**

$\delta$	Desplazamiento de señales de RMN en ppm
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica empleando línea D de sodio a una determinada temperatura
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
Bz	Benceno
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCG	Cromatografía en columna por gravedad
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica media
CE	Cromatografía de exclusión
CF	Cromatografía flash
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CLV	Cromatografía líquida al vacío
COSY	Resonancia bidimensional de correlación homonuclear
HeLa	Línea celular de carcinoma cervicouterino humano
Hep-2	Línea celular de cáncer orofaríngeo humano
HMBC	Resonancia bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces
HSQC	Resonancia bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace
Hx	Hexano
IR	Espectroscopia de infrarrojo
IS	Índice de selectividad
$J$	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata humano
PP	Placa preparativa
Rf	Factor de retención en CCD
RMN-H <sup>1</sup>	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN-C <sup>13</sup>	Resonancia magnética nuclear de carbono

ROESY	Resonancia bidimensional del efecto Overhauser en el marco de rotación molecular
SRB	Sulforodamina B
T <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Vero	Línea celular epitelial de riñón normal de mono

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura de algunos agentes alquilantes.	9
Figura 2	Estructura de algunos antimetabolitos.	10
Figura 3	Estructura de algunos inhibidores de topoisomerasas.	11
Figura 4	Estructura de un inhibidor de microtúbulos.	11
Figura 5	Esqueletos estructurales de compuestos tipo sesquiterpénico encontrados en plantas.	14
Figura 6	Estructuras químicas de algunas sesquiterpen-lactonas.	15
Figura 7	Estructura de algunos sesquiterpenos citotóxicos.	21
Figura 8	Género <i>Diospyros</i> spp.	23
Figura 9	Estructura de los sesquiterpenos encontrados en la especie <i>D. anisandra</i> .	24
Figura 10	Diagrama de la estrategia experimental.	27
Figura 11	CCD de los extractos A1 y A2 de <i>D. anisandra</i> .	38
Figura 12	CCD de las fracciones de la CLV del extracto A1.	39
Figura 13	CCD de las fracciones de la CLV del extracto A2.	40
Figura 14	Proceso de purificación del compuesto 1.	41
Figura 15	Proceso de purificación del compuesto 2.	42
Figura 16	Proceso de purificación del compuesto 3.	44
Figura 17	Cromatograma de gases del compuesto 1.	45
Figura 18	Estructura del compuesto 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.	46
Figura 19	Espectro de IR del compuesto 1.	46
Figura 20	Espectro de fragmentación de masas del compuesto 1.	47
Figura 21	Espectro de RMN-H <sup>1</sup> del compuesto 1 con la estructura del compuesto 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando los protones de las señales características.	48
Figura 22	Espectro de RMN-C <sup>13</sup> del compuesto 1 con la estructura del compuesto 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando los carbonos de cada señal.	49

---

<b>Figura 23</b>	Ampliaciones del espectro de HSQC del compuesto 1 con la estructura del compuesto <i>7-epi-selin-4(15)-en-1<math>\beta</math>,11-diol</i> indicando las asignaciones de protones y carbonos.	50
<b>Figura 24</b>	Ampliaciones del espectro de HMBC del compuesto 1 con la estructura del compuesto <i>7-epi-selin-4(15)-en-1<math>\beta</math>,11-diol</i> indicando las correlaciones de los protones con carbonos.	52
<b>Figura 25</b>	Espectro de COSY del compuesto 1 con la estructura del compuesto <i>7-epi-selin-4(15)-en-1<math>\beta</math>,11-diol</i> indicando acoplamientos entre protones.	54
<b>Figura 26</b>	Estructura del isómero <i>selin-4(15)-en-1<math>\beta</math>,11-diol</i> .	55
<b>Figura 27</b>	Ampliación del espectro de ROESY del compuesto 1 con la estructura del compuesto <i>7-epi-selin-4(15)-en-1<math>\beta</math>,11-diol</i> indicando correlaciones espaciales entre protones.	57
<b>Figura 28</b>	Cromatograma de gases del compuesto 2.	58
<b>Figura 29</b>	Estructura del compuesto <i>1<math>\beta</math>-hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno</i> .	59
<b>Figura 30</b>	Espectro de IR del compuesto 2.	59
<b>Figura 31</b>	Espectro de fragmentación de masas del compuesto 2.	60
<b>Figura 32</b>	Espectro de RMN- $H^1$ del compuesto 2 con la estructura del compuesto <i>1<math>\beta</math>-hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno</i> indicando las señales de los protones característicos.	61
<b>Figura 33</b>	Cromatograma de gases del compuesto 3.	62
<b>Figura 34</b>	Estructura del compuesto <i>1<math>\beta</math>,6<math>\alpha</math>-dihidroxi-4(15)-eudesmeno</i> .	62
<b>Figura 35</b>	Espectro de IR del compuesto 3.	63
<b>Figura 36</b>	Espectro de fragmentación de masas del compuesto 3.	63
<b>Figura 37</b>	Espectro de RMN- $H^1$ del compuesto 3 con la estructura del compuesto <i>1<math>\beta</math>,6<math>\alpha</math>-dihidroxi-4(15)-eudesmeno</i> indicando las señales de los protones característicos.	64
<b>Figura 38</b>	Espectro de RMN- $C^{13}$ del compuesto 3 con la estructura del compuesto <i>1<math>\beta</math>,6<math>\alpha</math>-dihidroxi-4(15)-eudesmeno</i> indicando las señales de los carbonos.	66

---

<b>Figura 39</b>	<b>Estructura de los sesquiterpenos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i>.</b>	<b>73</b>
<b>Figura 40</b>	<b>Sesquiterpenos citotóxicos similares a los encontrados en <i>D. anisandra</i>.</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	Efectos adversos producidos por la quimioterapia.	12
<b>Cuadro 2</b>	Compuestos sesquiterpénicos obtenidos de plantas y su citotoxicidad en diferentes líneas tumorales humanas.	20
<b>Cuadro 3</b>	Fracciones finales obtenidas del extracto A1 con sus factores de retención (Rf).	38
<b>Cuadro 4</b>	Fracciones finales obtenidas del extracto A2 con sus factores de retención (Rf).	39
<b>Cuadro 5</b>	Datos obtenidos del espectro de HSQC del compuesto 1.	49
<b>Cuadro 6</b>	Datos obtenidos del espectro de HMBC del compuesto 1.	51
<b>Cuadro 7</b>	Datos obtenidos por RMN- $H^1$ y RMN- $C^{13}$ del compuesto 1 y del isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.	55
<b>Cuadro 8</b>	Datos obtenidos por RMN- $H^1$ del compuesto 3 y del 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno.	65
<b>Cuadro 9</b>	Datos obtenidos por RMN- $C^{13}$ del compuesto 3 y del 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno.	67
<b>Cuadro 10</b>	Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i> .	75

---

**RESUMEN**

Uno de los principales problemas de salud humana es el cáncer. Aunque la quimioterapia con citostáticos es la principal elección del tratamiento, ésta no ha demostrado ser eficaz y segura. Además se han descrito problemas de resistencia. Por lo anterior, existe la necesidad de encontrar nuevos agentes terapéuticos para combatir el cáncer, siendo un recurso importante los compuestos aislados de productos naturales, como los sesquiterpenos. Dichos compuestos poseen una gran variedad estructural y propiedades citotóxicas significativas en diferentes líneas celulares humanas de cáncer. Los compuestos sesquiterpénicos se han encontrado en especies del género *Diospyros*. Tomando en cuenta el potencial de los sesquiterpenoides, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar sesquiterpenos de la corteza de *Diospyros anisandra*, así como evaluar su efecto citotóxico en varias líneas celulares de cáncer.

Los sesquiterpenos fueron obtenidos mediante una maceración de la corteza con diclorometano, seguida de fraccionamientos cromatográficos. Posteriormente, éstos se elucidaron mediante técnicas espectroscópicas de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. La citotoxicidad fue evaluada utilizando el método de sulforodamina B sobre tres líneas celulares de cáncer humano: cervicouterino (HeLa), orofaríngeo (Hep-2) y prostático (PC-3), así como una línea celular normal epitelial de riñón de mono (Vero). El efecto citotóxico se expresó como concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) y se consideró significativo un valor  $\leq 5$  µg/mL.

Tres compuestos sesquiterpénicos, identificados como 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol, 1β,6α-dihidroxi-4(15)-eudesmeno y 1β-hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno, se aislaron de la corteza de *D. anisandra*. El 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol, el 1β,6α-dihidroxi-4(15)-eudesmeno y otro compuesto previamente aislado, el selin-4(15)-en-1β,11-diol, no poseen actividad citotóxica significativa en las líneas celulares evaluadas (HeLa, Hep-2, PC-3 y Vero), ya que presentaron CC<sub>50</sub> mayores a 5 µg/mL (22 µM).

**ABSTRACT**

Cancer is one of the major human health problems. Although chemotherapy with cytostatics is the main choice of treatment, these have not proved to be effective and safe. In addition, resistance problems have been reported. So, there is a need to discover new agents for cancer treatment. Compounds isolated from natural products, such as sesquiterpenoids, are important resources to be tested. These compounds have a large structural variety and significant cytotoxic properties in several human cancer cell lines. Sesquiterpene compounds have been found in species of the genus *Diospyros*. Considering the potential of sesquiterpenoids, the aims of this study were the purification and structural elucidation of sesquiterpenes from the stem bark of *Diospyros anisandra*, and the evaluation of their cytotoxic effect on several cancer cell lines.

The sesquiterpenes were obtained by maceration from the stem bark with dichloromethane followed by chromatographic fractionation. The structures were elucidated by the application of infrared, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopic analyses and by comparison with the literature data. The compounds were tested for their cytotoxicity using the sulforhodamine B assay performed on three cancer human cell lines: cervix adenocarcinoma (HeLa), laryngeal carcinoma (Hep-2) and prostate adenocarcinoma (PC-3), as well as a normal monkey kidney epithelial cell line (Vero). The cytotoxic effect was expressed as half cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) and considered significant  $\leq 5 \mu\text{g/mL}$ .

Three sesquiterpenes identified as 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihydroxy-4(15)-eudesmene and 1 $\beta$ -hydroxy-4(15),5*E*,10(14)-germacatriene were isolated from the stem bark of *Diospyros anisandra*. The 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihydroxy-4(15)-eudesmene and other compound previously isolated, selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, showed no significant cytotoxic activity on the cell lines evaluated (HeLa, Hep-2, PC-3 and Vero), with CC<sub>50</sub> > 5  $\mu\text{g/mL}$  (22  $\mu\text{M}$ ).

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

#### 1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte en la población mundial, y tan sólo en 2008 se reportaron 7.6 millones de muertes (aproximadamente 13% del total). El cáncer es una enfermedad maligna que se produce por la proliferación anormal de las células que conlleva a la formación de un tumor y posterior metástasis; este último proceso representa la principal complicación que produce la muerte (WHO, 2011; ACS, 2009; Karp, 2005).

La mayoría de los protocolos de tratamiento del cáncer incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía y radioterapia se emplean sólo para eliminar los tumores que se encuentran localizados en el tejido de origen, por lo que en casos de metástasis se recurre a la quimioterapia. Esta se basa en el empleo de fármacos que son capaces de eliminar las células tumorales que se encuentran en rápido crecimiento, sin embargo no son selectivas y afectan igualmente a células sanas. Los efectos adversos que producen comúnmente son anemia, náuseas, vómitos, fatiga y alopecia. Además, otra desventaja de la quimioterapia es que las células cancerígenas tienen la capacidad de presentar resistencia a los fármacos (ACS, 2011b; Boyle y Levin, 2008; Schulz, 2005).

Los efectos de la quimioterapia del cáncer impulsan la búsqueda de nuevos agentes para el tratamiento de esta enfermedad, siendo un recurso alternativo los productos naturales. Desde tiempos antiguos los humanos reconocieron su dependencia con las plantas para la cura de diferentes enfermedades. Actualmente, se siguen empleando las plantas como un recurso para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Algunos ejemplos de los compuestos que las plantas han proporcionado al hombre son la morfina, un analgésico aislado de *Papaver somniferum*; la reserpina, un antihipertensivo aislado de *Rauvolfia serpentina*; la warfarina, un anticoagulante aislado de *Melilotus officinalis*; varios agentes anti-cancerígenos como el taxol aislado de *Taxus brevifolia*; la vinblastina y

vincristina aisladas de *Catharanthus roseus*, entre otros (Gilani y Rahman, 2005; Kim, 2005; Kong *et al.*, 2003).

En este sentido, en el período comprendido entre 1981-2006 cerca del 50% de los fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) fueron de origen natural o de sus derivados. En el caso de los agentes anti-cancerígenos, durante el período entre 1940-2002, de 140 fármacos aprobados, alrededor de 70 fueron de origen natural o de sus derivados (Newman y Cragg, 2007; Newman *et al.*, 2003).

Diversos grupos de compuestos naturales han sido identificados con potencial para el desarrollo de nuevos agentes para la quimioterapia del cáncer, entre los cuales se encuentran los sesquiterpenoides. Los compuestos de tipo sesquiterpénico que han llamado más la atención por sus efectos contra células cancerígenas son las sesquiterpen-lactonas, las cuales se encuentran en más de 100 familias de plantas y con una gran variedad de estructuras (Fraga, 2006; Zhang *et al.*, 2005; Kinghom *et al.*; 2004).

Varios estudios *in vitro* se han realizado para demostrar el efecto citotóxico de los compuestos sesquiterpénicos, y se ha observado que producen apoptosis en diversas líneas tumorales. Uno de los compuestos más estudiados es el partenólido, con actividad citotóxica sobre células de carcinoma hepatocelular sarcomatoide (SH-J1), carcinoma humano de pulmón (A549) y adenocarcinoma humano de colon (HT-29); con una concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ ) de 7.5  $\mu M$ , 4.3  $\mu M$  y 6.5  $\mu M$ , respectivamente (Parada-Tsuka *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2002).

También, se ha determinado el efecto citotóxico de otros sesquiterpenos en líneas celulares humanas como son: el costunólido, el cual presentó una  $CI_{50}$  de 3.31  $\mu M$  en células B de leucemia (NALM-6), el 1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,6 $\alpha$ -triacetoxi-9 $\alpha$ -benzoiloxi- $\beta$ -dihidroagarofurano presentó una  $CI_{50}$  de 3.89  $\mu M$  contra células de carcinoma cervicouterino (HeLa) y, por último, la mansonona E que tuvo una  $CI_{50}$  de 0.21  $\mu M$  en células de cáncer de mama (MCF-7). Además, otras propiedades observadas en algunos sesquiterpenoides es que poseen cierta selectividad contra las células de cáncer e inocuidad en células normales y

tienen efectos significativos sobre células resistentes a ciertos fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer (Boonsri *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Guzman *et al.*, 2005). En este sentido, el tratamiento quimioterapéutico del cáncer no permite, en muchos casos, la recuperación total del paciente debido a los efectos adversos que se producen, siendo los compuestos sesquiterpénicos un recurso potencial para generar nuevos agentes quimioterapéuticos menos agresivos y con alta selectividad.

Por otra parte, en estudios preliminares se ha determinado que los extractos de algunas especies de *Diospyros* poseen compuestos de tipo sesquiterpénico como constituyentes fitoquímicos (Mallavadhani y Mahapatra, 2005). Con base en estos estudios y al efecto citotóxico que poseen los sesquiterpenoides, en este trabajo se aislaron e identificaron compuestos sesquiterpénicos de la corteza de *Diospyros anisandra*, asimismo se evaluó la actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares cancerígenas. Así, se pretende identificar nuevos compuestos que puedan ser utilizados como modelos estructurales para el diseño de futuros fármacos con potencial para ser empleados en el tratamiento del cáncer y, por otro lado, contribuir con el conocimiento de la composición química del género *Diospyros*.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. CÁNCER

Normalmente, en los tejidos del cuerpo existe un equilibrio entre la proliferación y muerte celular, sin embargo algunas veces este proceso ordenado se descontrola debido a una mutación celular y como resultado se desarrolla gradualmente una masa de células conocida como tumor. A esta proliferación anormal y descontrolada de las células en los tejidos se conoce como neoplasia y puede ser clasificada como benigna o maligna dependiendo de las características del tumor o neoplasma (Bronchud, 2008; Karp, 2005).

Los tumores benignos, conocidos como no-cancerosos, no invaden los tejidos que los rodean, no se diseminan a otras partes del cuerpo, habitualmente no reaparecen después de la extirpación quirúrgica y rara vez ponen la vida del paciente en peligro. Las células de los tumores malignos o cancerosos tienen la habilidad de invadir estructuras vecinas y de diseminarse a otros órganos a través del sistema linfático y los vasos sanguíneos, formando tumores nuevos, conociéndose dicho proceso como metástasis. Si la diseminación no se controla, la consecuencia es la muerte del paciente (Boyle y Levin, 2008; Karp, 2005; Philip, 2003).

En este sentido, el término cáncer se utiliza ampliamente como sinónimo de neoplasia y como término general en algunas enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal y descontrolado de la célula. Los tipos de cáncer más comunes son los carcinomas, los cuales son tumores malignos que surgen de células epiteliales. Otros tipos son los sarcomas, que surgen de tejido blandos como el músculo y los gliomas que resultan de la transformación de las células gliales del sistema nervioso central (Boyle y Levin, 2008).

Así, el cáncer es uno de los padecimientos que amenazan la salud humana y que según la OMS se encuentra entre las principales causas de muerte en la población mundial. Tan sólo en 2008 se diagnosticaron 12.7 millones de casos y se registraron 7.6 millones de muertes por esta enfermedad (Jemal *et al.*, 2011). Se estima que para el año 2030

existirán 20 millones de casos de cáncer y 12.9 millones de muertes debido a esta enfermedad. En 2008, el origen del cáncer en términos de incidencia, fueron el de pulmón (1.52 millones de casos), el de mama (1.29 millones de casos) y el colorrectal (1.15 millones de casos). Los que tuvieron pocas probabilidades de recuperación, produciendo la muerte, fueron el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de estómago y el de hígado (Boyle y Levin, 2008).

En México, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en la población general en 2008. En Yucatán, en 2008 y 2007, los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en la población general según el INEGI y la Secretaria de Salud de Yucatán (SSY), respectivamente (SSY, 2008; INEGI, 2010).

### **2.1.2 ETIOLOGÍA**

Los factores de riesgo para la generación de un cáncer están relacionados con la dieta, la inactividad física y uso de sustancias adictivas como el consumo excesivo de cigarros y alcohol. También puede ser originado por ciertas radiaciones como las del radón, los rayos UV solares, los rayos X y los rayos gama. Algunas sustancias químicas pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer; por ejemplo, la exposición con asbesto, benceno, bencidina, cadmio, arsénico, berilio, níquel o cloruro de vinilo. Además, el empleo de ciertos fármacos puede producir cáncer, como el tamoxifén, empleado en la terapia hormonal en la menopausia, y fenacetina, un analgésico (Weiderpass, 2010; Boyle y Levin, 2008).

Ciertos tipos de cáncer están relacionadas con algunos organismos patógenos, como el virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus de la inmunodeficiencia adquirida, *Helicobacter pylori*, entre otros. En general, todos estos factores físicos, químicos y biológicos mencionados tienen la propiedad de alterar el genoma celular y producir anomalías en la proliferación celular, la reparación de ADN, la apoptosis y en la estabilidad cromosómica, generando de este modo el cáncer (Boyle y Levin, 2008; Karp, 2005; Philip, 2003). Otro aspecto que se ha observado es que el cáncer puede ser de

origen genético, esto es, que algunas familias tienen un riesgo elevado para desarrollar ciertos tipos de cáncer, aunque estos síndromes cancerosos hereditarios son raros. Por ejemplo, se estima que del 5 a 10% de los casos de cáncer de mama se debe a la herencia de dos genes, BRCA1 y BRCA2, que predisponen al desarrollo de la enfermedad; además, las mutaciones en estos genes también predisponen a la mujer al desarrollo de cáncer ovárico (ACS, 2011a; Karp, 2005).

### 2.1.3 TRATAMIENTO

La mayoría de los protocolos de tratamiento del cáncer incluyen cirugía, radioterapia o quimioterapia. La elección de la cirugía depende de la naturaleza del cáncer y el estado de la enfermedad; si el tumor ha invadido tejidos cercanos o ha producido metástasis la cirugía no se emplea (ACS, 2011b; Boyle y Levin, 2008). La radioterapia no es específica para células cancerosas, ya que puede producir mutaciones en células normales y entonces inducir segundos tumores. Algunos efectos adversos de la radioterapia son la producción de fatiga, cambios en la piel (puede ponerse roja, seca y sensible), alopecia, dolor e irritación de la boca (cuando se produce la radiación en la cabeza) y náuseas, vómitos y diarrea (en caso de radiación en el abdomen) (ACS, 2011b; Hall y Wu, 2003).

En general, la cirugía y radioterapia sólo son eficaces cuando el tumor se encuentra confinado al órgano donde se originó (tumores primarios), por lo que no se puede tratar de esta manera al cáncer que ha sufrido metástasis, y en estos casos se recurre a la quimioterapia (ACS, 2011b; Boyle y Levin, 2008). La quimioterapia se basa en el uso de fármacos que se puedan distribuir por todo el cuerpo para tratar los tumores secundarios. Los fármacos empleados en la quimioterapia tradicional son compuestos citotóxicos que actúan a distintos niveles del ciclo celular, el cual es el proceso fundamental para la proliferación de las células. Así, los fármacos citotóxicos son el principal componente de la quimioterapia sistémica y se pueden clasificar según su mecanismo de acción en: agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasas e inhibidores de los microtúbulos (Priestman, 2008a; Schulz, 2005).

### 2.1.3.1 AGENTES ALQUILANTES

Los agentes alquilantes son compuestos químicos que tienen un grupo alquilo capaz de combinarse con otros compuestos mediante enlaces covalentes. La principal acción citotóxica de estos compuestos es unirse al átomo de nitrógeno en la base de purina de una guanina en el ADN, previniendo el acceso de polimerasas requeridas para la replicación. La mayoría de estos fármacos poseen dos grupos alquilo por lo que pueden ser bifuncionales, es decir que pueden enlazarse a dos residuos de guanina que se encuentren cercanas, esto es, donde las hebras de ADN giran. De este modo, forman puentes o uniones entrecruzadas entre las hebras de ADN lo que previene el acceso de enzimas provocando que no se puedan separar al momento de la replicación. Como esta unión no se puede romper la célula muere, debido a una interrupción en el ciclo celular y probablemente por apoptosis. Algunos ejemplos de estos fármacos son: melfalán, ciclofosfamida, busulfán, tiotepa, temozolomida, cisplatino y oxaliplatino (Figura 1) (Priestman, 2008a; Boyle y Levin, 2008; Schulz, 2005).

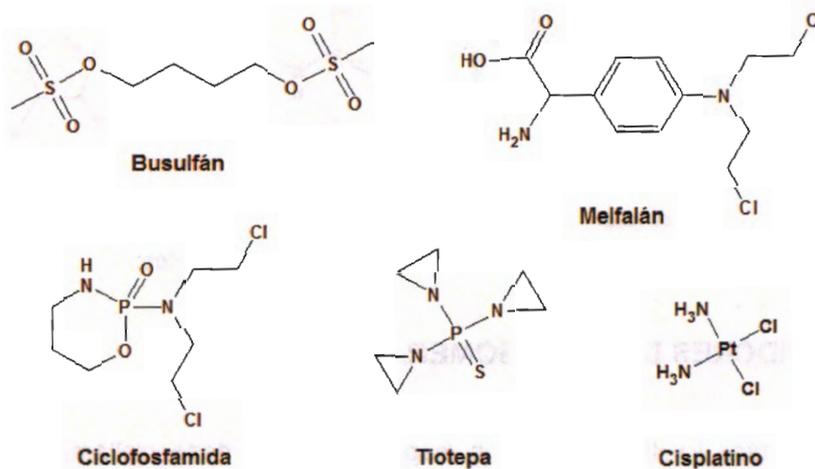


Figura 1. Estructuras de algunos agentes alquilantes.

