



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN FITOFARMACOLÓGICA

“Estudio químico de *Sapium nitidum* en búsqueda de sustancias bioactivas
(citotóxicas y anti-inflamatorias)”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. ESTELA VELASCO BARRIOS.
MATRÍCULA 2113804098

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: Dr. Guillermo Delgado Lamas.
Asesora: Dra. María Concepción Lozada García.
Asesora: Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Junio, 2014.

“Estudio químico de *Sapium nitidum* en búsqueda de sustancias bioactivas (citotóxicas y anti-inflamatorias)”.

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Guillermo Delgado Lamas.
Vo. Bo. Tutor

Dra. María Concepción Lozada García.
Vo. Bo. Asesora

Dra. María Isabel Aguilar Laurents.
Vo. Bo. Asesora

Q.F.B. Estela Velasco Barrios.
Matrícula: 2113804098

“Estudio químico de *Sapium nitidum* en búsqueda de sustancias bioactivas (citotóxicas y anti-inflamatorias)”.

JURADO

Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Presidente

M.C. Antonio Nieto Camacho
Vocal

Dra. María Concepción Lozada García
Secretaria

RESUMEN

No existen estudios previos acerca de la composición química y actividad biológica de las hojas de *Sapium nitidum* (Euphorbiaceae). Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo aislar del extracto de diclorometano-metanol de las hojas de *Sapium nitidum* (Euphorbiaceae) los principales metabolitos secundarios y evaluar su actividad anti-inflamatoria y citotóxica.

Del extracto de diclorometano-metanol se aislaron y caracterizaron estructuralmente los siguientes metabolitos secundarios: palmitato de β -amirilo (**60**), palmitato de lupeílo (**61**), acetato de lupeílo (**62**), 3β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (**63**), alcohol lipídico (**64**), β -sitosterol (**65**), estigmasterol (**66**), cicloeucalenol (**67**), ácido graso (**68**), 3β -palmitoiloxi- 1β , 11α -dihidroxi-olean-12-eno (**69**) y β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**). Se corrigió la configuración del C-11 de la estructura **69**, para la cual se informó originalmente que el hidroxilo en ese átomo de carbono tenía orientación β , y en este trabajo se estableció con orientación α .

La actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados y del extracto total se evaluó utilizando los modelos de inducción del edema por ATF y carragenina encontrándose una relación estrecha entre la estructura química y la actividad biológica. La presencia de los dos grupos hidroxilos en el compuesto **69** le confirieron una mayor actividad anti-inflamatoria comparada con **60** que no presentó ningún grupo hidroxilo en su estructura, además la presencia de un grupo cetónico en el C-11 de **63** disminuyó su actividad anti-inflamatoria comparada con **60**.

Por otra parte, **69** disminuyó significativamente los niveles de mieloperoxidasa lo que sugiere que la inhibición de migración de neutrófilos al sitio de inflamación es parte de su mecanismo anti-inflamatorio esto se confirmó por el análisis de correlación de Pearson de todas las biopsias de **69** donde se encontró una correlación positiva ($r = 0.67$, $p < 0.05$), indicando que la inhibición del edema de **69** está asociado con la inhibición de la infiltración de neutrófilos en la biopsia de la oreja. El efecto anti-inflamatorio producido por **69** y su menor toxicidad comparada con la indometacina

podría hacerlo un candidato para ser evaluado terapéuticamente en diversas enfermedades inflamatorias.

La actividad citotóxica del extracto total y de los compuestos puros aislados se evaluó utilizando el método de tinción con Sulforrodamina B obteniéndose que solo el extracto total mostró actividad citotóxica frente a la línea celular K562 (leucemia) esto podría deberse al sinergismo entre todos los compuestos que integran el extracto total o por la presencia de un metabolito secundario que no fue aislado. Su especificidad por esta línea celular nos sugiere que actúa inhibiendo la proliferación de las células eritropoyéticas mediante diferentes mecanismos de acción.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (Número de becario 412011).

A la Coordinación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por toda la paciencia, apoyo y por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. María Concepción Lozada García por toda su ayuda, apoyo y consejos para la culminación de mi proyecto de investigación.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial.

Al M.C. Antonio Nieto Camacho con especial agradecimiento por la asesoría brindada durante la revisión de mi proyecto de investigación y por todo su apoyo, entusiasmo y dedicación en la realización de las pruebas anti-inflamatorias.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por haber aceptado formar parte de mi jurado y por todos sus comentarios durante la revisión de mi escrito.