### 2.1.3.2 ANTIMETABOLITOS

Para que una célula pueda dividirse debe generar suficientes reservas de ácidos nucleicos, y para que esta síntesis pueda llevarse a cabo, varios metabolitos, como los

nucleósidos, deben estar presentes para formar las subunidades de las moléculas que serán construidas; además, deben estar presentes y disponibles las enzimas necesarias para lograr dicha síntesis. En este sentido, los antimetabolitos pueden ser análogos químicos de purinas o pirimidinas que lograrán incorporarse dentro de la estructura del ADN, produciendo un ADN defectuoso que impide llevar a cabo con éxito la división celular. También pueden ser inhibidores de enzimas vitales para la síntesis de nucleósidos, por ejemplo, los inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa que está involucrada en la conversión de ácido fólico a ácido folínico, el cual es una coenzima esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas, de esta manera se inhibe la síntesis de dichas bases nitrogenadas. Algunos ejemplos de dichos fármacos son: metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, 5-fluoroacilo, gemcitabina y citabirina (ver Figura 2) (Priestman, 2008; Boyle y Levin, 2008; Schulz, 2005).

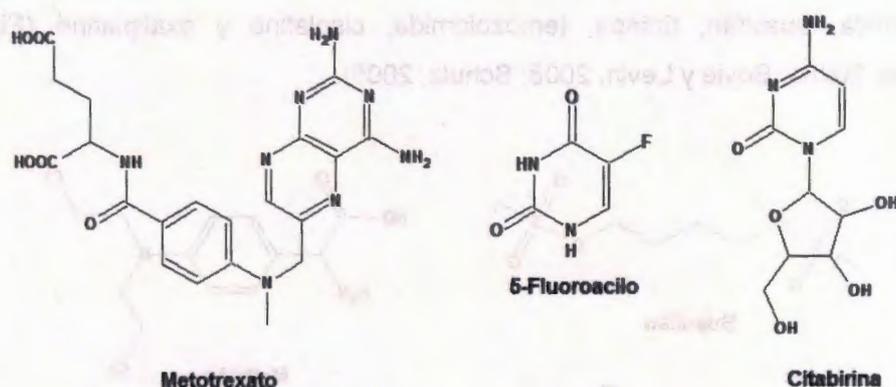


Figura 2. Estructuras de algunos antimetabolitos.

### 2.1.3.3 INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas I y II son enzimas responsables del desenrollamiento de la doble hélice del ADN; así, la inhibición de alguna de estas enzimas produce la ruptura de una o de las dos hebras de ADN, de este modo, se inhibe la replicación del ADN y por consiguiente se produce la muerte celular a través de apoptosis. Algunos ejemplos de estos fármacos son: irinotecan, topotecan, etopósido y doxorubicina (ver Figura 3) (Priestman, 2008; Boyle y Levin, 2008; Schulz, 2005).

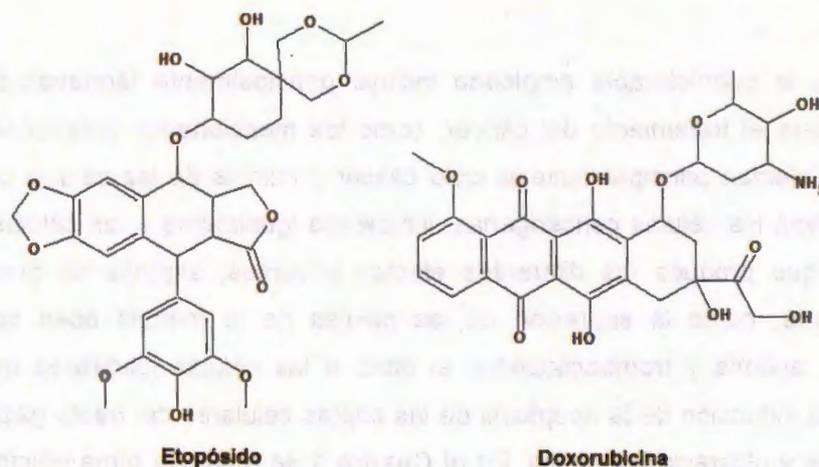


Figura 3. Estructura de algunos inhibidores de topoisomerasas.

### 2.1.3.4 INHIBIDORES DE MICROTÚBULOS

Durante la metafase de la mitosis los cromosomas están dispuestos en el huso mitótico celular antes de separarse para formar las células nuevas. El huso está formado por la proteína tubulina, así los inhibidores de los microtúbulos actúan reaccionando con dicha proteína en una de dos maneras: previniendo la formación del huso, como la vinblastina y vincristina; o, estabilizando el huso mitótico de manera que la mitosis no puede proceder, como el paclitaxel (ver Figura 4). Aunque la función más importante afectada es la mitosis, también se inhibe el transporte de vesículas intracelulares y la migración celular (Priestman, 2008; Boyle y Levin, 2008; Schulz, 2005).

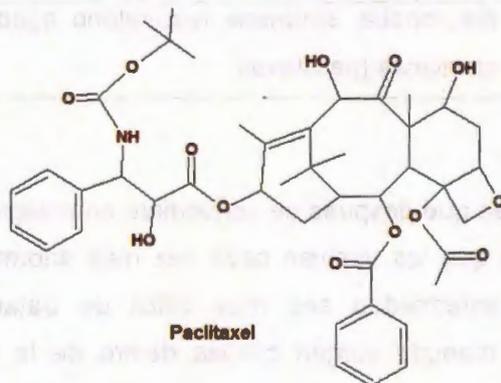


Figura 4. Estructura de un inhibidor de microtúbulos.

Actualmente, la quimioterapia empleada incluye principalmente fármacos con efectos citotóxicos para el tratamiento del cáncer, como los mencionados anteriormente. Estos compuestos afectan principalmente el ciclo celular y mitosis de las células pero no son selectivos hacia las células cancerígenas, inhibiendo igualmente a las células normales. Esto es lo que produce los diferentes efectos adversos; algunos se producen más frecuentemente, como la supresión de las células de la médula ósea que produce neutropenia, anemia y trombocitopenia; el daño a las células foliculares que produce alopecia; y la inducción de la apoptosis de las criptas celulares del tracto gastrointestinal causa diarrea y ulceraciones orales. En el **Cuadro 1** se resumen otros efectos adversos que pueden ser producidos por los fármacos dependiendo de su mecanismo de acción (ACS, 2011b; Priestman, 2008b; Boyle y Levin, 2008; Dy y Adjei, 2006).

**Cuadro 1.** Efectos adversos producidos por la quimioterapia.

<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Efectos adversos</b>
Agentes alquilantes	Leucemia aguda, fibrosis pulmonar, toxicidad gonadal, neuropatía, daño renal (cisplatino) y cardiopatía (ciclofosfamida).
Antimetabolitos	Fibrosis hepática, neumonitis, nefrotoxicidad, úlceras gastrointestinales, fallo renal (metotrexato), síndrome coronario (citarabina) y síndrome hemolítico (gencitabina)
Inhibidores de topoisomerasas	Cardiotoxicidad, hematuria, edema cerebral y segundas leucemias (etopósido)
Inhibidores de microtúbulos	Neuropatía, síndrome respiratorio agudo (vincristina), arritmias cardíacas (paclitaxel).

Un problema del cáncer es que después de convertirse en malignas, las células no dejan de acumular mutaciones que las vuelven cada vez más anormales. Esta inestabilidad genética hace que la enfermedad sea más difícil de tratar con la quimioterapia convencional, porque a menudo surgen células dentro de la masa tumoral que son resistentes a la acción de los fármacos (Boyle y Levin, 2008; Karp, 2005; Schulz, 2005).

En este sentido, a pesar del avance tecnológico en el cuidado y manejo de las enfermedades, el cáncer continúa siendo un problema importante de salud, ya que produce una elevada mortalidad en la población por sus complicaciones a largo plazo. Además, los fármacos empleados para su tratamiento poseen diferentes efectos adversos que no permiten que el paciente se recupere completamente, agregando el costo elevado que implica el tratamiento y el control, así como las futuras consecuencias relacionadas con la enfermedad (Sharma *et al.*, 2009). Esto impulsa la búsqueda de nuevos compuestos con potencial farmacológico para el tratamiento del cáncer.

## 2.2 SESQUITERPENOIDES

Son más de 23,000 los compuestos terpenoides conocidos, también referidos como terpenos, éstos son la clase de productos naturales con mayor variedad estructural, además algunos han probado ser de gran importancia farmacéutica y por consiguiente, un gran esfuerzo es realizado para identificar y caracterizar nuevos terpenos así como determinar sus actividades biológicas. Los terpenos son clasificados de acuerdo al número de unidades isoprenicas en su estructura en seis tipos: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos y triterpenos, de los cuales los sesquiterpenoides representan una gran fracción de los diferentes terpenos que se encuentran en la naturaleza (Modzelewska *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

### 2.2.1 BIOSÍNTESIS DE SESQUITERPENOIDES

Los esqueletos de los sesquiterpenoides, como en otros terpenos, son sintetizados por unidades de isopreno bioquímicamente activas, los cuales son el isopentenil pirofosfato (IPP, C<sub>5</sub>) y su isómero altamente electrofílico, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP, C<sub>5</sub>). Son conocidas dos vías de biosíntesis que generan las unidades de isopreno, las cuales son la del mevalonato y la desoxixilulosa fosfato. A partir de los dos precursores básicos, IPP y DMAPP, un grupo de enzimas llamadas preniltransferasas pueden sintetizar prenil pirofosfatos lineales los cuales sirven como precursores para la biosíntesis de los distintos terpenos. En el caso de los sesquiterpenoides, durante su biosíntesis, la unidad de

isopreno activa (IPP) es repetidamente adicionada a DMAPP en una condensación en secuencia cabeza-cola, hasta formar el precursor de sesquiterpeno, el farnesil pirofosfato (FPP, C<sub>15</sub>), el cual puede ciclarse para generar diversas estructuras que pueden ser mono-, bi- y tricíclicas (Figura 5) (Wang *et al.*, 2005; Dewick, 2001).

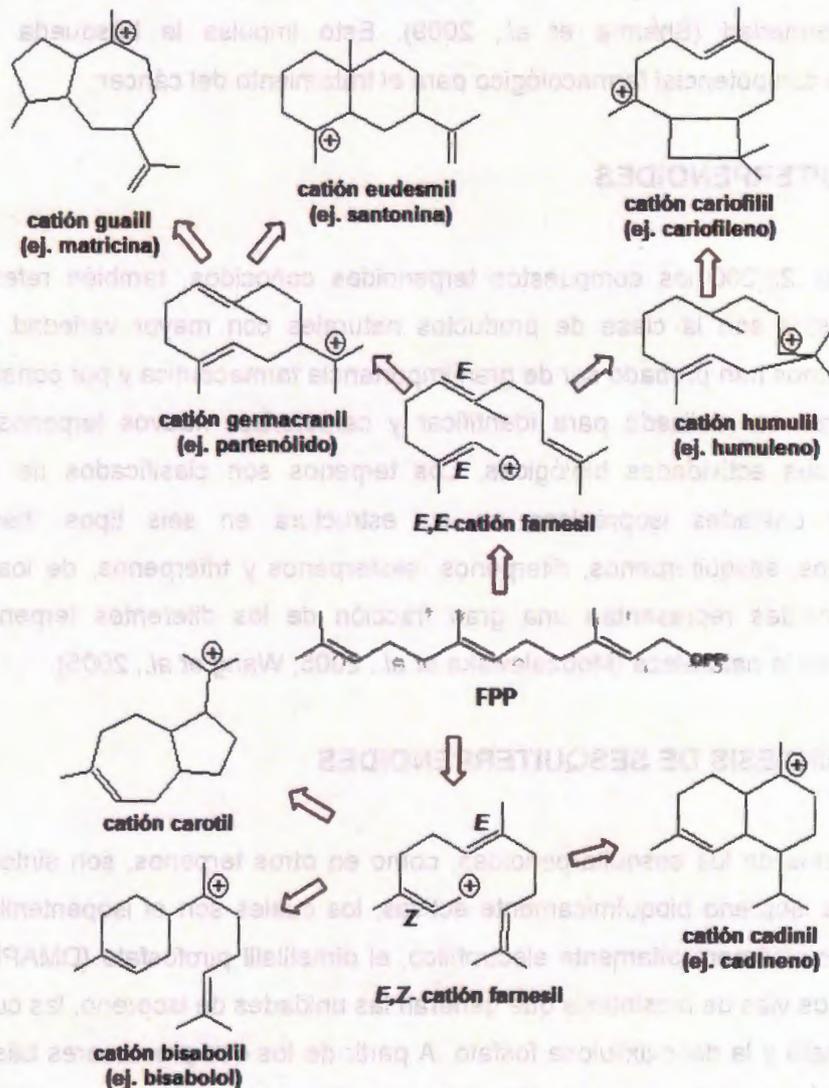


Figura 5. Esqueletos estructurales de compuestos tipo sesquiterpénico encontrados en plantas.

La estereoquímica del doble enlace más cercano al PP puede adoptar una configuración *E* o *Z*, vía ionización, esto permite diferentes posibilidades del plegamiento de la cadena de carbono para las reacciones de ciclización, formando una gran variedad de estructuras (Figura 5). Se han estimado cerca de 300 tipos de esqueletos de los compuestos sesquiterpénicos. En las plantas, estos compuestos juegan un papel ecológico importante en interacciones con insectos y microbios, y actúan como atrayentes, repelentes, antialimentarios y fitoalexinas (Modzelewska *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Dewick, 2001).

## 2.2.2 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE SESQUITERPENOIDES

Los sesquiterpenoides tienen diferentes actividades biológicas incluyendo propiedades antimicrobianas, antitumorales y citotóxicas, los que se encuentran con mayor frecuencia como constituyentes activos de las plantas son las sesquiterpen-lactonas. Se pueden clasificar de acuerdo a su esqueleto carbocíclico dentro de cuatro grupos principales: germacranólidos, eudesmanólidos, guaianólidos y pseudoguaianólidos (Figura 6) (Balunas y Kinghorn, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 1995).

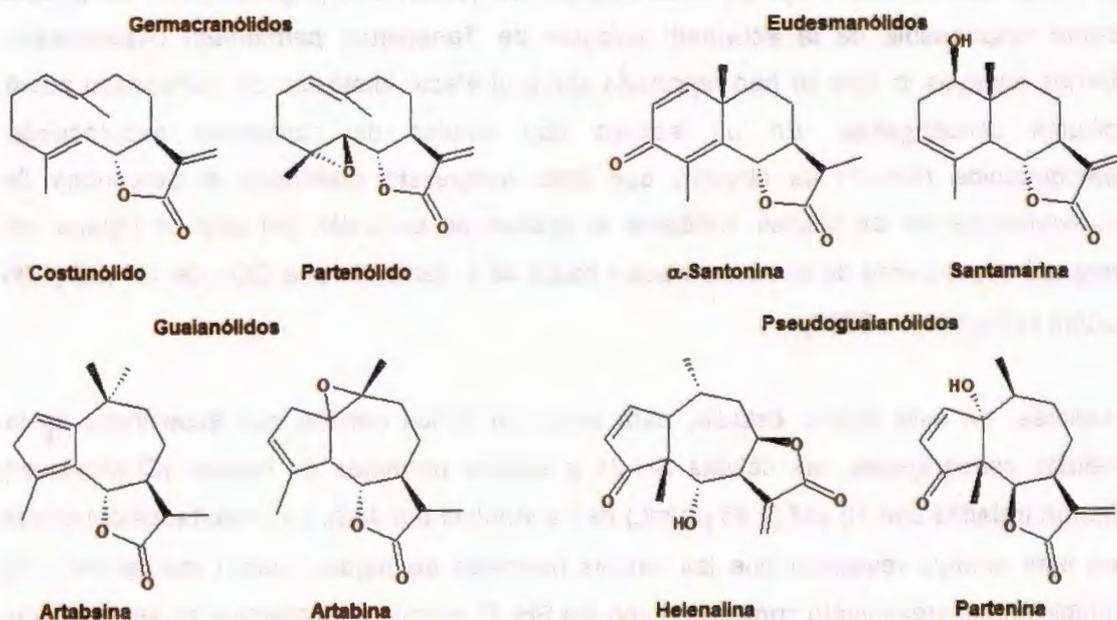


Figura 6. Estructuras químicas de algunas sesquiterpen-lactonas.

El sufijo "ólido", en el nombre de las sesquiterpen-lactonas, indica la presencia de un grupo lactona que es un anillo alfa-metilen-gama-lactona (*cis* o *trans*) unido a la posición C6-C7 o C7-C8 del esqueleto carboxílico (Zhang *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 1995).

Las propiedades citotóxicas de los sesquiterpenoides han llamado la atención y varios estudios *in vitro* se han realizado para evaluar su capacidad como posibles agentes anticancerígenos. En dichos ensayos la actividad citotóxica de los compuestos se expresa como concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), que se refiere a la concentración necesaria para matar al 50% de las células; para compuestos puros un valor de CC<sub>50</sub> ≤ 5 µg/mL es considerado como una actividad citotóxica significativa en cultivos celulares y así realizar posteriormente estudios preclínicos o clínicos. A continuación se describen brevemente algunos estudios realizados a varios sesquiterpenoides para demostrar sus efectos citotóxicos.

### 2.2.2.1 PARTENÓLIDO

El partenólido es una sesquiterpen-lactona de tipo germacrano (Figura 6) que fue aislado como responsable de la actividad biológica de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae). Varios ensayos *in vitro* se han reportado sobre el efecto citotóxico del partenólido sobre células cancerígenas. En un estudio con células de carcinoma hepatocelular sarcomatoide (SH-J1) se observó que este compuesto disminuye el porcentaje de supervivencia de las células, mediante el ensayo de exclusión del azul de tripano, de manera dependiente de la concentración hasta 48 h, teniendo una CC<sub>50</sub> de 7.5 µM (1.86 µg/mL) (Wen *et al.*, 2002).

Además, en este mismo estudio, para examinar si los efectos son específicos hacia células cancerígenas, las células SH-J1 y células normales de hígado (Chang-Liver) fueron tratadas con 10 µM (2.48 µg/mL) de partenólido por 48 h. Los resultados obtenidos en este ensayo revelaron que las células normales de hígado fueron resistentes a la inhibición del crecimiento comparado con las SH-J1, siendo el porcentaje de células vivas de 80% y 20%, respectivamente (Wen *et al.*, 2002).

En otro ensayo se evaluó el efecto citotóxico del partenólido en cultivos celulares primarios de leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica con crisis blástica (cbLMC), células progenitoras de LMA (pLMA) y células hematopoyéticas normales de médula ósea. A una concentración de  $7 \mu\text{M}$  ( $1.73 \mu\text{g/mL}$ ) el porcentaje de células vivas fue de 9.3%, en los cultivos de LMA, cbLMC y pLMA; en contraste con las células normales hematopoyéticas que fue del 94% después del tratamiento. Para determinar la eficacia del partenólido, se comparó el efecto citotóxico con un fármaco antineoplásico, la arabinosilcitosina, demostrando que dicho fármaco fue más tóxico para las células normales que para las cancerosas (Guzman *et al.*, 2005).

Otros estudios *in vitro* han reportado el efecto citotóxico significativo del partenólido en varias líneas celulares de cáncer, por ejemplo la  $\text{CC}_{50}$  para carcinoma humano de pulmón (A549) fue de  $4.3 \mu\text{M}$  ( $1.06 \mu\text{g/mL}$ ), para meduloblastoma humano (Te671) de  $6.5 \mu\text{M}$  ( $1.65 \mu\text{g/mL}$ ) y para adenocarcinoma de colon humano (HT-29) de  $7 \mu\text{M}$  ( $1.73 \mu\text{g/mL}$ ), que, comparados con el control, disminuyen la viabilidad celular (Parada-Tsuka *et al.*, 2007).

También, en líneas celulares de mieloma múltiple (incluyendo líneas resistentes a dexametasona y doxorubicina) y cultivos celulares primarios de mieloma múltiple, las  $\text{CC}_{50}$  del compuesto se encontraron entre  $1\text{-}3 \mu\text{M}$  ( $0.25\text{-}0.75 \mu\text{g/mL}$ ). A dicha concentración el partenólido no afectó la proliferación de células normales del estroma de médula ósea y de células mononucleares de sangre periférica, sugiriendo un efecto citotóxico selectivo (Suvannasankha *et al.*, 2008).

En 2009, Kawasaki *et al.* realizaron un estudio para evaluar el efecto citotóxico del partenólido ( $1.24 \mu\text{g/mL}$ ) en líneas celulares de cáncer de próstata humana, una que expresa normalmente el receptor a andrógenos (LAPC4) y otras derivadas de tumores metastásicos en cerebro (DU145) y hueso (PC-3, VCAP); se encontró que en las cuatro líneas celulares el porcentaje de células vivas fue entre 12-28% comparado con el control. Además, en células progenitoras de cáncer de próstata (CD44+), se encontró que el

---

partenólido disminuye el porcentaje de células viables de manera dependiente a la dosis; a 10  $\mu M$  el porcentaje de disminución fue entre 8-22%.

Recientemente se ha reportado el efecto citotóxico del partenólido en una línea celular de cáncer de páncreas humano (BxPC-3), para la cual se obtuvo una  $CC_{50}$  de 14.5  $\mu M$  (3.58  $\mu g/mL$ ) mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Además, se observó que dicho compuesto indujo apoptosis de manera dependiente de la concentración, observando que a la concentración máxima empleada, 20  $\mu M$  (4.94  $\mu g/mL$ ), se produjo un 75% de células en apoptosis después de 48 h de tratamiento, cuantificadas mediante citometría de flujo (Liu *et al.*, 2010).

### 2.2.2.2 COSTUNÓLIDO

Otro sesquiterpenoide estudiado, el costunólido, es una sesquiterpen-lactona de tipo germacrano (Figura 6) aislado de *Saussurea lappa* (Asteraceae). En un ensayo *in vitro* realizado con células de leucemia humana (HL-60) se observó que el tratamiento con el costunólido a concentraciones de 1  $\mu M$  (0.23  $\mu g/mL$ ), 5  $\mu M$  (1.15  $\mu g/mL$ ) y 10  $\mu M$  (2.30  $\mu g/mL$ ), inducían apoptosis de una manera dependiente de la concentración y el tiempo (3, 6, 9 y 12 h). En dicho ensayo se empleó la tinción con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) para determinar el porcentaje de apoptosis, observándose el valor mayor, de 55%, a la concentración de 10  $\mu M$  (2.30  $\mu g/mL$ ) después del tratamiento por 12 h (Lee *et al.*, 2001).

Otro estudio determinó el efecto citotóxico del costunólido, mediante el ensayo de MTT, en la línea de células B de leucemia humana (NALM-6) obteniendo una  $CC_{50}$  de 3.31  $\mu M$  (0.77  $\mu g/mL$ ) después del tratamiento por 24 h; también, se observó que a una concentración de 100  $\mu M$  (23.00  $\mu g/mL$ ), el compuesto no produjo efectos citotóxicos al incubarse por 24 h con un cultivo primario de células linfoides humanas. Además, se cuantificó el estado apoptótico de las células inducido por el costunólido mediante citometría de flujo, observándose que a una concentración de 10  $\mu M$  (2.30  $\mu g/mL$ ) se producía apoptosis de una manera dependiente al tiempo (2, 4 y 6 h), teniendo que a las 6 h se encontraba un 50% de células en apoptosis (Kanno *et al.*, 2008).

Recientemente, Choi y Lee (2009) evaluaron el efecto del costunólido sobre la proliferación de las células de carcinoma de pulmón de ratón (3LL) en un modelo *in vivo* con ratones, observaron que en los ratones tratados con costunólido se produjo una inhibición significativa en el crecimiento de los tumores de manera dependiente a la dosis, a 7.5, 15 y 30 mg/kg-día durante 7 días. Además, se observó que la administración de 7.5 mg/kg produjo una supervivencia del 67% de los ratones después de 45 días de tratamiento, mientras que todos los ratones no tratados murieron al día 38.

### 2.2.2.3 OTROS COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES CITOTÓXICOS

Otros sesquiterpenoides aislados de varias plantas han sido evaluados para determinar sus efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Como se puede observar en el Cuadro 2, los compuestos que ahí se mencionan tienen valores de  $CC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$  indicando actividad citotóxica significativa. En la Figura 7 se presentan las estructuras de algunos de los compuestos sesquiterpénicos mencionados en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Compuestos sesquiterpénicos obtenidos de plantas y su citotoxicidad en diferentes líneas tumorales humanas.

Sesquiterpenoide	Especie vegetal (Familia)	Línea celular	Citotoxicidad CC <sub>50</sub> (µg/mL)	Referencia
Liratosol A	<i>Solanum lyratum</i>	HT-29	2.3	Dai <i>et al.</i> , 2009
Liratosol B	(Solanaceae)		1.4	
Liratosol C	<i>Solanum lyratum</i>	HONE-1	1.0	Ren <i>et al.</i> , 2009
Liratosol D	(Solanaceae)	HT-29	1.6	
Poligodial	<i>Zygogynum pancheri</i> (Winteraceae)	KB	0.2	Allouche <i>et al.</i> , 2009
		HL-60	0.3	
Santamarina	<i>Cyathocline purpurea</i> (Asteraceae)	KB	0.2	Ma <i>et al.</i> , 2009
		MCF-7	0.5	
1β,2β,6α-Triacetoxi-9α- benzoiloxi-β- dihidroagarofurano	<i>Celastrus orbiculatus</i> (Celastraceae)	HeLa	2.0	Xu <i>et al.</i> , 2008
		A375-S2	1.8	
Mansonona D	<i>Thespesia populnea</i>	HeLa	2.8	Boonsri <i>et al.</i> , 2008
Populena D	(Malvaceae)		1.0	
Enidrina	<i>Tetragonotheca ludoviciana</i>	MCF-7	1.3	Ma <i>et al.</i> , 2007
Tetraludina A	(Asteraceae)		3.1	
Neobritanilactona B	<i>Inula britannica</i> (Asteraceae)	COLO205	3.5	Bai <i>et al.</i> , 2006
Acetato de neobritanilactona B		AGS	1.5	
5- <i>epi</i> -Isogoiacenoólido	<i>Camchaya calcárea</i> (Asteraceae)	KB	0.4	Vongvanich <i>et al.</i> , 2006
		Vero	12.6	

HT-29: Adenocarcinoma colorrectal humano; HONE-1: Carcinoma nasofaríngeo humano, KB: Carcinoma orofaríngeo humano, MCF-7: Adenocarcinoma de mama humano, HeLa: Carcinoma cervicouterino humano, A375-S2: Melanoma maligno humano, COLO205: Adenocarcinoma de colón humano, AGS: Adenocarcinoma gástrico humano, Vero: Epitelial de riñón normal de mono.

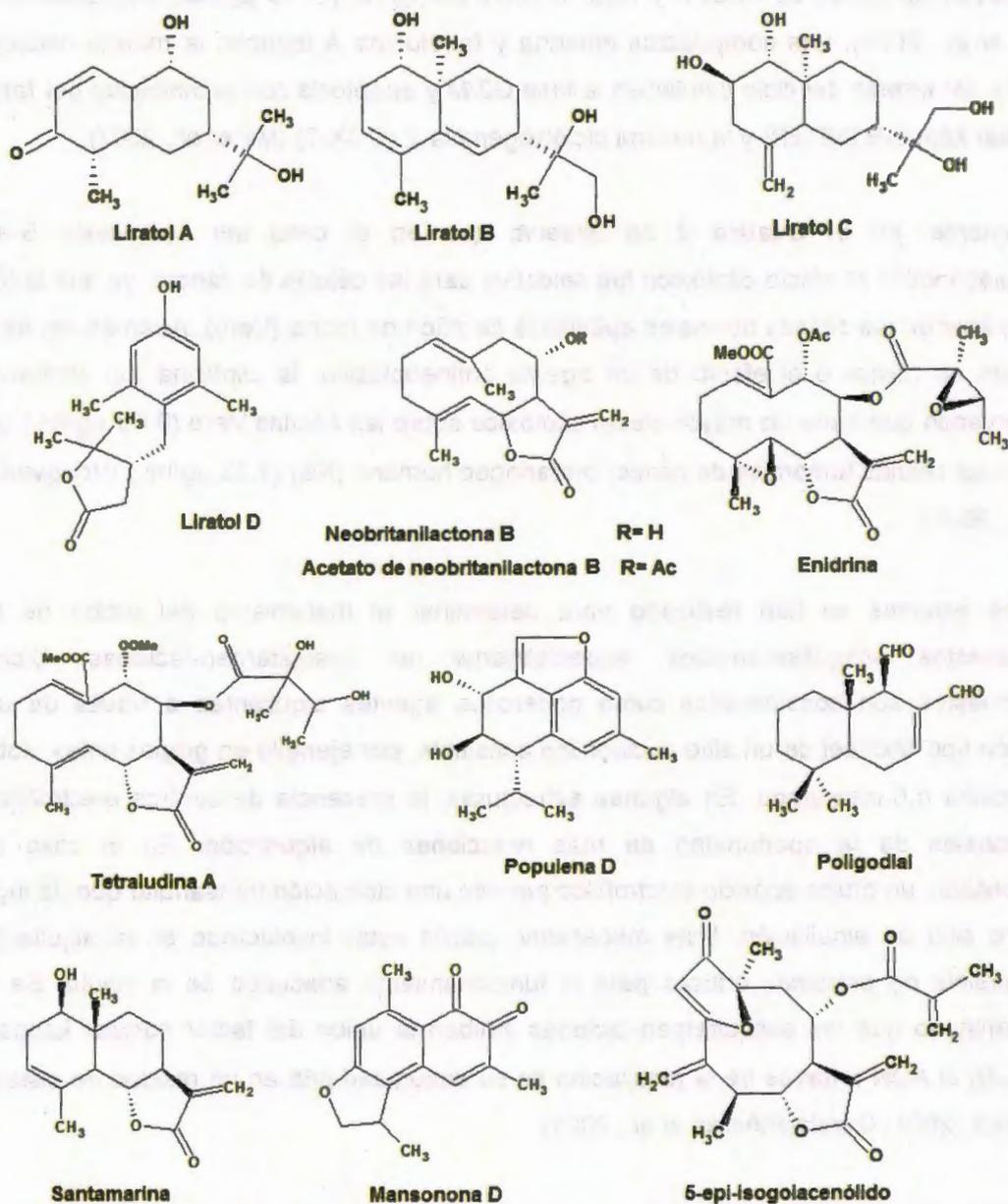


Figura 7. Estructuras de algunos sesquiterpenoides citotóxicos.

De los compuestos mencionados en el Cuadro 2, además del efecto citotóxico, se determinó el porcentaje de inducción de apoptosis de la neobritanilactona B y del acetato de neobrilactona B, observándose que fueron dependientes de la concentración con

---

valores de apoptosis de 41.62% y 76.87% con 6.05  $\mu\text{g/mL}$  y 7.10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Bai *et al.*, 2006). Los compuestos enidrina y tetraludina A inducen la muerte celular a través del arresto del ciclo celular en la fase G2/M y apoptosis con la inhibición del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Ma *et al.*, 2007).

Igualmente, en el **Cuadro 2** se observa que en el caso del compuesto 5-*epi*-isogoiacenólido el efecto citotóxico fue selectivo para las células de cáncer, ya que la  $\text{IC}_{50}$  fue menor en las células normales epiteliales de riñón de mono (Vero). Además, en dicho estudio se comparó el efecto de un agente antineoplásico, la elipticina (un alcaloide), observando que tiene un mayor efecto citotóxico sobre las células Vero (0.40  $\mu\text{g/mL}$ ) que sobre las células tumorales de cáncer orofaríngeo humano (KB) (1.33  $\mu\text{g/mL}$ ) (Vongvanich *et al.*, 2006).

Varios estudios se han realizado para determinar el mecanismo de acción de los compuestos sesquiterpenoides, especialmente las sesquiterpen-lactonas. Dichos compuestos son considerados como poderosos agentes alquilantes a través de una adición tipo Michael de un sitio nucleofílico accesible, por ejemplo en grupos tioles, sobre la lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. En algunas estructuras, la presencia de centros electrofílicos adicionales da la oportunidad de más reacciones de alquilación. En el caso del partenólido, un grupo epóxido electrofílico permite una ciclización transanular que da lugar a otro sitio de alquilación. Este mecanismo podría estar involucrado en la alquilación irreversible de proteínas críticas para el funcionamiento adecuado de la célula. Se ha determinado que las sesquiterpen-lactonas inhiben la unión del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) al ADN a través de la alquilación de su subunidad p65 en un residuo de cisteína (Dewick, 2001; García-Piñeres *et al.*, 2001).

Los compuestos sesquiterpénicos se han encontrado en una variedad de especies de plantas pertenecientes a diferentes familias, por ejemplo de *Camchaya calcarea* (familia Asteraceae), *Solanum lyratum* (familia Solanaceae) y *Zygogynum pancheri* (familia Winteraceae), entre otras (Allouche *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009; Vongvanich *et al.*, 2006). En este sentido, una de las familias encontradas en la península de Yucatán es la

Ebenaceae, a la que pertenece el género *Diospyros*, del cual se han encontrado compuestos sesquiterpénicos como se comenta a continuación.

### 2.3 GÉNERO *DIOSPYROS*

Una de las familias de plantas que se encuentran en la península de Yucatán es la Ebenaceae, la cual posee tres géneros: *Diospyros*, *Euclea* y *Lassiocarpa*. El género *Diospyros* (Figura 8) con más de 350 especies es la más importante, tanto numéricamente como económicamente. Las características de las especies de este género son: árboles, raramente arbustos, hojas alternadas; flores verdes, blancas o amarillas, pocas o algunas; el fruto es una baya jugosa con semillas (1 a 10); la savia de la madera es blanca y suave, y la médula es negra y dura. Algunas especies de *Diospyros* han sido reportadas con interesantes actividades biológicas y farmacológicas, por ejemplo los extractos de *D. morrisiana*, *D. peregrina*, *D. zombensis*, *D. lotus* y *D. seychellarum* han manifestado un efecto citotóxico contra diferentes líneas celulares de cáncer (Loizzo *et al.*, 2009; Buenz *et al.*, 2007; Arellano *et al.*, 2003; Mallavadhani *et al.*, 1998; Standley *et al.*, 1967).

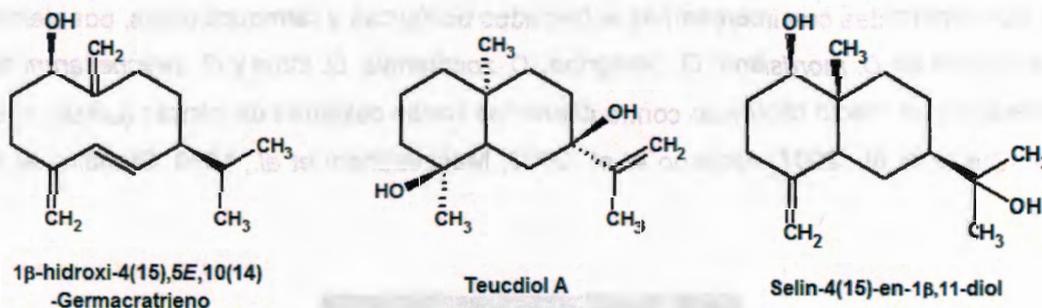


Figura 8. Género *Diospyros* spp.

De las 350 especies de *Diospyros*, más de 130 especies han sido investigadas fitoquímicamente y una variedad de compuestos han sido aislados e identificados de varias partes de la planta, como carotenoides, taninos, azúcares, hidrocarburos, lípidos,

compuestos aromáticos, flavonoides, cumarinas, terpenoides, esteroides y naftoquinonas. La mayoría de los terpenoides encontrados de las especies de *Diospyros* pertenecen, en más del 90%, al grupo de los triterpenos; sólo un estudio ha reportado un sesquiterpeno en *D. melanoxylon* y no se ha reportado hasta el momento la presencia de mono- o diterpenos (Fukai *et al.*, 2009; Buenz *et al.*, 2007; Mallavadhani y Mahapatra, 2005; Mallavadhani *et al.*, 1998).

En estudios fitoquímicos previos realizados con la especie *Diospyros anisandra*, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, se encontró la presencia de tres compuestos sesquiterpénicos del extracto hexánico de la corteza: el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, teucdiol A y selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Figura 9).



**Figura 9.** Estructura de los sesquiterpenoides encontrados en la especie *D. anisandra*.

Con base en estos hallazgos encontrados en *D. anisandra*, y al efecto citotóxico que presentan algunos sesquiterpenoides, en el presente trabajo se planteó realizar el aislamiento e identificación de compuestos sesquiterpénicos adicionales de esta especie de *Diospyros* para evaluar su actividad citotóxica en forma individual empleando tres líneas celulares de cáncer.

### 3. HIPÓTESIS

En la corteza de la especie *Diospyros anisandra* se han encontrado algunos compuestos sesquiterpénicos. Varios sesquiterpenoides aislados en otras especies de plantas poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer, por lo que se espera que los compuestos sesquiterpénicos que se aíslen a partir de la corteza de *D. anisandra* presenten actividad citotóxica en alguna de las líneas celulares de cáncer empleadas (Hep-2, HeLa y PC-3).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

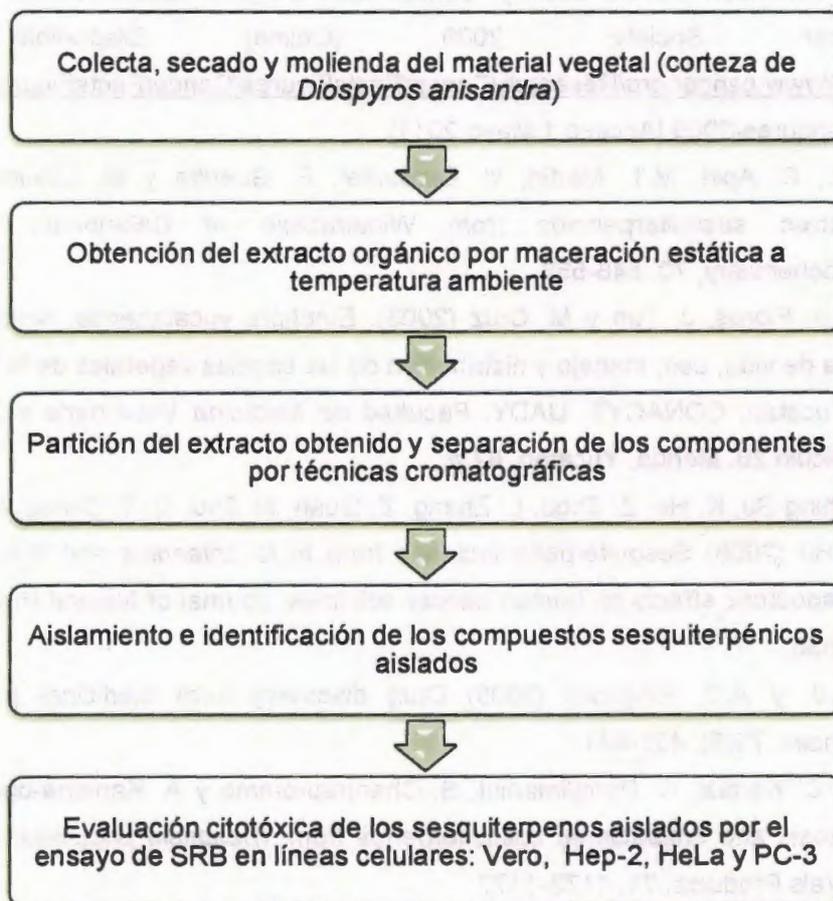
- ◆ Aislar e identificar compuestos sesquiterpénicos de *Diospyros anisandra* y evaluar su efecto citotóxico en tres líneas celulares de cáncer y una normal.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Obtener los compuestos sesquiterpenoides puros a partir de los extractos de corteza de *D. anisandra*.
- ◆ Elucidar las estructuras de los compuestos sesquiterpénicos puros obtenidos de *D. anisandra* por medio de técnicas espectroscópicas.
- ◆ Evaluar la actividad citotóxica de los diferentes compuestos sesquiterpénicos aislados de corteza de *D. anisandra* contra diferentes líneas celulares: epitelial de riñón normal de mono (Vero), cáncer orofaríngeo humano (Hep-2), cáncer cervicouterino humano (HeLa) y cáncer de próstata humano (PC-3).

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se realizó la colecta, secado y molienda de la corteza de *Diospyros anisandra*, que posteriormente fue macerada para obtener los extractos orgánicos. El extracto obtenido fue particionado y los componentes separados mediante diferentes técnicas cromatográficas. Los compuestos sesquiterpénicos aislados fueron identificados mediante diferentes técnicas espectroscópicas y evaluados en diferentes líneas celulares para determinar su actividad citotóxica, mediante el ensayo de sulforodamina B. En la **Figura 10** se presenta el diagrama del procedimiento experimental.



**Figura 10.** Diagrama de la estrategia experimental.

---

## 6. REFERENCIAS

- ACS (2011a) American Cancer Society. Learn about cancer. What causes cancer. Genetics and cancer. Heredity and cancer. [Online] (Actualizado 8 Julio 2009) Disponible en <http://www.cancer.org> [Acceso 1 Mayo 2011].
- ACS (2011b) American Cancer Society. Find support & treatment. Treatments and side effects. Treatment types. [Online] Surgery (Actualizado 9 agosto 2010) Radiation therapy (Actualizado 4 diciembre 2009) Chemotherapy (Actualizado 27 abril 2010) Disponible en <http://www.cancer.org> [Acceso 1 Mayo 2011]
- ACS (2009) American Cancer Society. Cancer facts & figures 2009. Atlanta: American Cancer Society, 2009 [Online] Disponible en: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-figures-2009> [Acceso 1 Mayo 2011].
- Allouche, N., C. Apel, M.T. Martin, V. Dumontet, F. Guéritte y M. Litaudon (2009) Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, 70, 546-553.
- Arellano, J. J. Flores, J. Tun y M. Cruz (2003). Etnoflora yucatanense. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. CONACYT, UADY, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Fascículo 20. Mérida, Yucatán. 87 p.
- Bai, N. L. Ching-Su, K. He, Z. Zhou, L. Zhang, Z. Quan, N. Zhu, Q. Yi Zheng, M-H Pan y C-T Ho (2006) Sesquiterpene lactones from *Inula britannica* and their cytotoxic and apoptotic effects on human cancer cell lines. *Journal of Natural Products*, 69, 531-535.
- Balunas, M.J. y A.D. Kinghorn (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441.
- Boonsri, S., C. Karalai, C. Ponglimanint, S. Chantrapromma y A. Kanjana-opas (2008). Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Thespesia populnea*. *Journal of Natural Products*, 71, 1173-1177.

- Boyle, P. y B. Levin (2008). World Cancer Report 2008. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. [Online] Disponible en: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php> [Acceso 10 Mayo 2011].
- Bronchud, M.H. (2008) Selecting the right targets for cancer therapy, en: Principles of molecular Oncology, Bronchud, M.H., M.A. Foote, G. Giacone, O. Olopade y P. Workman (ed) Humana Press. New Jersey. pp. 1-26.
- Buenz, E. J., B. A. Bauer, T. J. Montley y P. J. Limburg (2007). Cytotoxic properties of *Diospyros seychellarum* extract. The Journal of Toxicological Science, 32(5), 487-93.
- Choi, J.H. y K.T. Lee (2009) Costunolide-induced apoptosis in human leukemia cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase activation. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 32(10), 1803-1808.
- Dai, S.J., L. Shen y Y. Ren (2009) Two new eudesmane-type sesquiterpenoids from *Solanum lyratum*. Natural Product Research, 23(13), 1196-1200.
- Dewick P. M. (2001) Medicinal natural products a biosynthetic approach. 2a Ed. Jhon Wiley and Sons. 191-202 p.
- Dy, G.K. y A.A. Adjei (2006) Principles of chemotherapy, en: Oncology, Chang, A.E., P.A. Ganz, D.F. Hayes, T.J. Kinsella, H.I. Pass, J.H. Schiller, R.M. Stone y V.J. Strecher (ed) Springer science, United States of America, pp 14-39.
- Fraga, B. M. (2006). Natural sesquiterpenoids. Natural Product Reports, 23, 943-972.
- Fukai, S., S. Tanimoto, A. Maeda, H. Fukuda, Y. Okada y M. Nomura (2009). Pharmacological activity of compounds extracted from Persimmon peel (*Diospyros kaki* THUNB). Journal of Oleo Science, 58(4), 213-219.
- García-Piñeres A. V. Castro, G. Mora, T.J. Schmidt, E. Strunck, H.L. Pahl y I. Merfort (2001) Cysteine 38 in p65/NF- $\kappa$ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpe lactones. The Journal of Biological Chemistry, 276(43), 39713-39720.
- Gilani, A. H. y Atta-ur-Rahman (2005). Trends in Ethnopharmacology, Journal of Ethnopharmacology, 100, 43-49.

- Guzman, M. L., R. M. Rossi, L. Karnischky, X. Li, D. R. Peterson, D. S. Howard y C. T. Jordan (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitors cells. *Blood*, 105(11), 4163-4169.
- Hall, E. J. y C. S. Wu (2003). Radiation-inducen second cancers: the impact of 3-D-CRT and IMRT. *International Journal of Radiation Oncology Physics*, 56(1), 83-88.
- Harborne J. B. (1973) *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 2a ed. Chapman and Hall. 101-116, 227-229 p.
- INEGI (2008) Instituto nacional de estadística, geografía e informática. Estadística. Demografía y población. Causas de defunción.[Online] (Actualizado 21 abril 2010) Disponible en <http://www.inegi.org.mx/> [Acceso Mayo 2011].
- Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward y D. Forman (2011) Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
- Karp, G. (2005). *Biología celular y molecular. Conceptos y Experimentos*.4a Ed., McGrawHill, Colombia. 720-740 p.
- Kawasaki B.T. E.N. hurt, M. Kalathur, M.A. Duhagon, J.A. Milner, Y. S. Kim y W. L. Farrar (2009) Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: an integrated molecular profiling approach. *Prostate*, 69(8), 827-837.
- Kanno S. Y. Kitajama, M. Kakuta, Y. Osanai, K. Kurauchi, M. Ujibe y M. Ishikawa (2008) Costunolide-induced apoptosis is caused by receptor-mediated pathway and inhibition of telomerase activity in NALM-6 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 1024-1028.
- Kim, H. S. (2005). Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 37-39.
- Kinghorn, A. D., B. N. Su, D. S. Jang, L. C. Chang, D. Lee, J. Q. Gu, E. J. Carcache-Blanco, A. D. Pawlus, S. K. Lee, E. J. Park, M. Cuendet, J. J. Gills, K. Bhat, H. S. Park, E. Mata-Greenwood, L. L. Song, M. Jang y J. M. Pezzuto (2004). Natural Inhibitors of Carcinogenecis, *Planta Medica*, 70, 691-705.
- Kong, J. M., N. K. Goh, L. S. Chia y T. F. Chia (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1), 7-21.

- Lee, M. G., K. T. Lee, S. G. Chi y J. H. Park (2001). Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(3), 303-306.
- Liu J.W., M.X. Cai, Y. Xin, Q.S. Wu, J. Ma, P. Yang, H.Y. Xie y D.S. Huang (2010) Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro*. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29, 108-114.
- Loizzo, M. R., A. Said, R. Tundis, U. W. Hawas, K. Rashed, F. Menichini, N. Frega y F. Menichini (2009). Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* extract and isolated compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 264-270.
- Ma, G., L. Chong, Z. Li, A.H.T. Cheung y M.H.N. Tattersall (2009) Anticancer activities of sesquiterpen lactones from *Cyathocline purpurea* *in vitro*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64, 143-152.
- Ma G. S.I. Khan, G. Benavides, W. Schühly, N.H. Fischer, I.A. Khan y D.S. Pasco (2007) Inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated transcription and induction of apoptosis by melampolides and repandolides. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 60, 35-43.
- Mallavadhani, U. V. y A. Mahapatra (2005). A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxylon*. *Natural Product Research*, 19(1), 91-97.
- Mallavadhani, U. V., A. K. Panda y Y. R. Rao (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 49(4), 901-951.
- Modzelewska, A., S. Sur, S.K. Kumar y S.R. Khan (2005) Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 5, 477-499.
- Newman, D. y G. Cragg (2007). Natural products and sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Newman, D., G. Cragg y K. Sander (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Parada-Turska, J., R. Paduch, M. Majdan, M. Kandefer-Szerszen y W. Rzeski (2007) Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 59, 233-237.
- Philip, R. (2003). *Oncología Clínica. Enfoque multidisciplinario para medicos y estudiantes*. 8a Ed., Editorial Saunders, Elsevier Science: España. 1-61 p.