A mis compañeros del laboratorio 1-C del Instituto de Química de la UNAM por su amistad y consejos brindados durante la realización de mi proyecto.

Al Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa por el apoyo brindado para la realización de las pruebas anti-inflamatorias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

*A mis padres, por todo su apoyo y amor incondicional.
A Miguel Hernández, por formar parte de esta etapa de mi vida.*

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	16
2. Antecedentes	17
2.1. Familia Euphorbiaceae	17
2.2. Química de la familia Euphorbiaceae	18
2.2.1. Diterpenos	19
2.2.2. Triterpenos	20
2.2.3. Alcaloides	21
2.2.4. Flavonoides	21
2.3. Actividad farmacológica y usos tradicionales de algunas especies de la Familia Euphorbiaceae	22
3. Marco teórico	24
3.1. Generalidades del género <i>Sapium</i>	24
3.2. Química y actividad farmacológica del género <i>Sapium</i>	24
3.2.1. Diterpenos	24
3.2.2. Triterpenos	25
3.2.3. Flavonoides	26
3.2.4. Alcaloides	27
3.3. Generalidades de <i>Sapium nitidum</i>	28
4. Planteamiento del problema	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	30
7. Material y métodos	31
7.1. Material	31
7.2. Metodología	32
7.2.1. Colecta de la especie vegetal	32
7.2.2. Preparación del extracto	32

	Página
7.2.3. Separación y aislamiento de los metabolitos secundarios	32
7.2.3.1. Fraccionamiento primario	32
7.2.3.2. Columna B	33
7.2.3.3. Columna C	34
7.2.3.4. Columna D	34
7.2.3.5. Columna E	35
7.2.3.6. Columna F	35
7.2.3.7. Columna G	36
7.2.4. Actividad biológica	36
7.2.4.1. Ensayo de inhibición de la inflamación inducida por ATF en oreja de ratón	36
7.2.4.2. Contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5, 5'-tetrametilbencidina)	37
7.2.4.3. Ensayo del edema plantar de ratón inducido por carragenina	38
7.2.4.4. Ensayo de citotoxicidad por el método de tinción con Sulforrodamina B	39
7.2.5. Análisis estadístico	39
8. Resultados y discusión	40
8.1. Elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados	40
8.1.1. Palmitato de β -amirilo (60)	40
8.1.2. Palmitato de lupeílo (61)	42
8.1.3. Acetato de lupeílo (62)	45
8.1.4. 3β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (63)	46
8.1.5. Alcohol lipídico (64)	49
8.1.6. Mezcla β -sitosterol y estigmasterol (65) y (66)	50

	Página
8.1.7. Cicloeucaleol (67)	51
8.1.8. Ácido graso (68)	53
8.1.9. 3 β -palmitoiloxi-1 β , 11 α -dihidroxi-olean-12-eno (69)	55
8.1.10. β -D-glucósido de β -sitosterilo (20)	57
8.2. Actividad biológica	58
8.2.1. Ensayo de inhibición de la inflamación inducida por ATF en oreja de ratón	58
8.2.2. Contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el Método de TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina)	62
8.2.3. Ensayo del edema plantar de ratón inducido por carragenina	64
8.2.4. Ensayo de citotoxicidad por el método de tinción con Sulforrodamina B (SRB)	66
9. Resumen y Conclusiones	69
10. Referencias	71
11. Anexos	75

	Página
Lista de figuras	
Figura 1. <i>Sapium nitidum</i> (Monach) Lundell	29
Lista de gráficas	
Gráfica 1. Contenido de MPO en el modelo de edema auricular de ratón inducido por ATF.	63
Gráfica 2. Actividad anti-inflamatoria de 69 por método de edema plantar de ratón inducido por carragenina.	64
Lista de tablas	
Tabla 1. Fraccionamiento primario del extracto DCM-MeOH 1:1 de las hojas de <i>Sapium nitidum</i>	33
Tabla 2. Ensayo preliminar de la actividad anti-inflamatoria por ATF	59
Tabla 3. DI ₅₀ del compuesto 69 por método de edema auricular de ratón inducido por ATF	61
Tabla 4. Actividad anti-inflamatoria de 69 por método de edema plantar de ratón inducido por carragenina	65
Tabla 5. Ensayo preliminar de la actividad citotóxica por método con SRB	66