- Priestman T. (2008a) The theoretical basis of cancer chemotherapy, en: *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice*, Springer-Verlang, London. pp. 1-33.
- Priestman T. (2008b) Some practical aspects of cancer chemotherapy, en: *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice*, Springer-Verlang, London. pp. 35-74.
- Ren, Y., L. Shen, D.W. Zhang y S.J. Dai (2009) Two new sesquiterpenoids from *Solanum lyratum* with cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(4), 408-410.
- Robles, M., M. Aregultin, J. West y E. Rodriguez (1995). Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones, *Planta Medica*, 61, 199-203.
- Schulz, W. A. (2005). *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer, Netherlands. 449-453 p.
- Sharma K., S. Das, A. Mukhopadhyay, G. K. Rath y B. K. Mohanti (2009). Economic cost analysis in cancer management analits relevance today. *Indian Journal of Cancer*, 46, 184-189.
- SSY (2008) Secretaria de salud de Yucatán. Estadísticas. Estadísticas de mortalidad. Principales causas de mortalidad.[Online] (Actualizado 21 noviembre 2008) Disponible en: <http://www.salud.yucatan.gob.mx/> [Acceso 1 Mayo 2011].
- Standley, P. y L. Williams (1967). *Flora de Guatemala*. Fieldiano Botany, 24, parte III, número 3. Field Museum of Natural History.
- Suvannasankha A. C.D. Crean, R. Shanmugam, S. S. Farag, R. Abonour, H. S. Boswell y H. Nakshatri (2008) Antimyeloma effects of sesquiterpene lactone parthenolide. *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1814-1822.
- Vongvanich, N., P. Kittakooop, P. Charoenchair, S. Intamas, K. Sriklung y Y. Thebtaranonth (2006). Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Medica*, 72, 1427-1430.
- Wang, G., W. Tang y R.R. Bidigare (2005) Terpenoid as therapeutic drugs and pharmaceutical agents, en: *Natural products: drug discovery and therapeutic medicine*, Zhang, L. y A.L. Demain (ed) Humana Press, Totowa, NJ. pp. 197-206.
- Weiderpass E. (2010) Lifestyle and cancer risk. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 43(6), 459-471.

- Wen, J., K. R. You, S. Y. Lee, C. H. Song y D. G. Kim (2002). The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38954-38964.
- WHO (2011) World Health Organization. Health topics. Cancer. Fact sheet. [Online] (Actualizado 2011) Disponible en: <http://www.who.int> [Acceso 1 Mayo 2011]
- Xu J. Y-Q. Guo, X. Li, K. Wei y X-j. Zhao (2008) Cytotoxic sesquiterpenoids from the ethanol extract of fruits of *Celastrus orbiculatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 175-177.
- Zhang, S., Y. K. Won, C. N. Ong y H. M. Shen (2005). Anticancer potential of sesquiterpenos lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 5, 239-249.



---

## CAPÍTULO II

### AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES DE LA CORTEZA DE *DIOSPYROS ANISANDRA*

#### 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los géneros de plantas encontrados en la península de Yucatán es *Diospyros*, perteneciente a la familia Ebenaceae. Algunas de las especies de este género han sido descritas con interesantes actividades biológicas y una variedad de compuestos han sido aislados e identificados de varias partes de la planta, como carotenoides, taninos, azúcares, hidrocarburos, lípidos, compuestos aromáticos, flavonoides, cumarinas, terpenoides, esteroides y naftoquinonas; estas últimas son las que se encuentran en mayor cantidad. La mayoría de los terpenoides encontrados de las especies de *Diospyros* pertenecen, en más del 90%, al grupo de los triterpenos, sólo un estudio ha reportado un sesquiterpeno en el género, en *D. melanoxylon*, donde se encontró el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Mallavadhani y Mahapatra, 2005; Mallavadhani *et al.*, 1998). Por otro lado, estudios previos en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en *D. anisandra*, que es endémica de la península de Yucatán, se describen compuestos sesquiterpénicos constituyentes de la corteza, como son el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, teucdiol A y selin-4(15)-en-1 $\beta$ -11diol.

En este sentido, se ha descrito que los compuestos sesquiterpénicos tienen potencial para el desarrollo de nuevos agentes para la quimioterapia del cáncer. Los compuestos de tipo sesquiterpénico que han llamado más la atención por sus efectos contra células cancerígenas son las sesquiterpen-lactonas, las cuales se encuentran en más de 100 familias de plantas y con una gran variedad de estructuras (Modzelewska *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Kinghorn *et al.*, 2004). Debido al efecto citotóxico que pueden poseer los sesquiterpenoides, en este trabajo se planteó el objetivo de aislar e identificar compuestos sesquiterpénicos de la corteza de *D. anisandra* y posteriormente evaluar la actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares cancerígenas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los disolventes utilizados fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio, y grado reactivo. Para el proceso de secado de los extractos y fracciones se utilizó un evaporador rotatorio marca Buchi RE111. Para el análisis cualitativo por cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon placas cromatográficas con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck). Los componentes separados por CCD fueron visualizados bajo luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm), además se emplearon reveladores químicos, en particular, una disolución al 4% de ácido fosfomolibdico con trazas de sulfato cérico en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%.

Para la cromatografía líquida al vacío (CLV), la fase estacionaria usada fue gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> para CCD (Merck), para la cromatografía de exclusión (CE) se empleó Sephadex LH-20 (Pharmacia, Fine chemicals, tamaño de partícula 25-100 µm), en el caso de las cromatografías en columna por gravedad (CCG) se utilizó gel de sílice de 60-200 mallas (JT Baker), para la cromatografía flash (CF) se utilizó gel de sílice 60 de 230-400 mallas y para la placa preparativa (PP) se empleó una placa cromatográfica con soporte de vidrio impregnada con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck).

El análisis por cromatografía de gases (CG) se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 y la columna HP-5MS con las siguientes condiciones de corrida 180°C (2 min), 10°C/min, 280°C (10 min). También se empleó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5975B (CG-EM) (Agilent Technologies), con la columna Ultra 1 y las siguientes condiciones de corrida 120°C (2 min), 10°C/min, 280°C (30 min).

Para los espectros de infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro Nicolet, modelo Protegé 460 y para los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se empleó un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y los desplazamientos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm). En la

determinación de la rotación óptica se empleó el polarímetro Autopol IV (Rodolph Research) para el compuesto 1 y el polarímetro Modelo 341 (Perkin Elmer) para los compuestos 2 y 3.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *Diospyros anisandra* Blake se colectó en el mes de noviembre del año 2009 en la localidad de Yaxcabá bajo la dirección del personal de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Un ejemplar de la especie se depositó en el herbario del CICY (No. de colecta MMendez 1548). De la planta se obtuvo la corteza del tallo, la cual fue secada en una incubadora a una temperatura no mayor de los 50 °C. Después de tener el material vegetal seco, éste se molió en un molino de cuchillas obteniéndose 1.31 kg de corteza de *D. anisandra*.

## 2.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

Se realizó la maceración de 367 g de corteza de *D. anisandra* con 2,500 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) durante 72 h, tres veces. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida y se obtuvo 8.5 g de extracto diclorometánico, que se denominó extracto A (rendimiento 2.4%).

La partición del extracto A se realizó disolviendo 8.4 g del extracto en 1,000 mL de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), disolución que posteriormente fue mezclada en un matraz Erlenmeyer con hexano (Hx) mediante agitación, en proporción 1:2 ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{Hx}$ ). Después se colocó la mezcla en un embudo de separación esperando que se separen las fases; el procedimiento se realizó cinco veces. Finalmente, cada fracción se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose 2.3 g de la fracción de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , denominada A1 (rendimiento 28.4%) y 5.8 g de la fracción de Hx, denominada A2 (rendimiento 71.6%). Mediante CCD se pudo observar que la mayoría de los componentes fue afín a la fase de Hx (no polar) (**Figura 11**).

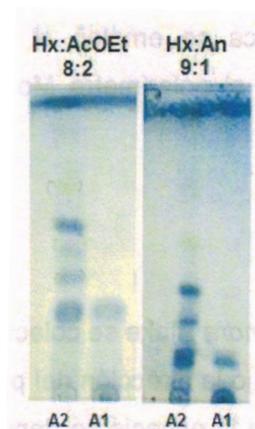


Figura 11. CCD de los extractos A1 y A2 de *D. anisandra*.

## 2.4 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS A1 Y A2

2.2 g de la fracción A1 se sometieron a una purificación por CLV usando Hx, mezclas de Hx:An (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 84:16, 82:18, 80:20, 70:30, 60:40 y 50:50), An y metanol (MeOH), como se ha reportado para una separación adecuada de sesquiterpenoides; cada fracción tuvo un volumen de 100 mL (Coll y Bowden, 1986). Se obtuvieron 30 fracciones que fueron analizadas por CCD y de acuerdo a su similitud en el perfil cromatográfico se reunieron en nueve fracciones (A1a - A1i) y una fracción (A1e') que no fue soluble en An pero sí en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fracciones finales obtenidas del extracto A1 con sus factores de retención (Rf).

Fracción	Peso (mg)	Rf de los componentes	Fracción	Peso (mg)	Rf de los componentes
A1a	10	1	A1e'	37	0.27 – 0.48
A1b	127	1	A1f	136	0.22 – 0.48
A1c	54	0.52 – 0.73	A1g	138	0.15 – 0.48
A1d	68	0.27 – 0.51	A1h	115	0.07 – 0.48
A1e	214	0.27 – 0.48	A1i	1103	0 – 0.47

Posteriormente, se realizó la CCD de las fracciones reunidas y se comparó con sesquiterpenos aislados previamente en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (Figura 12) (Uc Cachón, 2011), donde la letra G pertenece al selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y las letras D, E y F pertenecen a otros sesquiterpenos semipuros que no se lograron identificar. Al comparar por CCD los valores de Rf de los sesquiterpenos (D = 0.37, E = 0.38, F = 0.41 y G = 0.43) con las fracciones obtenidas de A1 se observó que en A1e, A1f, A1g y A1h presentaron componentes entre los valores de Rf de los sesquiterpenos aislados previamente (Rf 0.37 a 0.43) (Cuadro 3, Figura 12), por lo que fueron estas fracciones las seleccionadas para su purificación.

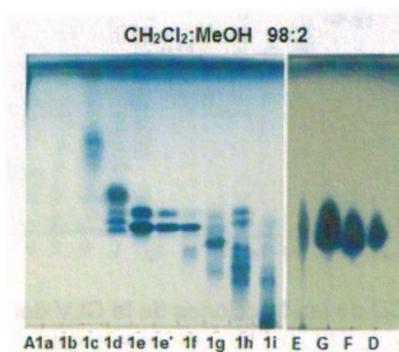


Figura 12. CCD de las fracciones de la CLV del extracto A1.

Así mismo, de acuerdo a lo reportado por Coll y Bowden (1986), 5.7 g de la fracción A2 se sometieron a una purificación por CLV; se obtuvieron 23 fracciones, que fueron analizadas por CCD, reuniéndose en nueve fracciones (A2a – A2g) de acuerdo a su similitud (Cuadro 4). Cabe señalar que de la fracción 2c se obtuvieron cristales amarillos (2c') y de la fracción 2e se separó la parte insoluble (2e') del filtrado.

Cuadro 4. Fracciones finales obtenidas del extracto A2 con sus factores de retención (Rf).

Fracción	Peso (mg)	Rf de los componentes	Fracción	Peso (mg)	Rf de los componentes
A2a	140	1	A2e	930	0.27 – 0.98
A2b	40	0.82 – 1	A2f	160	0.05 – 0.28
A2c	1280	0.80 – 1	A2g	80	0 – 0.04
A2d	560	0.47 – 0.98			

Las nueve fracciones reunidas fueron comparadas mediante CCD con los valores de Rf de compuestos sesquiterpénicos semipuros (C = 0.75, D = 0.20, E = 0.23, F = 0.21 y G = 0.25) (Figura 13) y se observó que los componentes correspondientes a dichos compuestos se encuentran en las fracciones A2d, A2e y A2f debido a que se encuentran cercanos a los valores de Rf de los sesquiterpenos (Rf 0.20 a 0.75) (Cuadro 4).

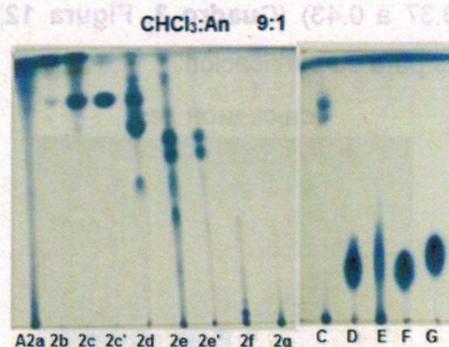


Figura 13. CCD de las fracciones de la CLV del extracto A2.

### 3. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS SESQUITERPENOIDES

#### 3.1 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 1

La fracción A1f (Cuadro 3) fue sometida a una CE empleando MeOH como fase móvil, obteniéndose 35 fracciones, las cuales se reunieron en ocho fracciones finales de acuerdo a su similitud en CCD; de éstas, la fracción dos se pasó por una CCG con gel de sílice empleando como sistema de elución mezclas de Hx:AcOEt de polaridad ascendente (85:15, 82:18, 79:21, 76:24, 73:27, 71:29, 69:31, 67:33, 65:35, 50:50) y AcOEt. Se obtuvieron 65 fracciones las cuales se reunieron en siete fracciones finales. La fracción cinco resultó ser un compuesto puro (Figura 14).

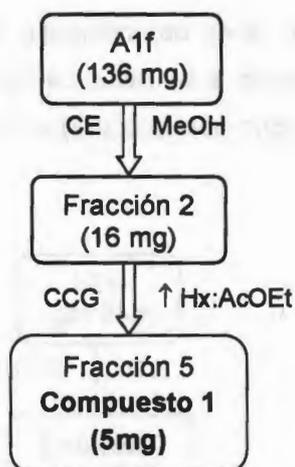


Figura 14. Proceso de purificación del compuesto 1.

**Compuesto 1 (7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol):**  $C_{15}H_{26}O_2$ ; aceite ligeramente amarillento;  $[\alpha]_D^{27} +3.80$  (c 0.01,  $CHCl_3$ ); IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3417, 2931, 1731, 1376, 1024, 684; IE-EM m/z (rel. int.): 238  $[M]^+$  (0), 220 (5), 205 (17), 202 (10), 187 (27), 177 (20), 162 (42), 147 (53), 131 (52), 120 (40), 105 (55), 91 (49), 79 (50), 67 (24), 59 (100), 55 (32), 43 (51), 39 (16); RMN- $H^1$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0.65 (3H, s, H-14), 1.24 (3H, s, H-12), 1.25 (3H, s, H-13), 1.41 (1H, H-9b), 1.53 (1H, H-2b), 1.58 (1H, H-5), 1.74 (1H, H-9a), 1.83 (1H, H-2a), 1.86 (1H, H-7), 2.01 (1H, H-3b), 2.30 (1H, H-3a), 3.53 (1H, dd,  $J = 4.8, 11.4$  Hz, H-1), 4.59 (1H, br s,  $J = 1.6$  Hz, H-15b), 4.85 (1H, br s,  $J = 1.6$  Hz, H-15a); RMN- $C^{13}$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  11.9 (C-14), 29.8 (C-12), 30.1 (C-13), 31.5 (C-2), 34.6 (C-3), 37.3 (C-9), 47.5 (C-10), 49.5 (C-7), 57.7 (C-5), 71.5 (C-11), 79.3 (C-1), 106.6 (C-15), 145.7 (C-4).

### 3.2 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 2

La fracción A2d (Cuadro 4) se sometió a una CE utilizando  $CHCl_3$ :MeOH (1:1) como sistema eluyente, obteniéndose 24 fracciones, las cuales fueron reunidas en ocho fracciones finales de acuerdo a su similitud por CCD. Las fracciones obtenidas se compararon con una fracción estándar de donde se obtuvo el compuesto 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, eligiendo a la fracción seis para re-aislar dicho compuesto. Dicha fracción se sometió a una CCG con gel de sílice, utilizando de manera

isocrática el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Hx}$  (6:4), obteniéndose 47 fracciones que se reunieron en siete fracciones finales de acuerdo a su CCD. La fracción cuatro se sometió a una PP utilizando como sistema de elución benceno (Bz):An (95:5), obteniéndose un compuesto puro (Figura 15).

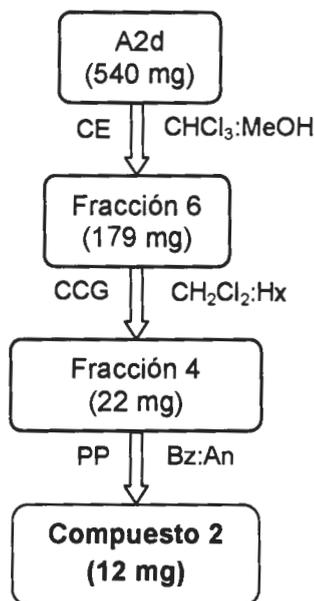


Figura 15. Proceso de purificación del compuesto 2.

**Compuesto 2 (1 $\beta$ -hidroxi-4(15), 5E,10(14)-germacatrieno):**  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ; aceite incoloro;  $[\alpha]_D^{20}$  -102.6 (c 0.0161,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3405, 2954, 2362, 1712, 1481, 1267, 1033, 736; IE-EM m/z (rel. int.): 220  $[\text{M}]^+$  (5), 205 (10), 202 (20), 187 (8), 177(23), 159 (63), 149 (16), 135 (28), 131 (35), 121 (30), 117 (42), 109 (95), 93 (54), 91 (100), 83 (14), 79 (88), 77 (62), 69 (32), 67 (45), 55 (49), 53 (29), 41 (76), 39 (33), 27 (24); RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81 (3H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-13), 0.89 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-12), 3.79 (1H, dd,  $J = 4.5, 10.3$  Hz, H-1), 4.84 (1H, s, H-15b), 4.92 (1H, s, H-15a), 5.00 (1H, s, H-14b), 5.26 (1H, s, H-14a), 5.99 (1H, d,  $J = 15.7$  Hz, H-5).

### 3.3 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 3

La fracción A2e (**Cuadro 4**) se sometió a una CF utilizando Hx, mezclas de Hx:AcOEt en gradiente de polaridad creciente (90:10, 85:15, 83:17, 81:19, 80:20, 79:21, 78:22, 77:23, 76:24, 75:25, 74:26, 73:27, 72:28, 71:30, 70:30, 69:31, 67:33, 64:36, 60:40, 50:50), AcOEt y MeOH, obteniéndose 257 fracciones, las cuales fueron reunidas en 29 fracciones finales de acuerdo con su perfil por CCD.

La fracción 12 se sometió a una CCG con gel de sílice, utilizando mezclas de Hx:AcOEt (85:15, 83:17, 81:19, 80:20, 79:21, 77:23, 72:28, 67:33, 50:50), AcOEt y MeOH, obteniéndose 116 fracciones que se reunieron en nueve finales de acuerdo a su CCD. Con base en la CG y su perfil por CCD las fracciones tres y cuatro se reunieron en una para someterlas a una CCG gel de sílice empleando mezclas de Hx:AcOEt en polaridad creciente (85:15, 84:16, 83:17 y 80:20), An y MeOH, obteniéndose 45 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron en cinco finales. De éstas, la fracción tres resultó ser un compuesto sesquiterpénico puro (**Compuesto 3**) (**Figura 16**).

Por otro lado, la fracción 13 se sometió a una CCG con gel de sílice, utilizando mezclas de Hx:AcOEt de polaridad ascendente (85:15, 83:17, 82:18, 81:19, 80:20, 79:21, 78:22, 77:23, 76:24, 74:26, 70:30, 65:35, 60:40, 50:50), AcOEt y MeOH, obteniéndose 123 fracciones que se reunieron en ocho finales de acuerdo a su similitud en CCD. Las fracciones dos, tres y cuatro se sometieron a una CCG con gel de sílice, utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH incrementando la polaridad (99:1, 95:5) y An. Se obtuvieron 26 fracciones que mediante CCD se reunieron en siete finales, de las cuales las fracciones dos y tres se purificaron mediante una CCG con gel de sílice, empleando mezclas de Hx:AcOEt (85:15, 83:17, 80:20), obteniéndose 16 fracciones, que fueron reunidas en seis finales por CCD, de éstas la fracción cuatro resultó ser un compuesto puro (**Compuesto 3**) (**Figura 16**).

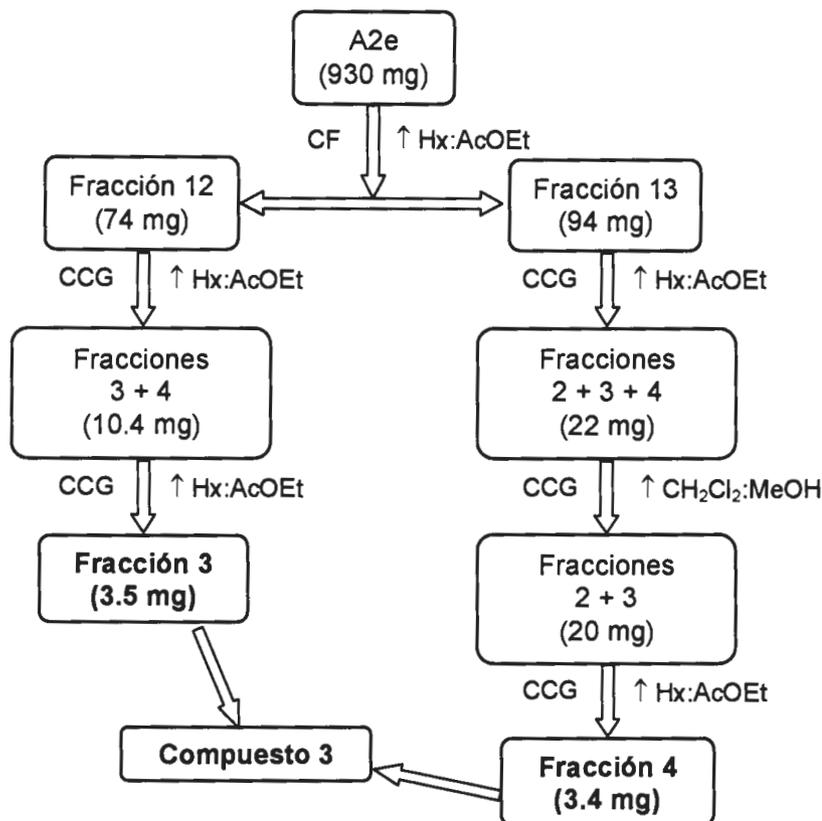


Figura 16. Proceso de purificación del compuesto 3.

**Compuesto 3 (1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno):** C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>; aceite amarillo-verdoso;  $[\alpha]_D^{20}$  +44.1 (c 0.0063, CHCl<sub>3</sub>); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3411, 2933, 1693, 1456, 1178, 1002; IE-EM m/z (rel. int.): 238 [M]<sup>+</sup> (7), 220 (49), 205 (31), 195 (8), 189 (20), 177 (33), 159 (64), 147 (30), 133 (37), 121 (78), 107 (100), 93 (80), 81 (85), 67 (55), 55 (82); RMN-H<sup>1</sup> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.70 (3H, s, H-14), 0.86 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-12), 0.95 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-13), 1.74 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-5), 1.88 (1H, m, H-2), 2.07 (1H, m, H-3), 2.24 (6H, m, H-11), 3.43 (1H, dd, J = 4.8, 11.5 Hz, H-1), 3.71 (1H, t, J = 9.8, 9.8 Hz, H-6), 4.74 (1H, d, J = 1.0, H-15b), 5.02 (1H, d, J = 1.0 Hz, H-15a); RMN-C<sup>13</sup> (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.7 (C-14), 16.2 (C-12), 18.2 (C-8), 21.1 (C-13), 26.0 (C-11), 32.0 (C-2), 35.2 (C-3), 36.3 (C-9), 41.8 (C-10), 49.4 (C-7), 55.9 (C-5), 67.1 (C-6), 79.1 (C-1), 107.9 (C-15), 146.3 (C-4).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 1

El compuesto 1 se obtuvo como un aceite ligeramente amarillento soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , An y  $\text{CHCl}_3$ . Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases-masas observándose en el cromatograma un pico mayoritario con un tiempo de retención ( $T_R$ ) de 9.61 (Figura 17).

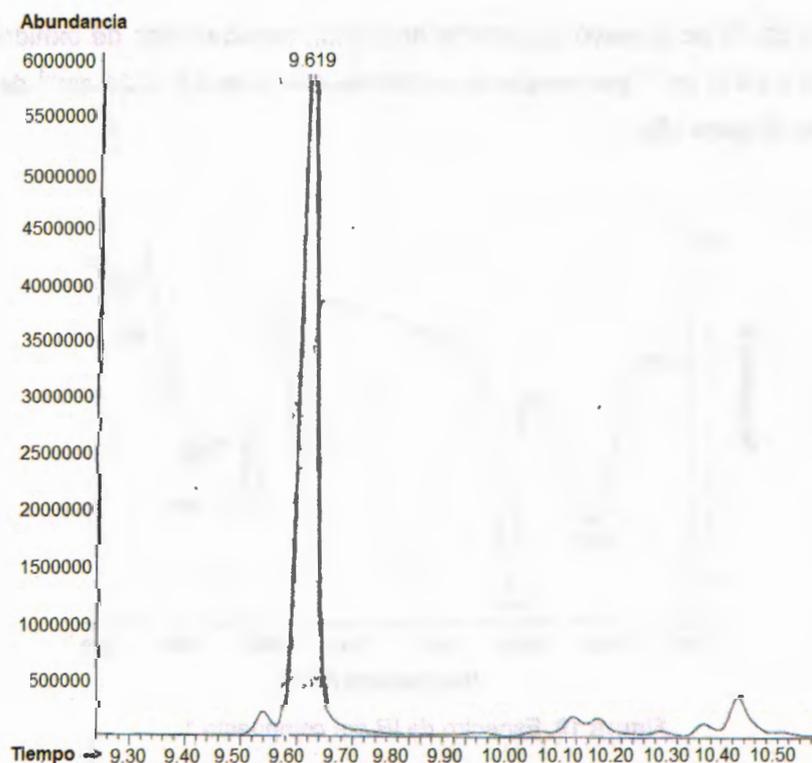


Figura 17. Cromatograma de gases del compuesto 1.

Con los estudios espectroscópicos (IR, CG-EM, RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY y ROESY) el compuesto 1 fue elucidado como 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Figura 18) como se discutirá a continuación.

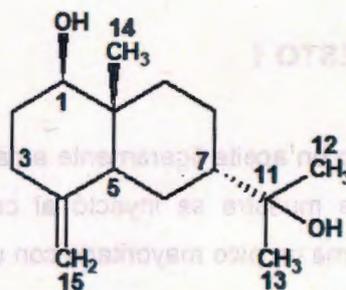


Figura 18. Estructura del compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.

En el espectro de IR se observó un pico de absorción característico de oxhidrilos a 3417  $\text{cm}^{-1}$ , otro pico a 2931  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente a enlaces C-H y otro a 1731  $\text{cm}^{-1}$  de un enlace C=C exocíclico (Figura 19).

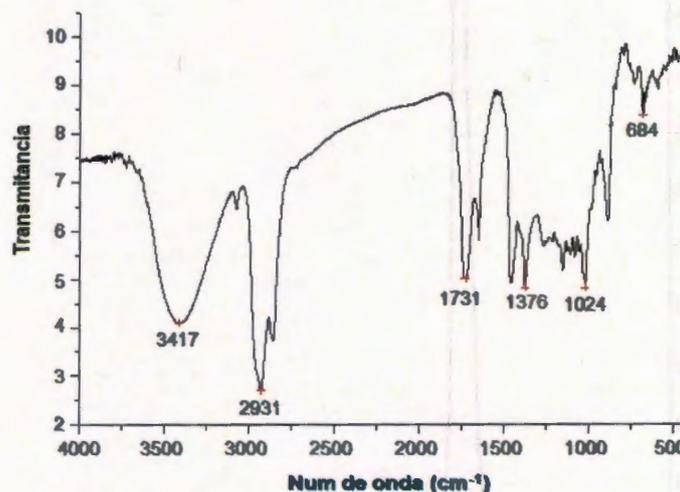


Figura 19. Espectro de IR del compuesto 1.

En el espectro de fragmentación de masas (Figura 20) se observó un fragmento de ion molecular de  $m/z$  220  $[M - 18]^+$ , además de fragmentos producidos por pérdidas de metilo de  $m/z$  205  $[220 - 15 (\text{CH}_3)]^+$ , de oxhidrilo de  $m/z$  187  $[205 - 18 (\text{H}_2\text{O})]^+$ , de isopropilo de  $m/z$  177  $[220 - 43 (\text{C}_3\text{H}_7)]^+$ , y un fragmento de un hidroxisopropilo  $m/z$  59  $[\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}]^+$  como el de mayor abundancia (pico base).

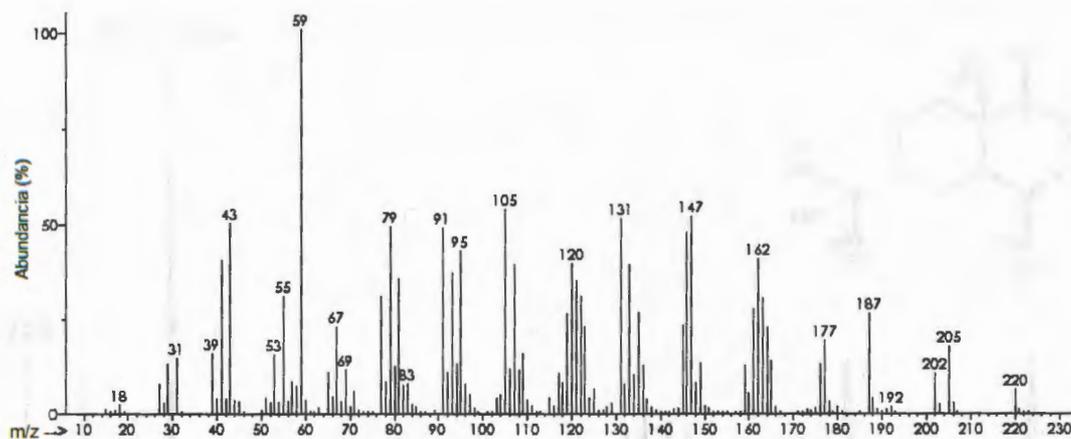
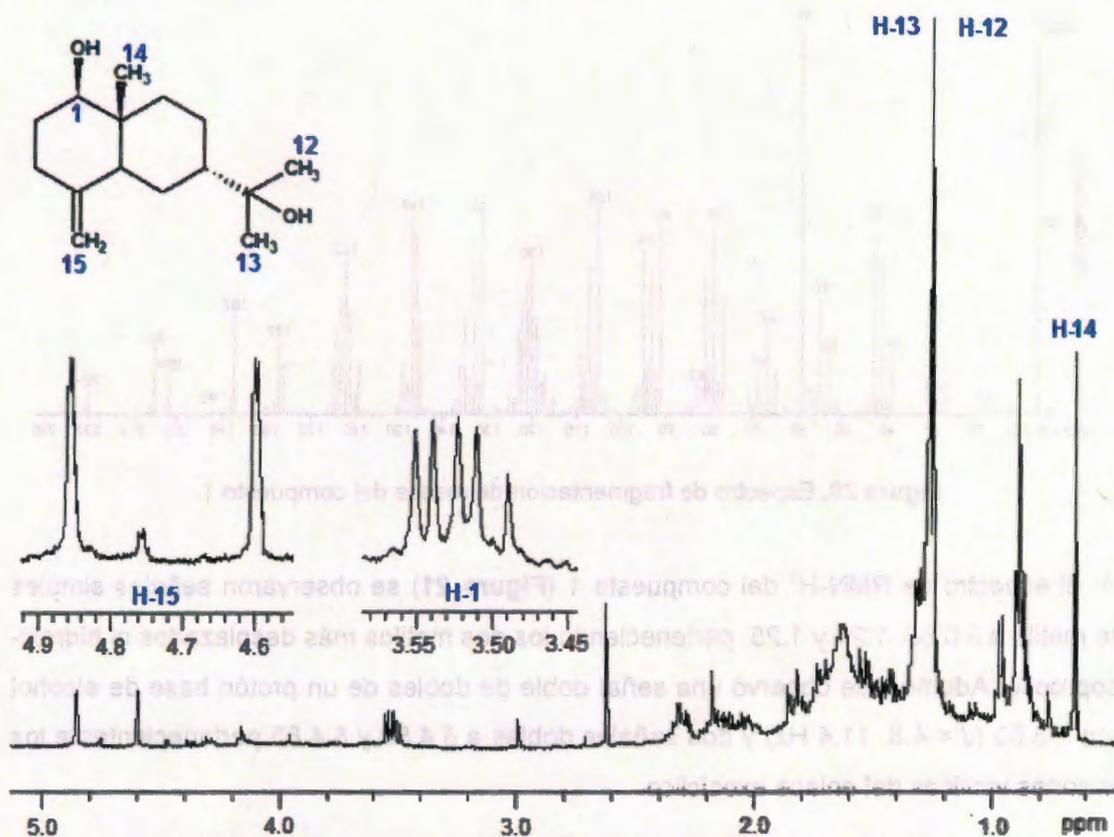


Figura 20. Espectro de fragmentación de masas del compuesto 1.

En el espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 1 (Figura 21) se observaron señales simples de metilo a  $\delta$  0.65, 1.24 y 1.25, perteneciendo los dos metilos más desplazados al hidroxisopropilo. Además, se observó una señal doble de dobles de un protón base de alcohol con  $\delta$  3.53 ( $J = 4.8, 11.4$  Hz) y dos señales dobles a  $\delta$  4.59 y  $\delta$  4.85 pertenecientes a los protones vinílicos del enlace exocíclico.



**Figura 21.** Espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando los protones de las señales características.

Con el espectro de RMN- $C^{13}$  del compuesto 1 se corroboró la presencia de carbonos vinílicos con enlace exocíclico que presentaron señales a  $\delta$  145.8 y  $\delta$  106.6 (**Figura 22**). Igualmente se corroboró la presencia de dos carbonos que son base de alcohol, a  $\delta$  79.3 y  $\delta$  71.5.

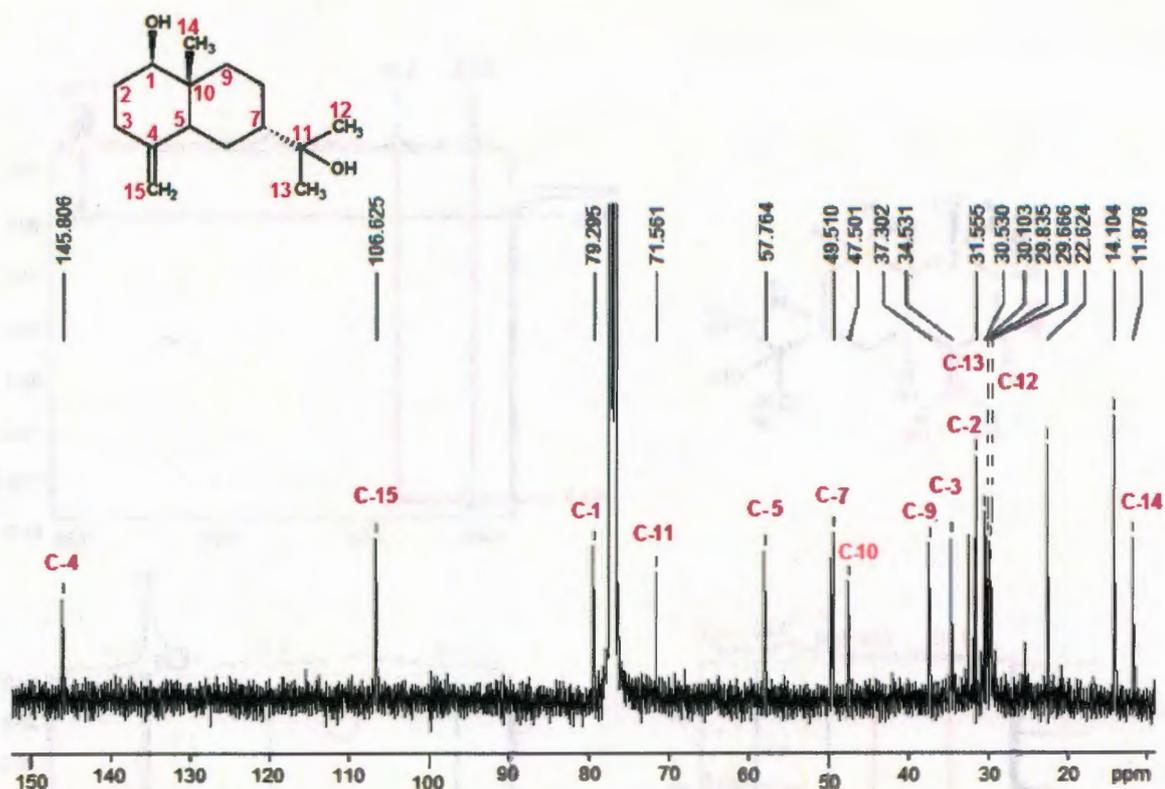


Figura 22. Espectro de C<sup>13</sup>-RMN del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1β,11-diol indicando los carbonos de cada señal.

Con el espectro de HSQC se asignaron algunos de los protones unidos directamente a carbono, como el protón H-1 (δ 3.53) a C1 (δ 79.3) que es un metino unido a oxhidrilo y los protones vinílicos (δ 4.59, 4.85) a C15 (δ 106.6) que es un carbono con doble enlace exocíclico (Figura 23, Cuadro 5).

Cuadro 5. Datos obtenidos del espectro de HSQC del compuesto 1.

Posición	H δ	C δ	Posición	H δ	C δ
1	3.53	79.3	9	1.71, 1.41	37.3
2	1.79, 1.47	31.5	12	1.24	29.8
3	2.30, 2.01	34.6	13	1.25	30.1
5	1.52	57.7	15	4.85, 4.59	106.6
7	1.81	49.5			

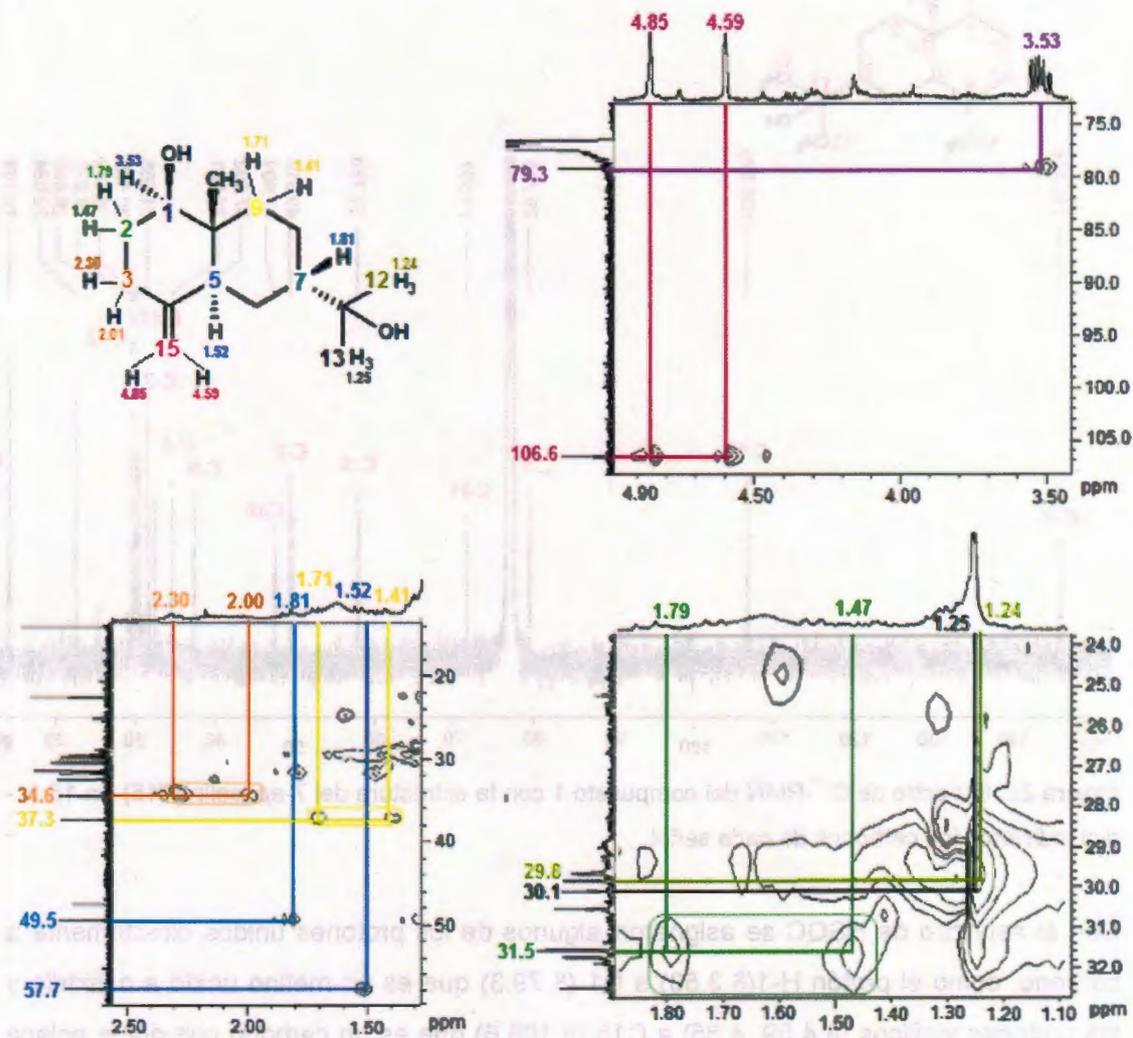


Figura 23. Ampliaciones del espectro de HSQC del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando las asignaciones de protones y carbonos.

C <sup>13</sup>	H <sup>1</sup>	Protección	C <sup>13</sup>	H <sup>1</sup>	Protección
37.3	1.79	B	31.5	1.24	B
37.3	1.47	B	30.1	1.25	B
34.6	1.81	B	29.6	1.24	B
49.5	1.52	B	31.5	1.24	B
57.7	1.41	B	31.5	1.24	B

Con el espectro de HMBC se determinaron las correlaciones a dos ( $^2J_{CH}$ ) o tres ( $^3J_{CH}$ ) enlaces de distancia entre los protones y los carbonos. Las correlaciones encontradas entre los protones vinílicos H-15a ( $\delta$  4.85) y H-15b ( $\delta$  4.59) con el C-3 ( $\delta$  34.6) y, a su vez el protón H-3a ( $\delta$  2.30) con C-1 ( $\delta$  79.3), que es el carbono base de alcohol, indican que el doble enlace y el grupo -OH se encuentran en el mismo anillo del esqueleto eudesmano y así se corrobora que C-1 es una base de alcohol. Por otro lado, el grupo metilo fue posicionado en C-10 ( $\delta$  47.4) debido a que sus protones H-14 ( $\delta$  0.65) presentaron correlaciones con C-1 ( $\delta$  79.3), C-5 ( $\delta$  57.7) y C-9 ( $\delta$  37.3); también, se observó una correlación entre el protón H-1 ( $\delta$  3.53) con C-14 ( $\delta$  11.9) (Figura 24, Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Datos obtenidos del espectro de HMBC del compuesto 1.

Posición	H $\delta$	HMBC ( $^1H$ - $^{13}C$ )	
		$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	3.53		C14
3	2.30		C1, C5, C15
7	1.81	C11	C5, C12, C13
12	1.24	C11	C7, C13
13	1.25	C11	C7, C12
14	0.65	C10	C1, C5, C9
15	4.85, 4.59		C3, C5

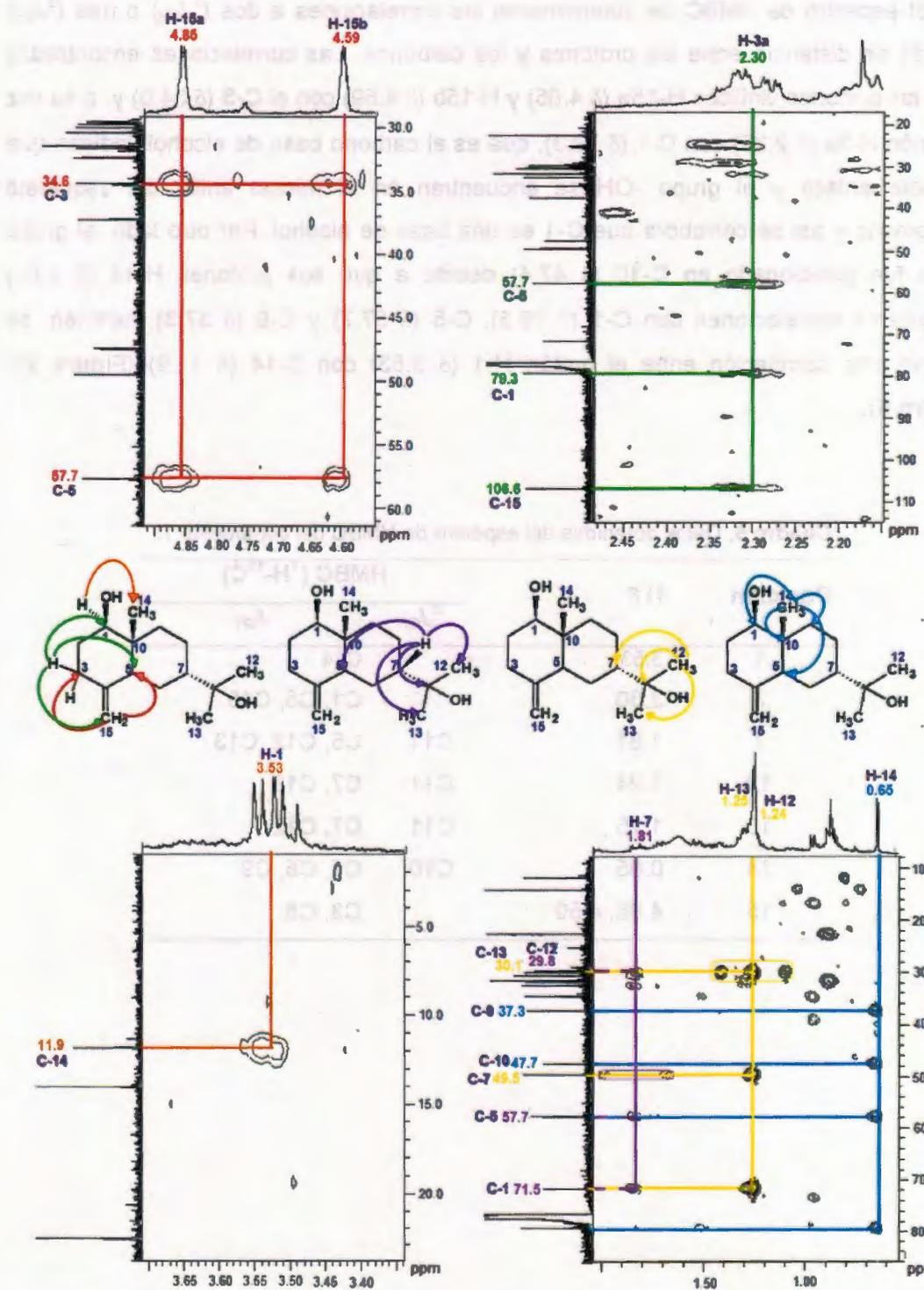


Figura 24. Ampliaciones del espectro de HMBC del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-1 $\beta$ ,11-diol indicando las correlaciones de los protones con carbonos.

Además, se corroboró que el hidroxí-isopropilo se encuentra unido a C-7 ( $\delta$  49.5) debido a que se encontraron correlaciones entre el protón H-7 ( $\delta$  1.81) con C-5 ( $\delta$  57.7), C-11 (71.5), C-12 ( $\delta$  29.8) y C-13 ( $\delta$  30.1); a su vez, los protones H-12 ( $\delta$  1.24) y H-13 ( $\delta$  1.25) correlacionaron con C-7. Así, con las correlaciones encontradas en el espectro de HMBC se pudo corroborar lo encontrado en el espectro de HSQC y se determinó que en efecto el esqueleto del compuesto 1 es de tipo eudesmano. También, se pudo asignar a C-10 la señal a  $\delta$  47.5 y a C-14 la señal de  $\delta$  11.9.