Lista de espectros

Espectro 1. IR (CHCl ₃) de 60	76
Espectro 2. EM-IE de 60	77
Espectro 3. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 60	78
Espectro 4. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 60	79
Espectro 5. IR (CHCl ₃) de 61	80
Espectro 6. EM-IE de 61	81
Espectro 7. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 61	82
Espectro 8. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 61	83
Espectro 9. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 62	84
Espectro 10. RMN ¹³ C (75.4 MHz, CDCl ₃) de 62	85
Espectro 11. IR (CHCl ₃) de 63	86
Espectro 12. EM-IE de 63	87
Espectro 13. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 63	88
Espectro 14. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 63	89
Espectro 15. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 64	90
Espectro 16. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 65 y 66	91
Espectro 17. IR (CHCl ₃) de 67	92
Espectro 18. EM-IE de 67	93
Espectro 19. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 67	94
Espectro 20. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 67	95
Espectro 21. IR (KBr) de 68	96
Espectro 22. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 68	97
Espectro 23. EM-IE de 69	98
Espectro 24. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 69	99
Espectro 25. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 69	100
Espectro 26. RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de 20	101

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

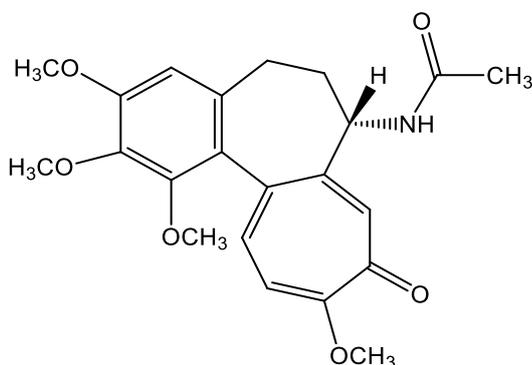
° C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol
Å	Angstrom
AINE	Fármaco anti-inflamatorio no esteroideo
ATCA	Ácido tricloroacético
ATF	13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
BHTA	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CIM	Concentración inhibitoria mínima
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Cromatografía en Placa Analítica
<i>d</i>	Señal doble
DCM-MeOH	Diclorometano-metanol
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>ddd</i>	Señal doble de doble de dobles
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DI ₅₀	Dosis inhibitoria media
DL ₅₀	Dosis letal media
EEM	Error estándar de la media
EM-IE	Espectrometría de masas de impacto electrónico
h	Horas
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
LOX	Lipooxigenasa
<i>m</i>	Señal múltiple
m	Metro
M ⁺	Ion molecular
m/z	Relación masa/carga
MHz	Megahertz
MPO	Mieloperoxidasa
N	Normalidad
nm	Nanómetro
PCC	Proteína Cinasa C
Pf.	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Señal simple
SRB	Sulforrodamina B
<i>t</i>	Señal triple
<i>t</i> -DCTN	<i>Trans</i> -dehidrocrotonina
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
TMS	Tetrametilsilano
UV	Espectrometría de Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humano
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda (cm ⁻¹)

1. INTRODUCCIÓN

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios constituyen un grupo importante; enfermedades como artritis reumatoide, gota, asma o trastornos neurodegenerativos implican reacciones inflamatorias en algunos casos incapacitantes para quienes la padecen (Yesilada y cols. 1997).

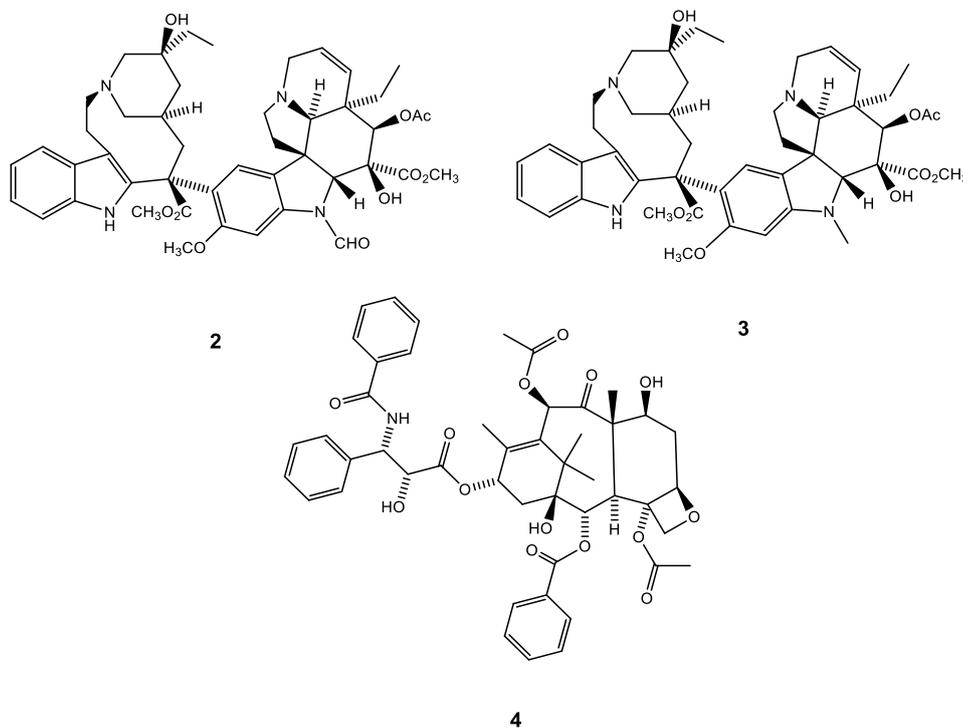
Además, muchas otras dolencias menores que se presentan diariamente involucran procesos inflamatorios como respuesta natural del organismo como traumas físicos y alergias. Como consecuencia, existe necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes anti-inflamatorios más seguros y eficaces. El uso de las plantas medicinales o de sus componentes activos representa una alternativa cada vez más explorada y promisoría para el tratamiento de numerosos desórdenes inflamatorios (Srinivasan y cols. 2001; Choi y Hwang 2003). Como ejemplo podemos citar a la colchicina (**1**), un alcaloide tricíclico aislado de *Colchicum autumnale* utilizado para el tratamiento de la gota, reumatismo y otras enfermedades inflamatorias como la fiebre mediterránea familiar (Niel y Scherrmann 2006; Cocco y cols. 2010).



1

Otra de las enfermedades más prominentes en las últimas décadas es el cáncer, el cual es la principal causa de muerte en el mundo y en 2008 representó un total de 7.6 millones de defunciones (OMS). El uso de los metabolitos secundarios de las plantas como fuente de nuevos fármacos ha estimulado el interés científico y comercial en el descubrimiento de nuevos agentes anti-cáncer de fuentes naturales. De 1981 a 2010

del total de fármacos anti-cancerígenos lanzados al mercado el 11.1 % provino de productos naturales (Newman y Cragg 2012). Como ejemplo podemos mencionar a los alcaloides vincristina (**2**) y vinblastina (**3**) aislados de la Apocinácea *Catharantus roseus* (Johnson y cols. 1963) y el taxol (**4**) aislado de *Taxus brevifolia* (Wani y cols. 1971), sustancias de uso terapéutico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer por su acción antimetabólica.



2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Euphorbiaceae

La familia de plantas Euphorbiaceae incluye 320 géneros y más de 8700 especies entre los que podemos citar *Croton*, *Jatropha*, *Hura*, *Acalypha*, *Sapium*, *Sebastiania*, *Euphorbia*, *Garcia*, entre otras. Se encuentran distribuidas en todo el mundo especialmente en zonas tropicales y subtropicales, aunque varios representantes se extienden por las zonas templadas de ambos hemisferios, su principal característica es la secreción de un látex incoloro y lechoso que puede ser irritante.

La familia es una de las más grandes y diversas de México y está representada por 43 géneros y 782 especies, de los cuales se estima que el 57% de las especies mexicanas son endémicas al país. En relación al número de Euphorbiaceae a nivel mundial, el país contiene 9% de las especies y 13% de los géneros.

Los géneros más grandes son *Euphorbia* (241 especies, 31%), *Croton* (124 especies, 16%), *Acalypha* (108 especies, 14%), *Jatropha* (48 especies, 6%) y *Phyllanthus* (41 especies, 5%), juntos representan 72% de las especies de Euphorbiaceae conocidas en México y entre las Angiospermas, es la sexta familia más diversa después de las *Orchidaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae* (Steinmann 2002; Martínez y cols. 2002). Los estados donde se localizan más de 100 especies son Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Jalisco, Guerrero, Michoacán, Sonora, Sinaloa, Puebla, Nayarit y Tamaulipas (Martínez y cols. 2002).