Con el espectro de COSY (Figura 25) se observó una interacción mutua entre los protones vinílicos H-15a ( $\delta$  4.85) y H-15b ( $\delta$  4.59) y el protón H-5 ( $\delta$  1.58) de un metino, así como con el protón H-3b ( $\delta$  2.01) de un metileno; este último, a su vez, se acopló con el protón H-2a ( $\delta$  1.79) de un metileno; además, el protón H-3a ( $\delta$  2.30) se acopló con el protón H-2b ( $\delta$  1.47) y el protón base de alcohol H-1 ( $\delta$  3.53) se acopló con los protones H-2a ( $\delta$  1.79) y H-2b ( $\delta$  1.47). Estas interacciones junto con las correlaciones encontradas en el espectro de HMBC corroboraron la posición de los alcoholes, uno en C-1 y otro en C-11.

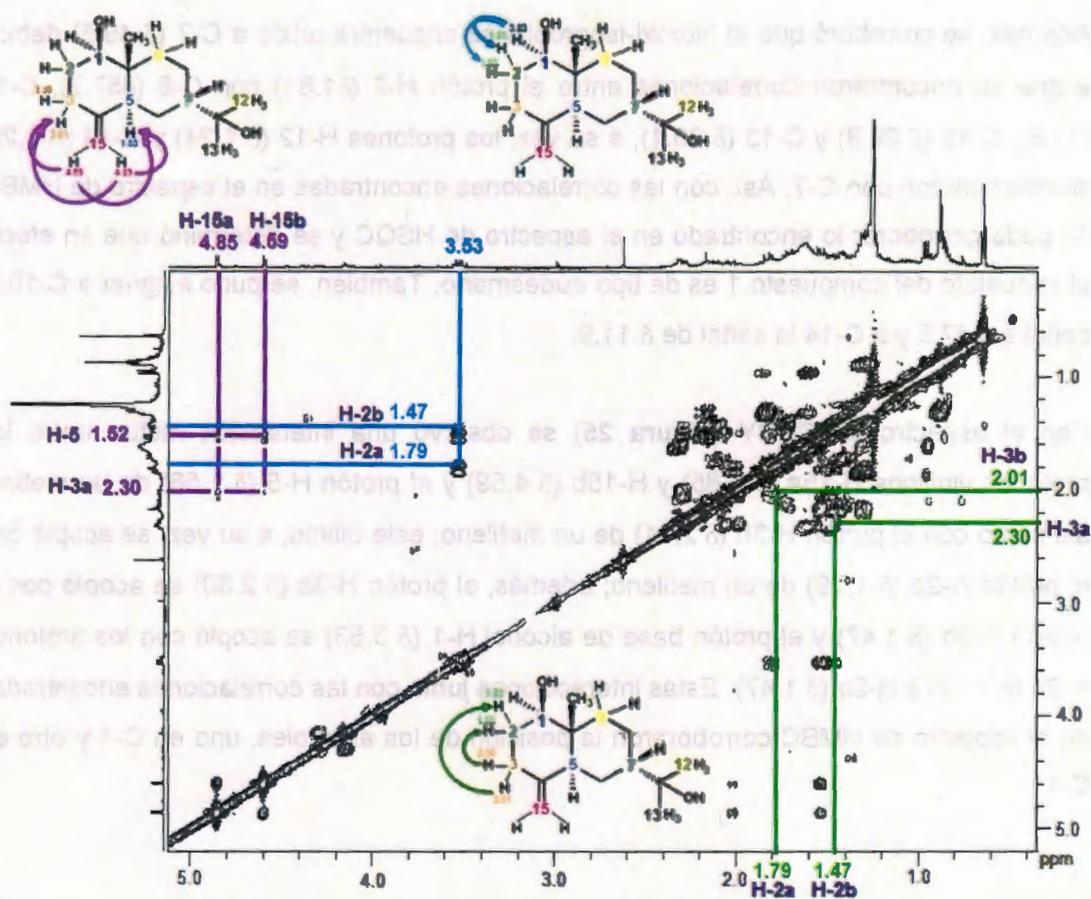


Figura 25. Espectro de COSY del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando acoplamientos entre protones.

Al comparar los datos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 1 con los reportados para el isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Cuadro 7 y Figura 26), se observó que no son iguales a los encontrados, por lo que no se descartó la posibilidad de que se tratara de su isómero 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.

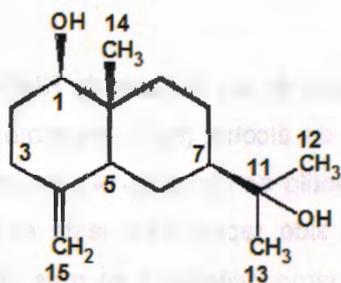


Figura 26. Estructura del isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.

Cuadro 7. Datos obtenidos por RMN-H<sup>1</sup> y RMN-C<sup>13</sup> del compuesto 1 y del isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 400 MHz y 60 MHz para RMN-H<sup>1</sup>, respectivamente).

Posición	Compuesto 1		Isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol		
	H $\delta$ (J Hz)	C $\delta$	Uc Cachón, 2011	(Adinarayana y Syamasundar, 1982)	
			H $\delta$ (J Hz)	H $\delta$ (J Hz)	C $\delta$
1	3.53 dd (4.8,11.4)	79.3	3.47 dd (4.2, 8.0)	3.40 q (5.5, 10.0)	79.1
2	1.47, 1.79	31.5	NR <sup>b</sup>	NR	31.5
3	2.01, 2.30	34.6	NR	NR	34.2
4	NA <sup>a</sup>	145.7	NR	NR	148.6
5	1.52	57.7	NR	NR	48.9
6	NA	NA	NR	NR	24.8
7	1.81	49.5	NR	NR	47.5
8	NA	NA	NR	NR	22.2
9	1.41, 1.71	37.3	NR	NR	37.0
10	NA	47.5	NR	NR	40.1
11	NA	71.5	NR	NR	72.5
12	1.24 s	29.8	1.18 d (0.8)	1.20 s	27.0
13	1.25 s	30.1		1.20 s	27.2
14	0.65 s	11.9	0.63 d (0.6)	0.68 s	10.2
15	4.85 br s (1.6)	106.6	4.80 dd (1.7, 3.5)	4.77 br s	108.0
	4.59 br s (1.6)		4.66 dd (1.7, 3.5)	4.50 br s	

<sup>a</sup>NA = No fue posible asignarlo, <sup>b</sup>NR = No fue reportado.

Las diferencias que se observaron en las señales de RMN- $H^1$  fueron las de los protones vinílicos (H-15), el protón base de alcohol (H-1), los protones de los metilos del hidroxisopropilo (H-12 y H-13) y el metilo en C-10 (H-14); no se pudieron comparar las otras señales debido a que no han sido reportadas hasta el momento. En el caso de las señales de RMN- $C^{13}$  las que fueron diferentes en más de una unidad en el valor de  $\delta$  fueron las de C-4, C-5, C-7, C-10, C-12, C-13 y C-15, lo que hizo suponer que la diferencia entre las estructuras se encontraba en la isomería del hidroxisopropilo unido a C-7. Además, no se encontraron reportes de los datos de HSQC, HMBC y COSY para el isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol para poder compararlos con los encontrados para el 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol.

Para conocer la isomería relativa del compuesto 1 se realizó la prueba espectroscópica de ROESY (**Figura 27**), en donde se observó la existencia de correlaciones espaciales de H-1 ( $\delta$  3.53) con H-2a ( $\delta$  1.79) y H-5 ( $\delta$  1.52), pero no con H-14 ( $\delta$  0.65), determinando la configuración del grupo oxhidrilo en C-1, de H-5 y el grupo metilo H-14, con una orientación  $\beta$ -,  $\alpha$ - y  $\beta$ -, respectivamente. Estos datos confirman lo reportado para compuestos *trans*-eudesmanos, los cuales son comunes de encontrar en forma natural con las orientaciones  $\beta$ - y  $\alpha$ - en las posiciones C-14 y H-5 respectivamente; por otro lado, es muy raro encontrar esqueletos *cis*-eudesmano como la melanolepina B (Saroglou *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003).

También se observaron correlaciones de H-13 ( $\delta$  1.25) con H-1 ( $\delta$  3.53) y con H-15b ( $\delta$  4.59), lo que hace suponer que la orientación del isopropilo se encuentra  $\alpha$ . Esta orientación en C-11 es lo que podría producir un mayor desplazamiento de H-12 ( $\delta$  1.24) y H-13 ( $\delta$  1.25) en el compuesto 1, debido a que se encuentra más desprotegido; en cambio, en el isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, donde la orientación de C-11 es  $\beta$ -, los desplazamientos de H-12 ( $\delta$  1.20) y H-13 ( $\delta$  1.20) son menores.

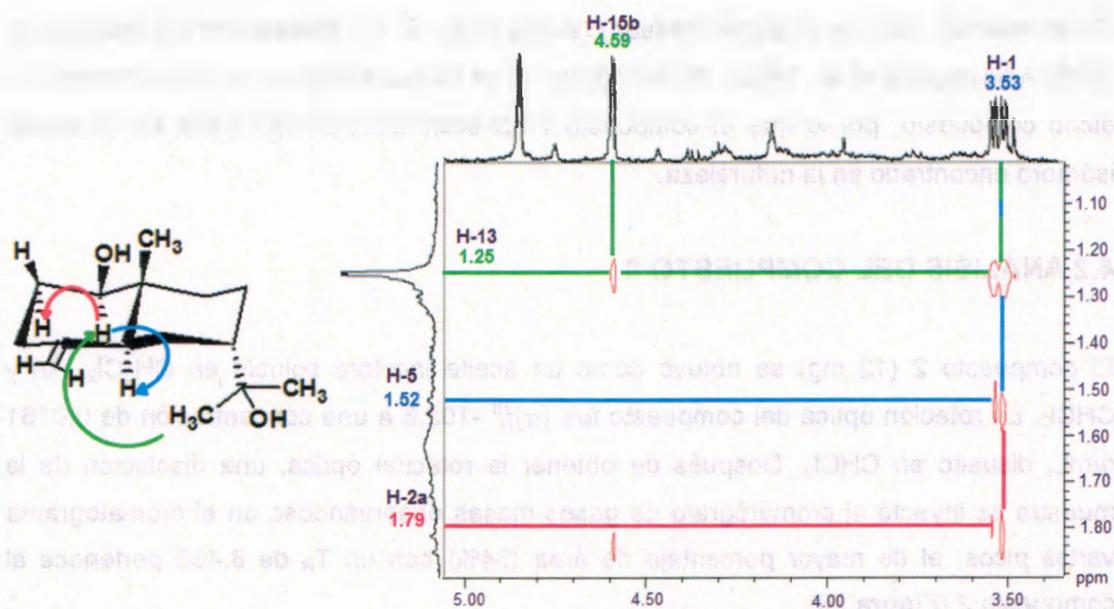


Figura 27. Ampliación del espectro de ROESY del compuesto 1 con la estructura del 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol indicando correlaciones espaciales entre protones.

Para corroborar la existencia del isómero 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, como lo muestran los datos encontrados en los espectros de RMN- $H^1$ , RMN- $C^{13}$  y ROESY se determinó la rotación óptica del compuesto 1, siendo el valor obtenido de  $[\alpha]_D^{27} +3.80$  a una concentración de 0.01 g/mL en  $CHCl_3$ . Se comparó con lo reportado para el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol que es  $[\alpha]_D^{31} +56.40$  ( $c$  1.5,  $CHCl_3$ ) y se observó diferente al del compuesto 1, lo que indica que se tratan de isómeros diferentes (Adinarayana y Syamasundar, 1982).

Anteriormente, en el grupo de investigación del CICY, se identificó en la corteza de *D. anisandra* al compuesto selin-4(15)-en-1,11-diol que posee la isomería  $\beta$  para la posición del oxhidrilo en C-1, el hidroxí-isopropilo en C-7 y el metilo en C-10; por el contrario el 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol tiene la isomería  $\alpha$  en el hidroxí-isopropilo (Uc Cachón, 2011).

El isómero selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol se ha aislado de otras especies vegetales, *Pterocarpus marsupium* (Fabaceae), *Diospyros melanoxylon* (Ebenaceae) y

*Chimonanthus praecox* (Calycanthaceae) (Wang *et al.*, 2011; Mallavadhani y Mahapatra, 2005; Adinarayana *et al.*, 1982). Sin embargo, no se ha reportado un isómero diferente de dicho compuesto, por lo que el compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol es un nuevo isómero encontrado en la naturaleza.

#### 4.2 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 2

El compuesto 2 (12 mg) se obtuvo como un aceite incoloro soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, An y CHCl<sub>3</sub>. La rotación óptica del compuesto fue  $[\alpha]_D^{20}$  -102.6 a una concentración de 0.0161 g/mL, disuelto en CHCl<sub>3</sub>. Después de obtener la rotación óptica, una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases-masas observándose en el cromatograma varios picos, el de mayor porcentaje de área (34%) con un T<sub>R</sub> de 8.438 pertenece al compuesto 2 (Figura 28).

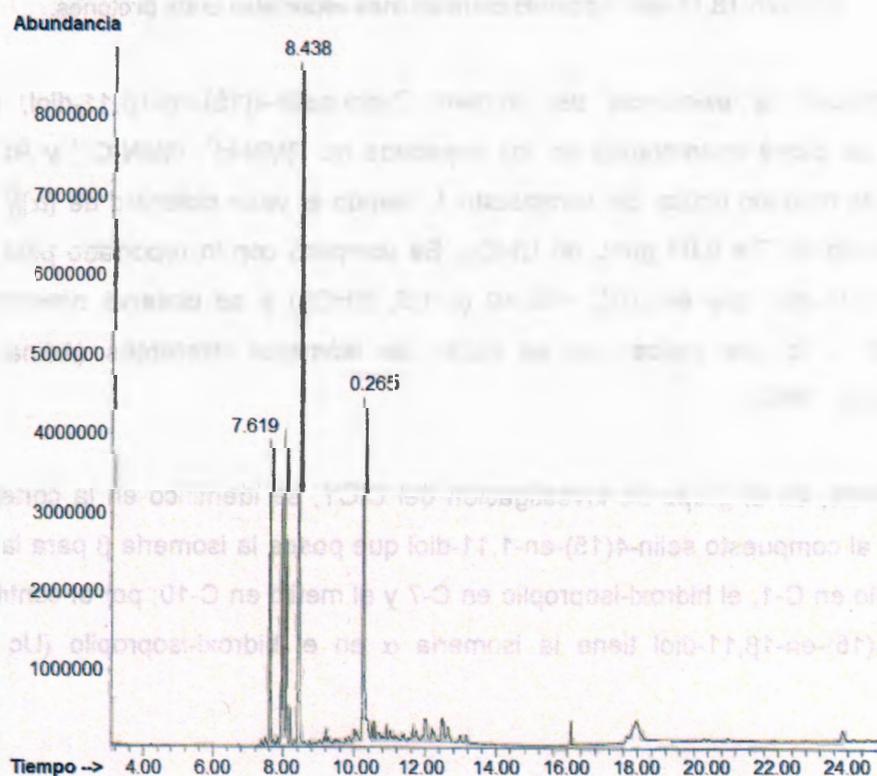


Figura 28. Cromatograma de gases del compuesto 2.

Se encontró que el compuesto 2 tiene la estructura del 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno (Figura 29) de acuerdo a la rotación óptica obtenida: para el compuesto aislado fue  $[\alpha]_D^{20}$  -102.6 (c 0.0161 g/mL, CHCl<sub>3</sub>) y lo reportado para el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno es de  $[\alpha]_D$  -102.6 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>) (Brown *et al.*, 2003).

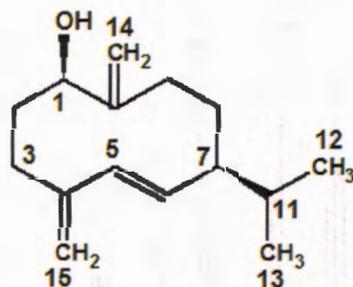


Figura 29. Estructura del compuesto 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno.

A pesar de que el compuesto se degradó (Figura 28) se corroboró la estructura mediante espectroscopia de IR, CG-EM y RMN-<sup>1</sup>H. El espectro de IR mostró un pico de absorción máxima de oxhidrilo a 3423 cm<sup>-1</sup>, de enlaces C-H a 2954 cm<sup>-1</sup> y del enlace C=C exocíclico a 1712 cm<sup>-1</sup> (Figura 30).

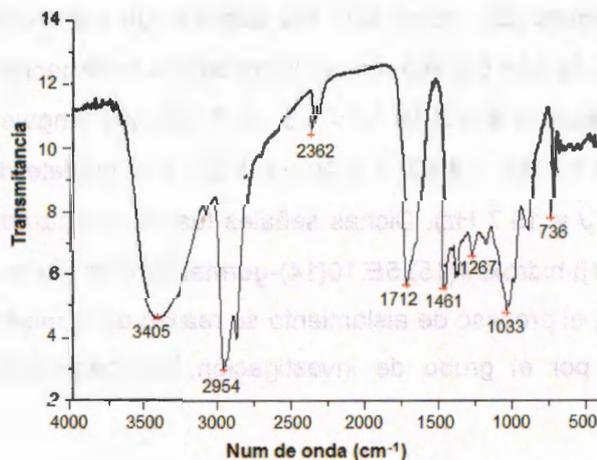
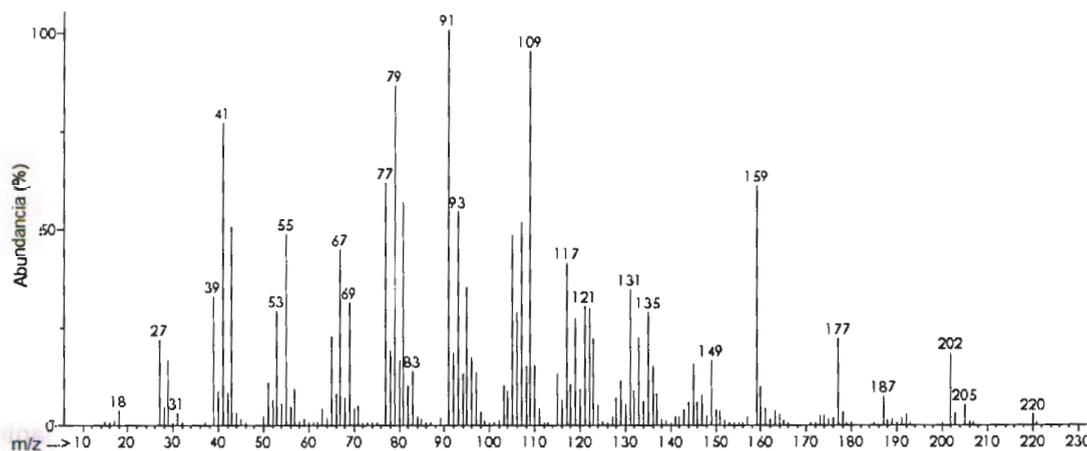


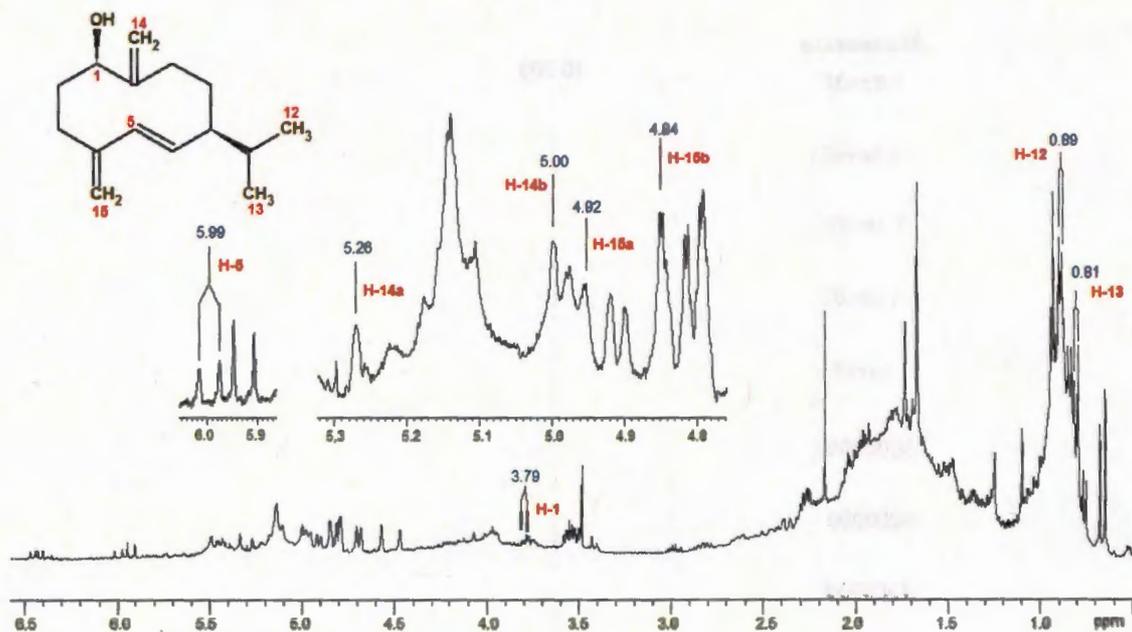
Figura 30. Espectro de IR del compuesto 2.

En el espectro de fragmentación de masas (**Figura 31**) se observó un ion molecular de  $m/z$  220  $[M]^+$  y fragmentos producidos por pérdidas de oxhidrilo de  $m/z$  202  $[M - H_2O]^+$ , de isopropilo de  $m/z$  159  $[202 - C_3H_7]^+$ , y dos iones producidos por una fragmentación retro Diels-Alder, uno de  $m/z$  91  $[C_7H_7]^+$  y otro de  $m/z$  55  $[C_4H_7]^+$  (Brown *et al.*, 2003; Bohlmann *et al.*, 1982).



**Figura 31.** Espectro de fragmentación de masas del compuesto 2.

El espectro de RMN- $H^1$  también mostró que el compuesto se había degradado, sin embargo, algunas señales similares al 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno se pudieron observar (**Figura 32**), como son: los dobletes de los protones de metilos a  $\delta$  0.81 ( $J = 7.6$  Hz) y  $\delta$  0.89 ( $J = 6.9$  Hz); un doble de dobles perteneciente al protón unido a un carbono base de alcohol a  $\delta$  3.79 ( $J = 4.5, 10.3$  Hz); los singuletes de los protones vinílicos exocíclicos a  $\delta$  4.84,  $\delta$  4.92,  $\delta$  5.00 y  $\delta$  5.26; y el doblete de un protón vinílico endocíclico a  $\delta$  5.99 ( $J = 15.7$  Hz). Dichas señales fueron comparadas con lo reportado previamente para el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno (Choi *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2003). Además, el proceso de aislamiento se realizó de la misma manera como fue aislado previamente por el grupo de investigación, comparándolo con una fracción estándar.



**Figura 32.** Espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 2 con la estructura del 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno indicando las señales de los protones característicos.

El compuesto 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno se ha aislado previamente de otras especies de plantas como son *Solidago virga-aurea* (Asteraceae), *Inula cuspidata* (Asteraceae) y *Artemisia annua* (Asteraceae) (Choi *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2003; Bohlmann *et al.*, 1982). En la corteza de *D. anisandra* dicho compuesto se encuentra en un 0.003% con respecto al peso de la planta seca, lo que indica que es un componente minoritario en la planta.

### 4.3 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 3

El compuesto 3 se obtuvo como un aceite verdoso soluble en  $CH_2Cl_2$ , An y  $CHCl_3$ . Una disolución de la muestra se inyectó al cromatógrafo de gases-masas observándose en el cromatograma un solo pico con  $T_R$  de 10.203 (Figura 33).