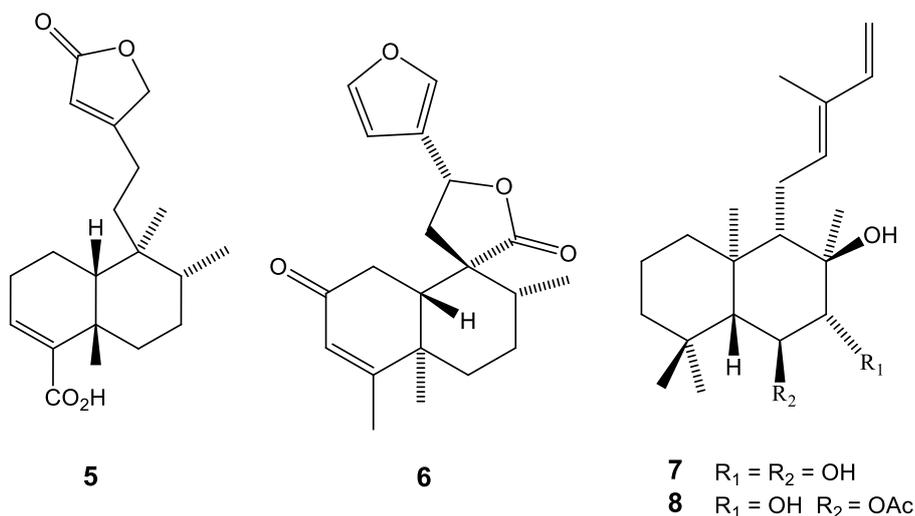
Esta familia vegetal puede considerarse de importancia relativa, ya que muchos de sus miembros se cultivan para uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental. Entre las más valiosas están *Manihot esculenta* Crantz (yuca), una de las plantas alimenticias más importantes a nivel mundial, *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch (nochebuena), especie ampliamente cultivada como ornamental, *Ricinus communis* de la cual se obtiene el aceite de ricino y *Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. Juss.) Müll. Arg.; la fuente principal de hule natural (Steinmann 2002).

2.2. Química de la familia Euphorbiaceae

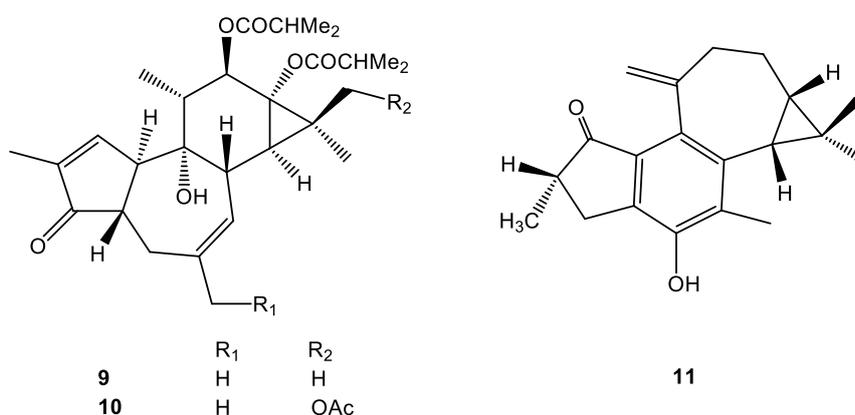
Los terpenos son los metabolitos secundarios predominantes, principalmente diterpenos de tipo clerodano, casbeno, pimarano, kaurano, labdano, jatrofano, tigliano y latirano. Triterpenos pentacíclicos y fitoesteroles, han sido reportados de esta familia y algunas especies biosintetizan diferentes clases de alcaloides lo que aumenta considerablemente la importancia de la familia desde el punto de vista medicinal. También se han reportado sustancias fenólicas entre las que predominan flavonoides, lignanos y proantocianidinas.

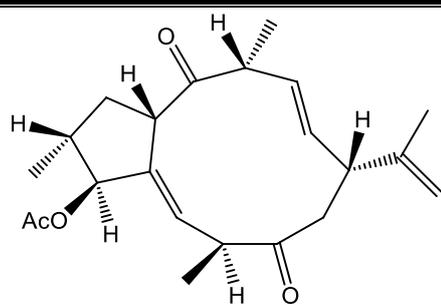
2.2.1. Diterpenos

Del extracto de diclorometano-metanol (DCM-MeOH) de las hojas de *Croton glabellus* se aisló un *cis-ent*-clerodano con un anillo lactónico llamado marrubiagenina (**5**), un clerodano furano con un anillo lactónico la *trans*-dehidrocrotonina (*t*-DCTN) (**6**) y diterpenos tipo labdano como la austroinulina (**7**) y 6-*O*-acetilaustroinulina (**8**) (García y cols. 2006).

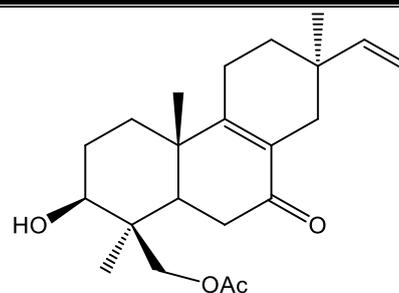


Por otra parte, del látex de *Euphorbia obtusifolia* se han aislado diterpenos tipo tigliano. Por ejemplo, el 4, 20-dideoxiforbol-12, 13-bis (isobutirato) (**9**) y el 17-acetoxi-4, 20-dideoxiforbol-12, 13-bis (isobutirato) (**10**) (Betancur y cols. 2003). De las raíces de *Jatropha gossypifolia* se aisló la jatrolona B (**11**) (Purushothaman 1979) y jatrofenona (**12**) (Ravindranath y cols. 2003). Por otro lado de las hojas de *C. joufra* Roxb. se aisló el pimarano 3β-hidroxi-19-*O*-acetil-pimara-8 (9), 15-dieno-7-ona (**13**) (Sutthavaiyakit y cols. 2001).





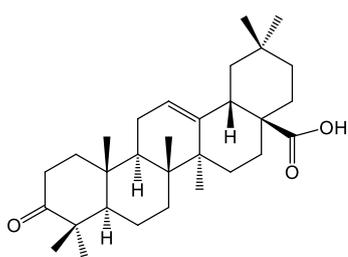
12



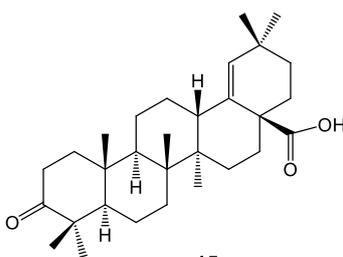
13

2.2.2. Triterpenos

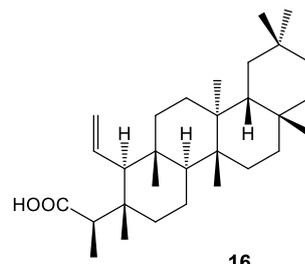
De las hojas de *Croton betulaster* se han aislado ácido 3-oxo-olean-12-eno-28-oico (**14**) y ácido 3-oxo-olean-18-eno-28-oico (**15**) (Barbosa y cols. 2003), mientras que de las hojas de *Garcia parviflora* se aislaron triterpenos tipo friedelano como por ejemplo, el ácido 1, 2-dehidro-2, 3-secofriedelan-3-oico (**16**), 1 β -hidroxifriedelina (**17**) y el ácido 3 β -hidroxifriedelan-23-oico (**18**). De esta especie se aisló ácido acetil aleuritólico (**19**) y β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**) (Reyes y cols. 2010).