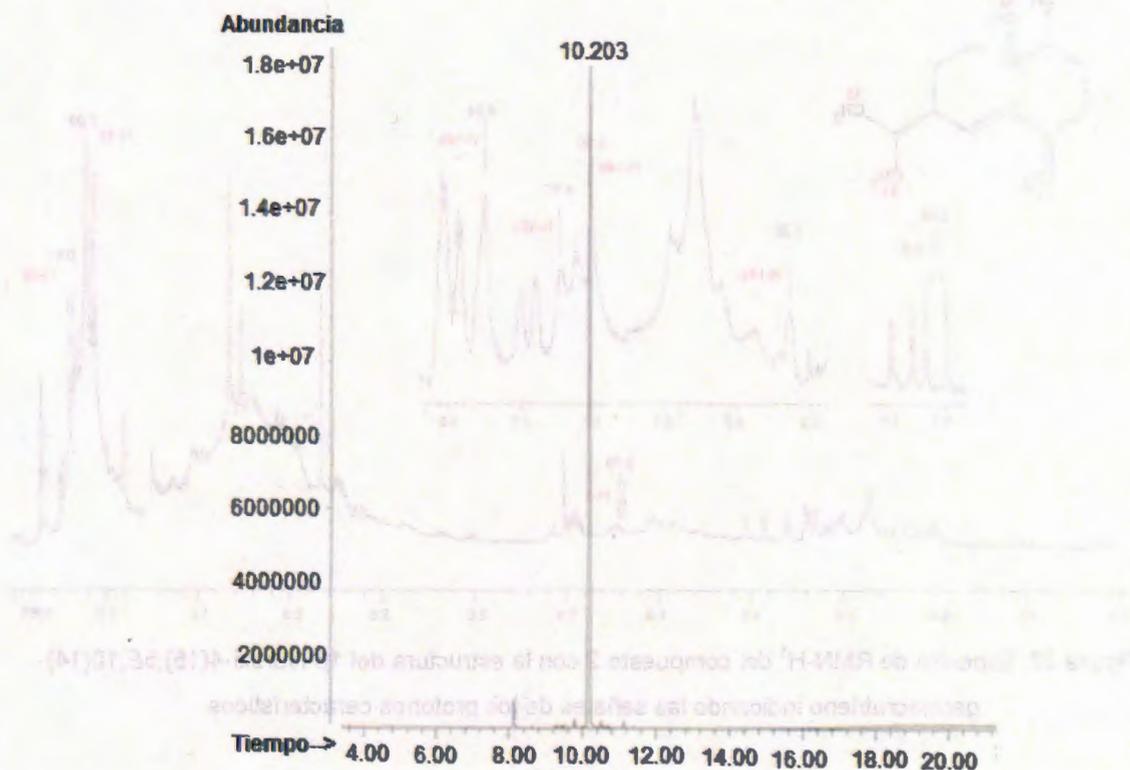


Figura 33. Cromatograma de gases del compuesto 3.

Con los estudios espectroscópicos de IR, CG-EM, RMN-H<sup>1</sup> y RMN-C<sup>13</sup>, se determinó que la estructura del compuesto 3 pertenece al 1β,6α-dihidroxi-4(15)-eudesmeno (Figura 34).

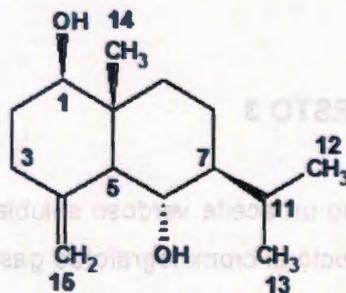


Figura 34. Estructura del compuesto 1β,6α-dihidroxi-4(15)-eudesmeno.

El espectro de IR mostró un pico de absorción de oxhidrido a 3411 cm<sup>-1</sup>, de enlaces C-H a 2933 cm<sup>-1</sup> y de enlace C=C exocíclico a 1693 cm<sup>-1</sup> (Figura 35).

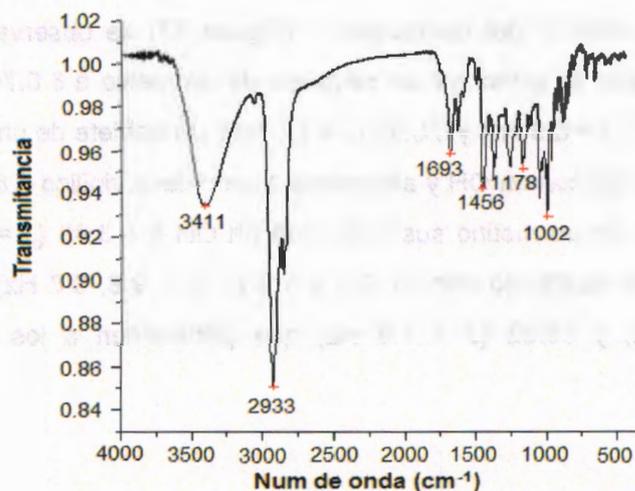


Figura 35. Espectro de IR del compuesto 3.

En el espectro de fragmentación de masas (Figura 36) se observó un ion molecular de  $m/z$  238  $[M]^+$ , y se observaron fragmentos característicos de pérdida de grupos oxhidrilo  $m/z$  220  $[M - H_2O]^+$ , de pérdidas de metilo de  $m/z$  205  $[220 - CH_3]^+$  y de un isopropilo de  $m/z$  177  $[220 - C_3H_7]^+$  (Bohlmann *et al.*, 1983).

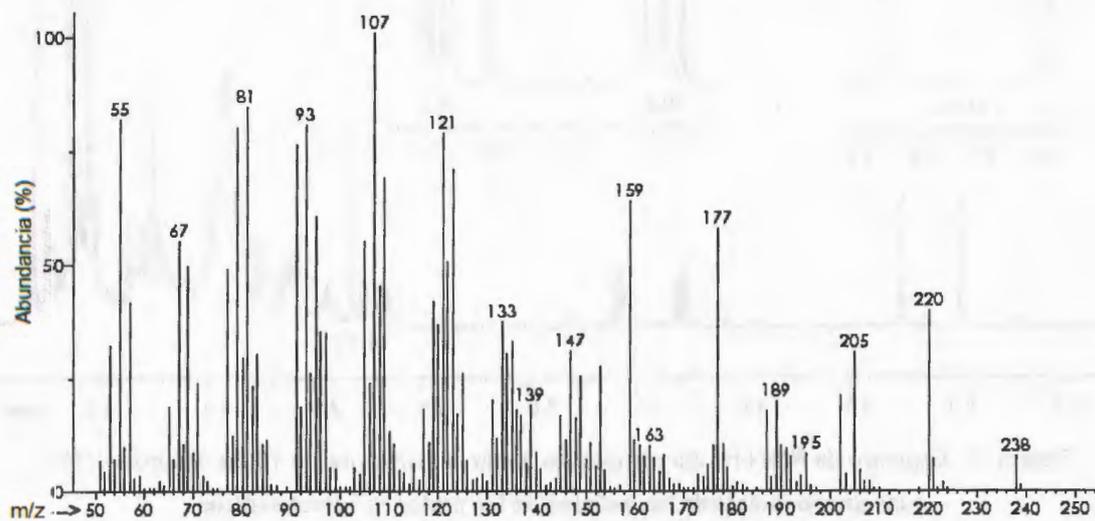


Figura 36. Espectro de fragmentación de masas del compuesto 3.

En el espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 3 (Figura 37) se observaron las siguientes señales características de protones: un singulete de un metilo a  $\delta$  0.70, dos dobletes de dos metilos a  $\delta$  0.87 ( $J = 6.9$  Hz) y  $\delta$  0.95 ( $J = 7.0$  Hz), un doblete de un metino adyacente a un carbono sustituido con un OH y adyacente a un enlace vinílico a  $\delta$  1.75 ( $J = 9.8$  Hz), un doble de dobles de un metino sustituido con un OH a  $\delta$  3.43 ( $J = 4.8, 11.5$  Hz), un triplete de un metino sustituido con un OH a  $\delta$  3.71 ( $J = 9.8, 9.8$  Hz) y dos dobletes a  $\delta$  4.74 ( $J = 1.0$  Hz) y  $\delta$  5.02 ( $J = 1.0$  Hz) que pertenecen a los protones vinílicos exocíclicos.

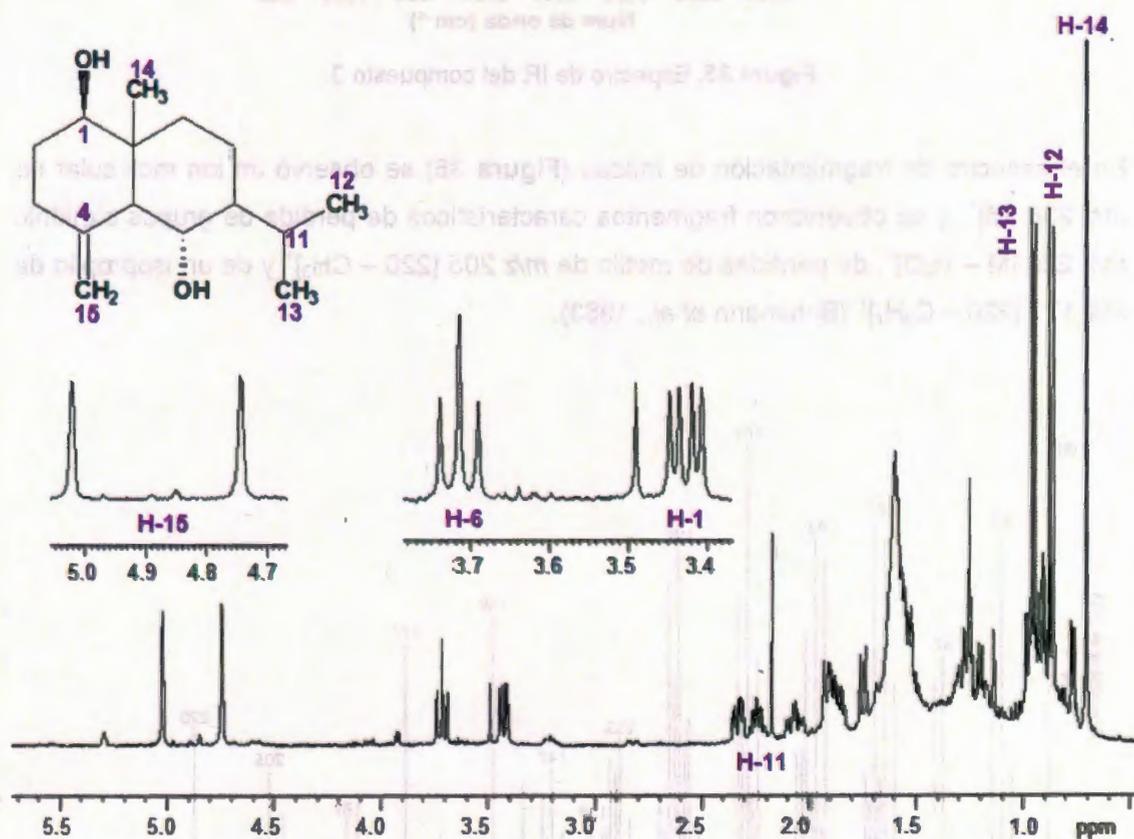


Figura 37. Espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 3 con la estructura de 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno indicando las señales de los protones característicos.

En el análisis del espectro de RMN- $H^1$  del compuesto 3 (Cuadro 8) se observó que las señales fueron similares a las del compuesto 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno, también llamado eudesm-4(15)-ene-1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (Sun *et al.*, 2004) o voleneol (Gao *et al.*, 1999).

**Cuadro 8.** Datos obtenidos por RMN- $H^1$  del compuesto 3 y 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno (400, 400, 400 y 500 MHz respectivamente,  $CDCl_3$ ).

H	Compuesto 3 $\delta$ (J en Hz)	1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno $\delta$ (J en Hz)		
		Bohlmann <i>et al.</i> , 1983	Ohmoto <i>et al.</i> , 1987	Sun <i>et al.</i> , 2004
1 $\alpha$	3.43 dd (4.8, 11.5)	3.25 dd (5, 11)	3.41 dd (4.8, 11.8)	3.42 dd (4.8, 11.7)
2	1.88 m	1.87 dddd (12, 2.5)	2 $\alpha$ = 1.84 dddd 2 $\beta$ = 1.53	2 $\alpha$ = 1.85 m 2 $\beta$ = 1.53 qd (5.0, 11.7)
3	2.07 m	2.10 ddd (14, 15)	2.06 ddd, 2.32 ddd	3 $\alpha$ = 2.35 m 3 $\beta$ = 2.09 m
5	1.74 d (9.8)	1.77 br d	5 $\alpha$ = 1.73 br d	1.75 br d (9.8)
6 $\beta$	3.71 t (9.8, 9.8)	3.73 dd (10, 10)	3.70 dd (10, 10)	3.71 td (1.7, 9.8)
7 $\alpha$	NA <sup>a</sup>	NR <sup>b</sup>	1.29	1.30 m
8	NA	NR	1.53, 1.91	8 $\alpha$ = 1.25 m 8 $\beta$ = 1.53 m
9	NA	NR	1.15, 1.22	9 $\alpha$ = 1.20 m 9 $\beta$ = 1.90 m
11	2.24 m	NR	2.23 sept d (2.0, 7.0)	2.25 sept, d (2.4, 7.0)
12	0.86 d (6.9)	0.90 d (7.0)	0.86 d (7.0)	0.87 d (7.0)
13	0.95 d (7.0)	1.00 d (7.0)	0.95 d (7.0)	0.95 d (7.0)
14	0.70 s	0.75 s	0.69 s	0.7 s
15a	5.02 d (1.0)	5.03 br s	5.01 br s	5.02 d (1.1)
15b	4.74 d (1.0)	4.76 br s	4.73 br s	4.74 d (1.1)

<sup>a</sup>NA = No fue posible asignarlo, <sup>b</sup>NR = No fue reportado.

Además, la rotación óptica del compuesto aislado fue  $[\alpha]_D^{20} +44.1$  a una concentración de 0.0063 g/mL, disuelto en  $\text{CHCl}_3$ , similar a la reportada para el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno la cual es de  $[\alpha]_D^{20} +45$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) (Sun *et al.*, 2004).

En el espectro de RMN- $\text{C}^{13}$  del compuesto 3 se observaron las señales con desplazamientos característicos de carbonos unidos a grupos oxhidrilo, a  $\delta$  67.1 y a  $\delta$  79.1; además se presentaron desplazamientos de carbonos con doble enlace exocíclico ( $\text{C}=\text{C}$ ) a  $\delta$  107.9 y  $\delta$  146.3 (Figura 38).

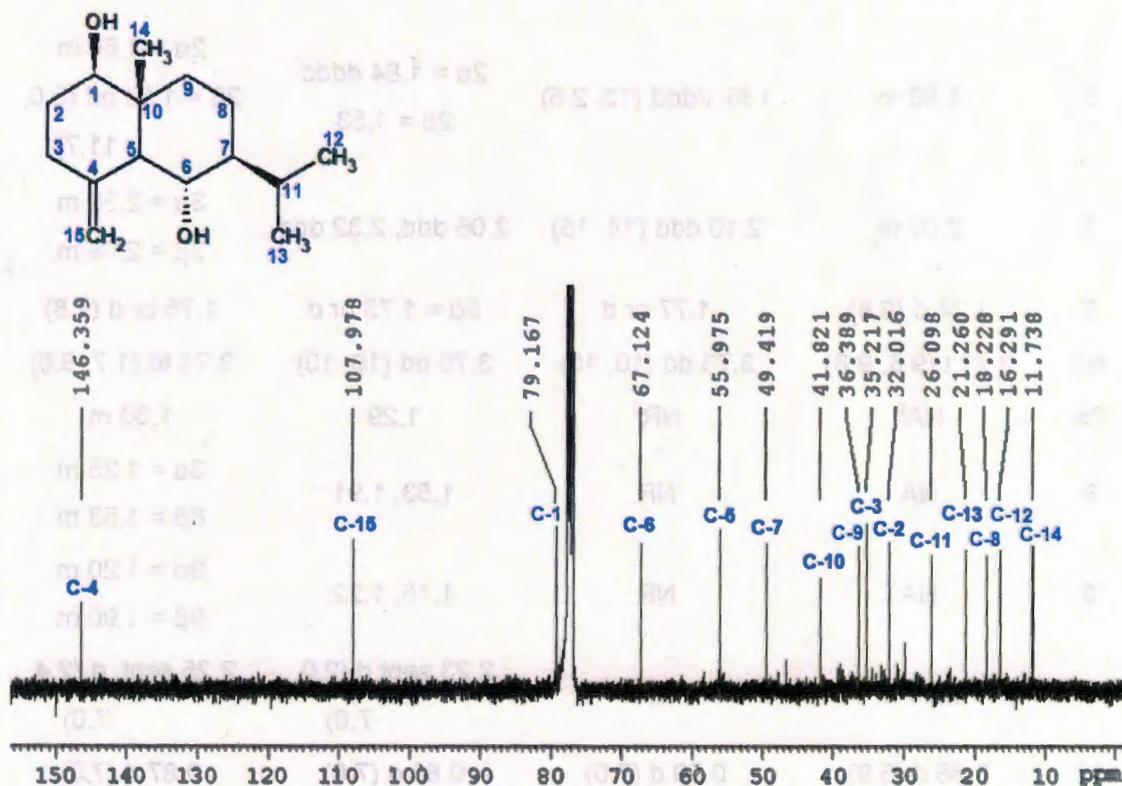


Figura 38. Espectro de RMN- $\text{C}^{13}$  del compuesto 3 con la estructura del 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno indicando las señales de los carbonos.

Al comparar las señales del espectro de RMN-C<sup>13</sup> del compuesto aislado con lo reportado para el compuesto 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno se corroboró que se trata de dicho compuesto (**Cuadro 9**).

**Cuadro 9.** Datos obtenidos por RMN-C<sup>13</sup> del compuesto 3 y del 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno (100, 75, 125, 100 MHz, respectivamente, CDCl<sub>3</sub>).

C	Compuesto 3 $\delta$	1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno $\delta$		
		Su <i>et al.</i> , 1995	Zhang <i>et al.</i> , 2003	Sun <i>et al.</i> , 2004
1	79.1	79.0	78.9	79.1
2	32.0	31.9	31.8	32.0
3	35.2	35.1	35.0	35.2
4	146.3	146.2	146.2	146.3
5	55.9	55.9	55.8	55.9
6	67.1	67.0	67.0	67.1
7	49.4	49.3	49.2	49.4
8	18.2	18.2	18.0	18.2
9	36.3	36.3	36.2	36.4
10	41.8	41.7	41.6	41.8
11	26.0	26.0	25.9	26.1
12	16.2	16.2	16.1	16.2
13	21.1	21.1	21.1	21.2
14	11.7	11.6	11.5	11.7
15	107.9	107.8	107.8	107.9

El compuesto 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno se ha aislado en varias especies de plantas pertenecientes a distintas familias, como son *Ligularia duciformis* (Asteraceae), *Ambrosia elatior* (Asteraceae), *Senecio microglossus* (Asteraceae), *Litsea verticillata*

(Lauraceae), *Crytomeria japonica* (Cupressaceae) y *Caragana intermedia* (Leguminosae) (Sun *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1995; Ohmoto *et al.*, 1987; Bohlmann *et al.*, 1983).

Previamente, se ha reportado la presencia de sesquiterpenos en el género *Diospyros*, pero es la primera vez que se encuentra el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno. Dicho compuesto se encuentra en cantidad minoritaria en la corteza de *D. anisandra*, ya que representa aproximadamente el 0.002% con respecto al peso de la planta seca.

## 5. CONCLUSIONES

Se encontraron tres sesquiterpenos en la corteza de *D. anisandra*, dos de tipo eudesmano, 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (compuesto 1) y 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno (compuesto 3), y uno de tipo germacrano, 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno (compuesto 2).

El 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (compuesto 1) es un nuevo sesquiterpenoide aislado de la naturaleza.

Los sesquiterpenos encontrados se encuentran como componentes minoritarios de la corteza de *D. anisandra*.

---

## 6. REFERENCIAS

- Adinarayana, D. y K.V. Syamasundar (1982) A new sesquiterpene alcohol from *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry*, 21(5), 1083-1085.
- Bohlmann, F., N. Ates (Gören), R.M. King y H. Robinson (1983) Two sesquiterpenes from *Senecio* species. *Phytochemistry*, 22(7), 1675-1677.
- Bohlmann, F., P. Singh y J. Jakupovic (1982) Further ineupatorolide-like germacranólidos from *Inula cuspidata*. *Phytochemistry*, 21(1), 157-160.
- Brown, G.D., G.I. Liang y L.K. Sy (2003) Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 64, 303-323.
- Choi, S.Z., S.U. Choi y K.R. Lee (2004) Pytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(2), 164-168.
- Gao, K., L. Yang y Z.J. Jia (1999) Sesquiterpenes from the roots of *Ligularia duciformis*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 46, 619-622.
- Kinghom, A. D., B. N. Su, D. S. Jang, L. C. Chang, D. Lee, J. Q. Gu, E. J. Carcache-Blanco, A. D. Pawlus, S. K. Lee, E. J. Park, M. Cuendet, J. J. Gills, K. Bhat, H. S. Park, E. Mata-Greenwood, L. L. Song, M. Jang y J. M. Pezzuto (2004). Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Medica*, 70, 691-705.
- Mallavadhani, U. V. y A. Mahapatra (2005). A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxylon*. *Natural Product Research*, 19(1), 91-97.
- Mallavadhani, U. V., A. K. Panda y Y. R. Rao (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 49(4), 901-951.
- Modzelewska, A., S. Sur, S.K. Kumar y S.R. Khan (2005) Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 5, 477-499.
- Ohmoto, T., K. Ikeda, S. Nomura, M. Shimizu y S. Saito (1987) Studies on the sesquiterpenes from *Ambrosia elatior* LINNÉ. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35(6), 2272-2279.
- Saroglou, V., A. Karioti, J. Heilmann, Z. Kyriotakis y H. Skaltsa (2007) Sesquiterpene lactones from *Anthemis melanolepis*. *Helvetica Chimica Acta*, 90, 171-175.

- Su, W.C., J.M. Fang y Y.S. Cheng (1995) Sesquiterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*, 39(3), 603-607.
- Sun, Z., B. Chen, S. Zhang y C. Hu (2004) Four new eudesmane from *Caragana intermedia* and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 67, 1975-1979.
- Uc Cachón, A.H. (2011) Metabolitos antituberculosos aislados de *Diospyros anisandra* (Blake) y *Gliocladium sp.* (cepa MRH-41). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Wang, W.X., L. Cao, J. Xiong, G. Xia y J.F. Hu (2011) Constituents from *Chimonanthus praecox* (wintersweet). *Phytochemistry Letters*, en prensa, artículo aprobado, accessible en línea 13 de mayo de 2011.
- Zhang, S., Y. K. Won, C. N. Ong y H. M. Shen (2005). Anticancer potential of sesquiterpenes lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 5, 239-249.
- Zhang, H.J., G.T. Tan, B.D. Santarsiero, A.D. Mesecar, N. Van Hung, N.M. Cuong, D.D. Soejarto, J.M. Pezzuto y H.H.S. Fong (2003) New sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *Journal of Natural Products*, 66, 609-615.

---

## CAPÍTULO III

### EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS SESQUITERPÉNICOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *DIOSPYROS ANISANDRA*

#### 1. INTRODUCCIÓN

En la investigación dedicada a la búsqueda de nuevos fármacos, la evaluación inicial de los compuestos para determinar una actividad farmacológica específica tiene como objetivo inmediato seleccionar aquellos compuestos con efectos prometedores para realizar estudios más específicos. Así, la función principal de un estudio de escrutinio es distinguir entre sustancias potencialmente activas e inactivas (Geran *et al.*, 1972).

En este sentido, determinar el efecto de los compuestos sobre la proliferación y la viabilidad de células tumorales en cultivo *in vitro* es un paso crítico inicial hacia la búsqueda de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer. Para que un compuesto sea considerado con una actividad citotóxica significativa, deberá tener una concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ )  $\leq 5 \mu\text{g/mL}$  en cultivos celulares (Burton, 2005; Geran *et al.*, 1972).

En este contexto, la elección de la línea celular para dicha evaluación es de importancia crítica; así, un simple sistema de evaluación puede ser de gran valor para la elección de un compuesto con potencial citotóxico. Por otro lado, en la ausencia de datos eficaces que relacionen el valor de la actividad citotóxica con el posible potencial del compuesto, se ha descrito que un valor de  $CC_{50}$  entre  $0.1\text{-}10 \mu\text{M}$  es un buen punto de corte para seleccionar compuestos para futuros estudios encaminados a determinar el potencial citotóxico. Adicionalmente, es importante determinar la selectividad del compuesto sobre líneas tumorales, para descartar compuestos citotóxicos no selectivos (Bugelski *et al.*, 2000).