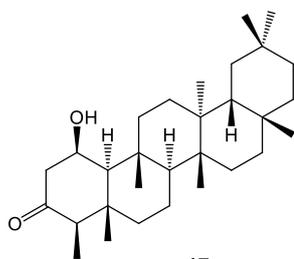
14



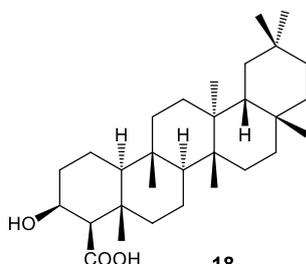
15



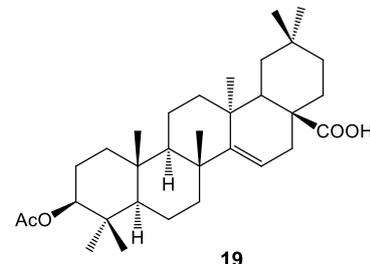
16



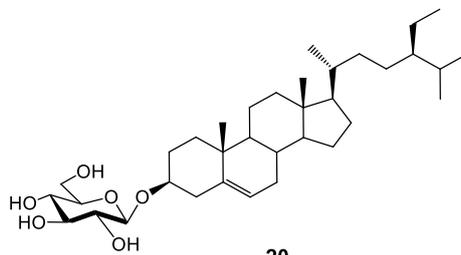
17



18

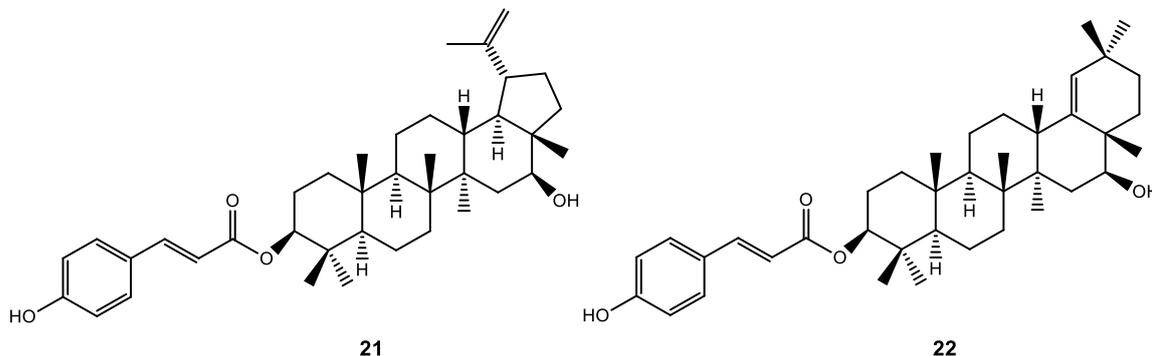


19



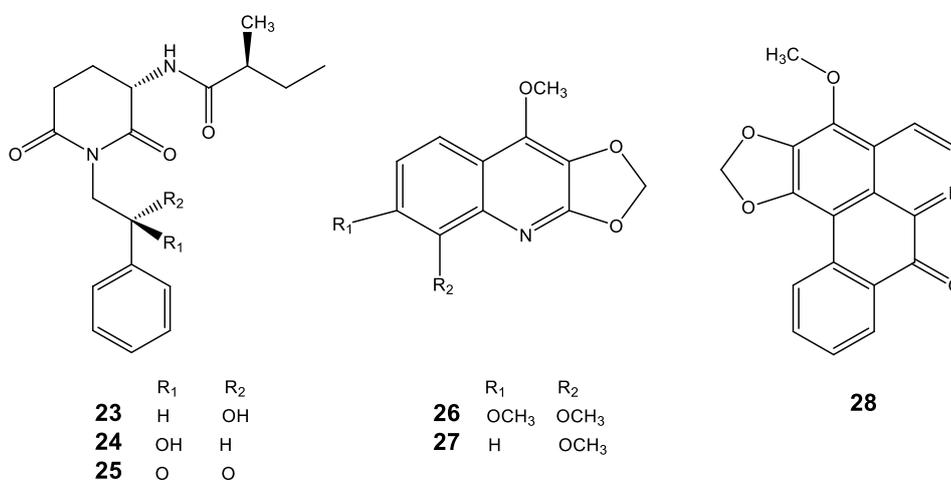
20

De la corteza de *Jatropha neopauciflora* se aislaron el (3 β , 16 β)-16-hidroxilup-20 (29)-en-3-ilo (*E*)-3-(4-hidroxifenilo) prop-2-enoato (**21**) y el (3 β , 16 β)-16-hidroxioleano-18-en-3-ilo (*E*)-3-(4-hidroxifenilo) prop-2-enoato (**22**) (García y Delgado 2006).



2.2.3. Alcaloides

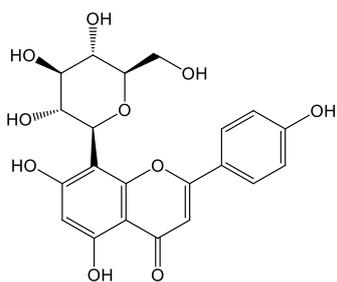
Los alcaloides no son muy comunes en la familia Euphorbiaceae pero se han encontrado en algunas especies. Por ejemplo, de las partes aéreas de *C. cuneatus* se han aislado julocrotol (**23**), isojulocrotol (**24**) y julocrotona (**25**) (Suárez y cols. 2004), mientras que de *Sebastiania corniculata* se aislaron el 2, 3 - metilendioxi - 4, 7, 8 - trimetoxiquinolina (**26**) y el 2, 3 - metilendioxi - 4, 8 - dimetoxiquinolina (**27**) (Machado y cols. 2005). De *Jatropha curcas* se aisló aterospermidina (**28**) (Gupta y cols. 2011).