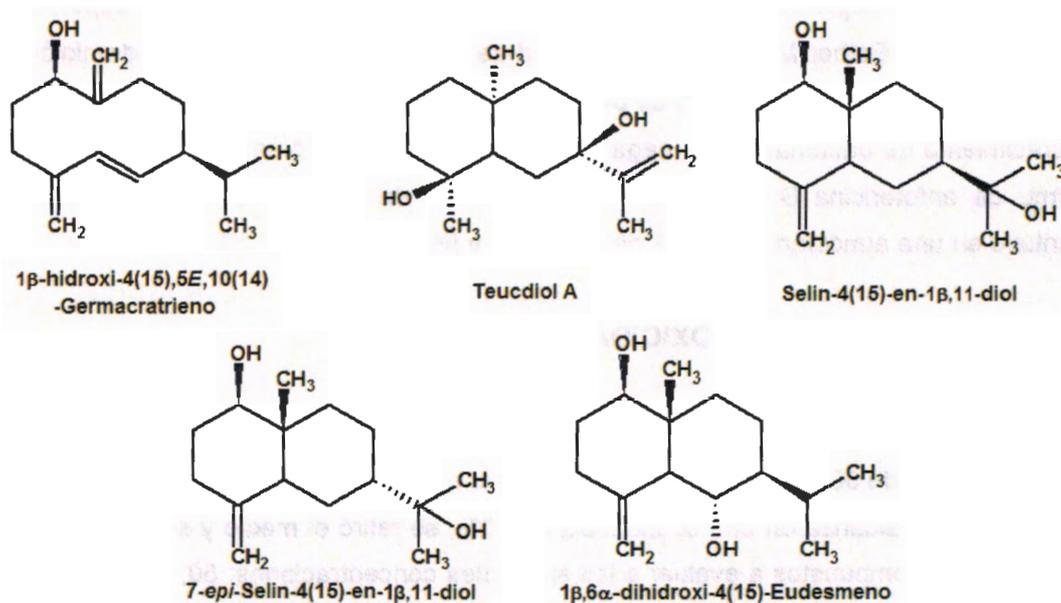
En la evaluación citotóxica *in vitro* se requiere un método sensible, reproducible y rápido. Uno de los métodos que está más cerca de cumplir los requerimientos ideales para ensayos de proliferación y citotoxicidad es el de la sulforodamina B (SRB) (Voigt, 2005; Rahman *et al.*, 1999; Keepers *et al.*, 1991).

El ensayo de SRB se basa en la habilidad del colorante SRB, un aminoxanteno rosa brillante, de unirse electrostáticamente, y dependiendo del pH, a proteínas que tengan residuos de aminoácidos básicos. Bajo condiciones ácidas leves, la SRB se une a residuos de aminoácidos básicos de células fijadas con ácido tricloroacético (TCA). Dicho colorante puede ser cuantitativamente extraído de las células y solubilizado por medio de bases débiles, como el Tris-base, para medir la densidad óptica (D.O.). Así, el ensayo de SRB es un ensayo colorimétrico de punto final, estable y rápido que mide la biomasa total de células por medio de la tinción de las proteínas celulares. Además, otras ventajas son que tiene una elevada linealidad con el número de células, elevada reproducibilidad, una menor variación entre líneas celulares, ya que no depende de la actividad enzimática de la célula, y la sensibilidad del ensayo con SRB es comparable con varios ensayos de fluorescencia (Voigt, 2005; Rahman *et al.*, 1999; Keepers *et al.*, 1991).

El ensayo de SRB ha sido empleado ampliamente para determinar la actividad citotóxica de diferentes compuestos en varias líneas celulares tumorales y normales; un ejemplo de esos compuestos son los sesquiterpenoides, los cuales son un grupo de compuestos que resultan promisorios por la actividad citotóxica reportada en la literatura (Lee *et al.*, 2006; Vichai y Kirtikara, 2006; Modzelewska *et al.*, 2005). Dichos compuestos han sido aislados de diversas especies de plantas, como son *Camchaya calcarea*, *Solanum lyratum* y *Zygogynum pancheri*, entre otras (Allouche *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009; Vongvanich *et al.*, 2006).

Recientemente, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán se han encontrado compuestos sesquiterpénicos de la corteza de *D. anisandra*, el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y el teucdiol A (Uc Cachón, 2011). Además, en este trabajo se aisló nuevamente el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno y otros dos compuestos sesquiterpénicos, el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -didihidroxi-4(15)-

eudesmeno y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Figura 39). Dichos sesquiterpenos no han sido evaluados para determinar su actividad citotóxica, por lo que en este trabajo se determinó dicha actividad empleando tres líneas celulares tumorales humanas; cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer orofaríngeo (Hep-2) y cáncer de próstata (PC-3) y una normal, células epiteliales de riñón de mono (Vero).



**Figura 39.** Estructuras de los sesquiterpenos aislados de la corteza de *D. anisandra*.

De los cinco compuestos sesquiterpénicos aislados de la corteza de *D. anisandra* se evaluaron tres de ellos, el 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, debido a que se tenía suficiente cantidad para llevar a cabo la evaluación citotóxica. En el caso del 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno no se realizó la evaluación debido a que se degradó después de haber sido re-aislado y el teucdiol A no se pudo aislar nuevamente.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares, fueron cultivadas y mantenidas en fase logarítmica de crecimiento en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), bajo la supervisión de la Dra. Rosa Esther Moo Puc de la Unidad de Investigación Clínica y Epidemiológica del IMSS. Se emplearon 10,000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas, respectivamente, además de 2.5 µg/mL de anfotericina B para inhibir el crecimiento de hongos. El cultivo celular se mantuvo en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### 2.2 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON SRB

Se incubaron las células en placas para cultivo celular de 96 pozos con medio de cultivo, a una densidad de 50,000 células/mL para obtener un crecimiento adecuado. Después de que las células alcanzaron una confluencia de 90%, se retiró el medio y se añadió medio sin SFB y los compuestos a evaluar a las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL, posteriormente se incubaron por 48 h. El procedimiento de revelado con SRB se realizó según lo reportado por Skehan *et al.* (1990) de la siguiente manera: al término del tratamiento se retiró el medio y se adicionó 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para fijar las células, incubando la placa por 30 min a 4 °C. Seguidamente, se eliminó el TCA y se añadió 30 µL de una disolución de SRB (al 4%) en ácido acético (al 1%) en cada pozo, incubando por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió la SRB y los pozos se lavaron gentilmente cuatro veces con ácido acético al 1% para eliminar el exceso del colorante. Después se solubilizó el colorante unido a las proteínas con 50 µL de una disolución de Tris-base (10 mM) y finalmente se midió la densidad óptica a 490 nm usando un espectrofotómetro. Cada evaluación se realizó por triplicado y los datos de citotoxicidad se reportaron como CC<sub>50</sub> (Vichai y Kirtikara, 2006; Skehan *et al.*, 1990). Los valores de CC<sub>50</sub> de cada compuesto se determinaron a partir de las curvas

de concentración-efecto (% de muerte celular) mediante el análisis de regresión lineal, con el empleo del paquete estadístico GraphPad Prism, versión 5.

### 2.3 ÍNDICE DE SELECTIVIDAD

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales fue necesario obtener información sobre su toxicidad en células normales. Por lo tanto los extractos fueron probados contra una línea Vero. El índice de selectividad (IS) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ célula Vero}}{CC_{50} \text{ célula de cáncer}}$$

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en el **Cuadro 10**, los compuestos aislados de la corteza de *D. anisandra*, presentaron valores de  $CC_{50}$  mayores a 22  $\mu M$  (5  $\mu g/mL$ ) en las líneas celulares evaluadas. Dicha concentración fue considerada como un punto de corte para elegir compuestos activos para proponer posteriores estudios preclínicos y clínicos para el tratamiento del cáncer.

**Cuadro 10.** Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos aislados de la corteza de *D. anisandra*.

Compuesto	$CC_{50}^a$ para las líneas celulares $\mu M$ [IS <sup>b</sup> ]			
	Vero	HeLa	Hep-2	PC-3
7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol	290	--- <sup>c</sup>	---	294 [1]
1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno	627	280 [2]	---	214 [3]
selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol	---	---	---	---
Docetaxel	4.1	0.29 [14]	1.1 [4]	0.37 [11]

<sup>a</sup> Concentración citotóxica media; <sup>b</sup> IS = índice de selectividad; <sup>c</sup> ---  $CC_{50} > 300 \mu M$  (72  $\mu g/mL$ ).

Sobre el compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol y el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol no se encontraron estudios sobre alguna actividad biológica, por lo que éste sería el primer reporte donde se evalúa su actividad citotóxica. Sin embargo, no presentó una actividad citotóxica significativa como se muestra en el Cuadro 10. Dos estructuras similares, el  $\beta$ -eudesmol y el 3,5-eudesmadien-11-ol (Figura 40), han presentado actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer. En el caso del  $\beta$ -eudesmol, el cual ha sido aislado del rizoma de *Atractyloides lancea*, se ha reportado que inhibe la proliferación celular de una manera dependiente de la concentración y el tiempo en las líneas humanas de cáncer cervicouterino (HeLa), de hígado (BEL-7402) y de estómago (SGC-7901), con un porcentaje de inhibición máximo a una concentración de 22  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ M) después de 72 h de tratamiento, de 87%, 50% y 39%, respectivamente. El efecto del  $\beta$ -eudesmol en las células HeLa fue mayor al producido por cisplatino (70  $\mu$ M) a las 72 h. Además, se determinó su efecto *in vivo* en ratones a los que se les indujo el crecimiento de tumor, observando que disminuye el tamaño del tumor a una dosis de 1.25 y 5 mg/Kg, en un 37% y 49%, respectivamente (Ma *et al.*, 2008).

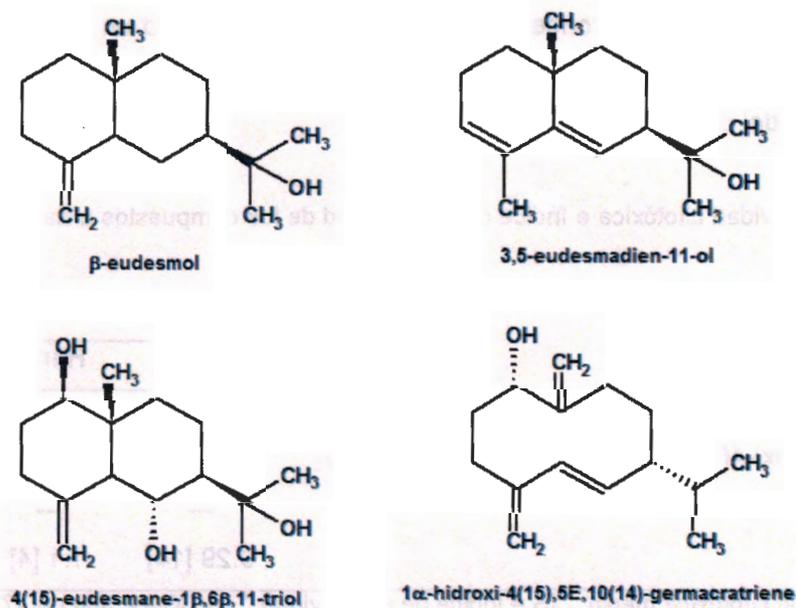


Figura 40. Sesquiterpenoides citotóxicos similares a los encontrados en *D. anisandra*.

En el caso del 3,5-eudesmadien-11-ol, aislado de las partes aéreas de *Santolina rosmarinifolia*, tuvo una actividad citotóxica con una  $CC_{50} \leq 5 \mu\text{g/mL}$  ( $22 \mu\text{M}$ ), sobre líneas celulares de leucemia murina (P-38), cáncer de pulmón humano de células no pequeñas (A-549), cáncer de colon humano (HT-29) y melanoma humano (MEL-28) (Barrero *et al.*, 1999). Una de las diferencias en las estructuras es la ausencia del grupo oxhidrilo en el carbono 1 del  $\beta$ -eudesmol, y en el 3,5-eudesmadien-11-ol, además de la ausencia de ese oxhidrilo, se encuentran dos dobles enlaces endocíclicos en vez de un solo doble enlace exocíclico. En relación a la estructura-actividad de los compuestos, la ausencia de grupos oxhidrilo y la presencia de dobles enlaces aumentan la lipofilicidad de la molécula, facilitando el paso a través de las membranas celulares con el consiguiente incremento de la concentración intracelular (Ghantous *et al.*, 2010).

En el caso del  $1\beta,6\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno la actividad que ha sido reportada es su efecto antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Gao *et al.*, 1999). El isómero de dicho compuesto, 5,7-*epi*- $1\beta,6\beta$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno, presentó una débil actividad contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con un valor de  $10 \mu\text{g/mL}$  en la línea celular de linfocitos humanos MT-2 infectados con el virus VIH (cepa IIIB) (Sun *et al.*, 2004).

Sin embargo, como se ve en el **Cuadro 10**, el  $1\beta,6\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno no presentó una actividad citotóxica significativa contra las líneas celulares HeLa, Hep-2 y PC-3. Un compuesto similar, el 4(15)-eudesmane- $1\beta,6\alpha,11$ -triol (**Figura 40**), que fue aislado de las partes aéreas de *Santolina rosmarinifolia*, presentó actividad citotóxica, con una  $CC_{50} \leq 5 \mu\text{g/mL}$  ( $22 \mu\text{M}$ ), contra las líneas celulares P-388, A-549, HT-29 y MEL-28 (Barrero *et al.*, 1999). Se ha propuesto que la presencia de grupos oxhidrilo aumenta la polaridad de un compuesto, aunque su localización podría ser apropiada para aumentar la bioactividad del compuesto (Ghantous *et al.*, 2010). Así, la presencia del grupo oxhidrilo en el carbono 11 del isopropilo de 4(15)-eudesmane- $1\beta,6\alpha,11$ -triol podría influir en su actividad citotóxica.

En el caso del  $1\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno se ha descrito que es activo contra varias líneas celulares, cáncer humano de colon (HCT15), adenocarcinoma

---

humano de pulmón de células no pequeñas (A549), cáncer humano de ovario (SK-OV-3), melanoma humano (SK-MEL-2) y cáncer del sistema nervioso central (XF498); los efectos citotóxicos reportados fueron de 3.12  $\mu\text{g/mL}$  (14.17  $\mu\text{M}$ ), 3.13  $\mu\text{g/mL}$  (14.21  $\mu\text{M}$ ), 3.75  $\mu\text{g/mL}$  (17.06  $\mu\text{M}$ ), 2.71  $\mu\text{g/mL}$  (12.30  $\mu\text{M}$ ) y 3.15  $\mu\text{g/mL}$  (14.34  $\mu\text{M}$ ), respectivamente (Choi *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo no fue posible evaluar su actividad debido a que después de aislarlo, dicho compuesto se degradó y no fue posible aislar más, pero era de esperar que posiblemente presentara actividad contra las líneas evaluadas.

Por otro lado, en el estudio de Choi (2004), el isómero 1 $\alpha$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno no presentó actividad citotóxica significativa con las líneas celulares empleadas, ya que presentó una  $\text{CC}_{50}$  mayor a 6.6  $\mu\text{g/mL}$  (30  $\mu\text{M}$ ) (Choi *et al.*, 2004). Se ha sugerido que en el caso de isómeros la disposición espacial del compuesto influye en la actividad, por lo que posiblemente la posición  $\alpha$  del oxhidrilo e isopropilo del 1 $\alpha$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno no sean adecuados para la actividad citotóxica del compuesto (Ghantous *et al.*, 2010).

#### 4. CONCLUSIÓN

Los compuestos sesquiterpénicos encontrados en la corteza de *D. anisandra*, el 7-epi-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -didihidroxi-4(15)-eudesmeno y selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, no fueron significativamente citotóxicos contra las líneas celulares Vero, HeLa, Hep-2 y PC-3.

---

## 5. REFERENCIAS

- Allouche, N., C. Apel, M.T. Martin, V. Dumontet, F. Guéritte y M. Litaudon (2009) Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, 70, 546-553.
- Barrero, A.F., M.M. Herrador, J.F. Quilez, R. Alvarez-Manzaneda, D. Portal, J.A. Gavin, D.G. Gravalos, M.S.J. Simmonds y W.M. Blaney (1999) Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, 51, 529-541.
- Bugelski P.J., U. Atif, S. Molton, I. Toeg, P.G. Lord y D.G. Morgan (2000) A strategy for primary high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. *Pharmaceutical Research*, 17 (10), 1265-1272.
- Burton, J. K. (2005). The MTT Assay to Evaluate Chemosensitivity, en: *Methods in Molecular Medicine*, vol 110: Chemosensitivity, Vol 1: *In Vitro* Assays, Blumenthal, R. D. (ed) Human Press. Totowa, New Jersey. pp. 69-78.
- Choi, S.Z., S.U. Choi y K.R. Lee (2004) Pytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(2), 164-168.
- Gao, K., L. Yang y Z.J. Jia (1999) Sesquiterpenes from the roots of *Ligularia duciformis*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 46, 619-622.
- Ghantous, A., H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N.A. Saliba y N. Darwiche (2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today*, 12(15), 668-678.
- Geran, R.I., N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Shumacher y B.J. Abbott (1972) Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological system. *Cancer Chemotherapy Reports*, Part 3, 103.
- Keepers, Y.P., P.E. Pizao, G.J. Peters, J. van Ark-Otte, B. Winograd y H.M. Pinedo (1991) Comparasion of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*, 27(7), 897-900.

- Lee, S.O., S.Z. Choi, S.U. Choi, G.H. Kim, Y.C. Kim y K.R. Lee (2006) Cytotoxic terpene hydroxyperoxide from the aerial parts of *Aster spathulifolius*. *Archives of Pharmacal Research*, 29(19), 845-848.
- Ma, E.L., Y.C. Li, H. Tsuneki, J.F. Xiao, M.Y. Xia, M. Wang y I. Kimura (2008)  $\beta$ -Eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(2), 159-167.
- Modzelewska, A., S. Sur, S.K. Kumar y S.R. Khan (2005) Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry – Anti-cancer Agents*, 5, 477-499.
- Rahman A., M.I. Chaudhary y J.W. Thomsen (1999) *A Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research*. Harwood Academic Press, Amsterdam. 27-41 p.
- Ren, Y., L. Shen, D.W. Zhang y S.J. Dai (2009) Two new sesquiterpenoids from *Solanum lyratum* with cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(4), 408-410.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Momks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney y M.R. Boyd (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Sun, Z., B. Chen, S. Zhang y C. Hu (2004) Four new eudesmane from *Caragana intermedia* and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 67, 1975-1979.
- Uc Cachón, A.H. (2011) Metabolitos antituberculosos aislados de *Diospyros anisandra* (Blake) y *Gliocladium sp.* (cepa MRH-41). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vichai, V. y K. Kirtikara (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.
- Voight, W. (2005) Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity, en: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 110: Chemosensitivity, vol. 1: *In Vitro* Assays, Blumenthal, R. D. (ed) Humana Press. Totowa, N.J. pp. 39-48.
- Vongvanich, N., P. Kittakooop, P. Charoenchair, S. Intamas, K. Sriklung y Y. Thebtaranonth (2006). Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Medica*, 72, 1427-1430.

---

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

#### 1. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se realizó el estudio fitoquímico del extracto diclorometánico de la corteza de *Diospyros anisandra* el cual fue particionado con hexano y acetonitrilo. La fracción hexánica resultante fue purificada hasta obtener dos compuestos sesquiterpénicos conocidos, el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y el 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacartrieno, de tipo eudesmano y germacrano, respectivamente. Dichos compuestos fueron elucidados mediante la comparación de los datos espectroscópicos y la rotación óptica específicos encontrados con lo reportado en la literatura para esos compuestos (Sun *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2003).

Por otro lado, de la fracción acetonitrílica se obtuvo un nuevo sesquiterpeno, el 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, de tipo eudesmano. Dicho compuesto se determinó como nuevo debido a que los datos espectroscópicos y la rotación óptica específicos encontrados no coincidieron con lo reportado para el compuesto conocido selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (Uc Cachón, 2011; Adinarayana y Syamasundar, 1982). Además, las correlaciones espaciales encontradas en el espectro de ROESY indicaron la isomería diferente en el hidroxioisopropilo.

El compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, el 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y otro compuesto previamente aislado de la misma planta, el selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, fueron evaluados en tres líneas celulares de cáncer (HeLa, Hep-2 y PC-3) y una normal (Vero), pero no demostraron una actividad citotóxica significativa ya que presentaron CC<sub>50</sub> mayores a 5  $\mu$ g/mL (22  $\mu$ M).

Comparando la actividad citotóxica de los compuestos evaluados con otros de estructura similar que sí fueron significativamente activos, como el 3,5-eudesmadien-11-ol y el 4(15)-eudesmane-1 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,11-triol, se observó que posiblemente la presencia y posición de

grupos oxhidrilo y dobles enlaces, así como la disposición espacial de la estructura, influyen en el efecto citotóxico de los sesquiterpenos aislados (Ghanthous *et al.*, 2010; Barrero *et al.*, 1999).

El compuesto 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno no fue evaluado debido a que se degradó después de ser aislado y de haberle determinado la rotación óptica.

## 2. CONCLUSIONES GENERALES

Se aislaron tres sesquiterpenos de la corteza de *Diospyros anisandra* dos conocidos, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5*E*,10(14)-germacatrieno, y uno nuevo, 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol. Dichos compuestos se encontraron como componentes minoritarios de la corteza seca.

Los sesquiterpenos 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol (previamente aislado de la misma planta), no presentaron una actividad citotóxica significativa contra tres líneas celulares de cáncer (HeLa, Hep-2 y PC-3) y una normal (Vero).

## 3. PERSPECTIVAS

El compuesto 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 $\beta$ ,11-diol debe ser aislado nuevamente para determinar su configuración espacial absoluta mediante difracción de rayos X o dicroísmo circular, y confirmar el isómero que se propone en este trabajo.

A los compuestos aislados y evaluados que no presentaron actividad citotóxica se les puede realizar modificaciones estructurales relacionadas con la actividad citotóxica, mediante distintas reacciones químicas, como la introducción de un anillo de lactona ya que se ha observado que la presencia de este anillo influye en la actividad citotóxica de estos compuestos (Ghanthous *et al.*, 2010).

A pesar de que los sesquiterpenos aislados no fueron significativamente citotóxicos, no se puede descartar la posibilidad de que dichos compuestos puedan presentar actividades diferentes relacionadas con el cáncer, como son la anti-proliferativa, la anti-angiogénica o la anti-metastásica. Un ejemplo de esto es el  $\beta$ -eudesmol, que a una concentración de 22  $\mu\text{g/mL}$  (100  $\mu\text{M}$ ) inhibe la proliferación celular de líneas tumorales y la angiogénesis (Ma *et al.*, 2008).

Por otro lado, el compuesto 1 $\beta$ -hidroxi-4(15),5 $E$ ,10(14)-germacatrieno debe ser re-aislado y evaluado contra las líneas celulares, ya que existen reportes de la actividad citotóxica de dicho compuesto sobre líneas tumorales humanas de colon (HCT15), de pulmón (A549), de ovario (SK-OV-3), de melanona (SK-MEL-2) y del sistema nervioso central (XF498) (Choi *et al.*, 2004).

#### 4. REFERENCIAS

- Adinarayana, D. y K.V. Syamasundar (1982) A new sesquiterpene alcohol from *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry*, 21(5), 1083-1085.
- Barrero, A.F., M.M. Herrador, J.F. Quilez, R. Alvarez-Manzaneda, D. Portal, J.A. Gavin, D.G. Gravalos, M.S.J. Simmonds y W.M. Blaney (1999) Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, 51, 529-541.
- Brown, G.D., G.I. Liang y L.K. Sy (2003) Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 64, 303-323.
- Choi, S.Z., S.U. Choi y K.R. Lee (2004) Pytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(2), 164-168.
- Ghantous, A., H. Gali-Muhtasib, H. Vuorela, N.A. Saliba y N. Darwiche (2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today*, 12(15), 668-678.
- Ma, E.L., Y.C. Li, H. Tsuneki, J.F. Xiao, M.Y. Xia, M. Wang y I. Kimura (2008)  $\beta$ -Eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(2), 159-167.
- Sun, Z., B. Chen, S. Zhang y C. Hu (2004) Four new eudesmane from *Caragana intermedia* and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 67, 1975-1979.
- Uc Cachón, A.H. (2011) Metabolitos antituberculosos aislados de *Diospyros anisandra* (Blake) y *Gliocladium* sp. (cepa MRH-41). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.