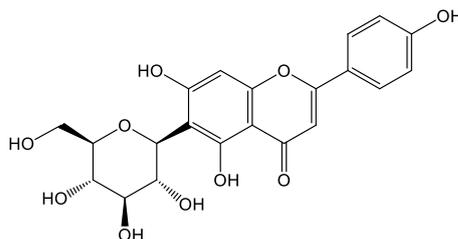
2.2.4. Flavonoides

Vitexina (**29**) e isovitexina (**30**) se han aislado de las hojas de *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha heyneii* y *Hevea brasiliensis*, mientras que las hojas de *Croton sparsiflorus* y *Manihot utilissima* contienen significantes cantidades de rutina (**31**)

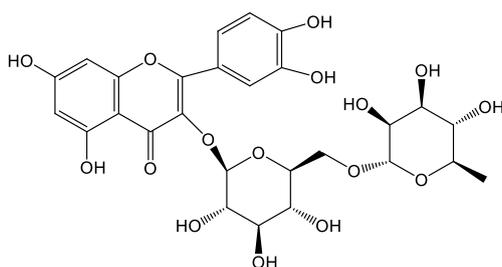
(Subramanian y cols. 1971). Del látex de *Jatropha curcas* se aisló jatropina (**32**) (Thomas y cols. 2008).



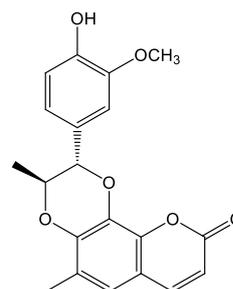
29



30



31



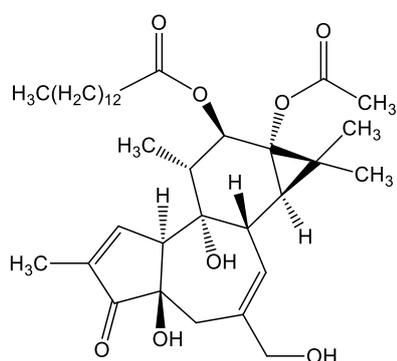
32

2.3. Actividad farmacológica y usos tradicionales de algunas especies de la Familia Euphorbiaceae

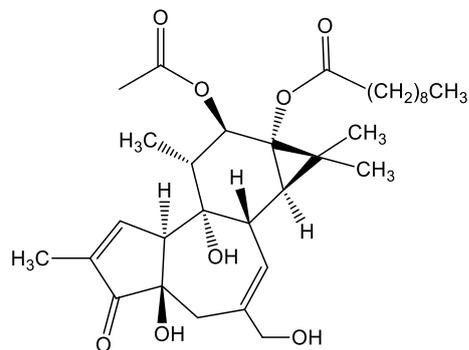
En la medicina tradicional, se han empleado especies de Euphorbiaceae para el tratamiento de infecciones de la piel, diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión, reumatismo, enfermedades hepáticas, o como antivirales, antibacterianos, antiparasitarios, anti-inflamatorios, antipiréticos, anticancerígenos, etc. (Salatino y cols. 2007; Sabandar y cols. 2013; Jassbi 2006).

La gran diversidad de los efectos descritos es un reflejo de la gran diversidad química de este grupo de plantas. Por mencionar algunos ejemplos; de las semillas de *Croton tiglium* se aislaron el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (ATF) (**33**) y el 13-decanoato de 12-*O*-acetilforbol (**34**). Estos diterpenos mostraron un efecto potente de inhibición citopático frente al virus de inmunodeficiencia humano tipo 1 (VHI-1). Sin embargo, solo el compuesto **33** mostró ser activador de la proteína cinasa C (PCC) (asociada con la promoción de tumores e inflamación), por lo que también es utilizado

como promotor de tumores en ratones para la investigación experimental de cáncer y como promotor de inflamación en el método de edema auricular de ratón (El-Mekawy y cols. 2000; Sawada y cols. 1987; Skehan y cols. 1990).



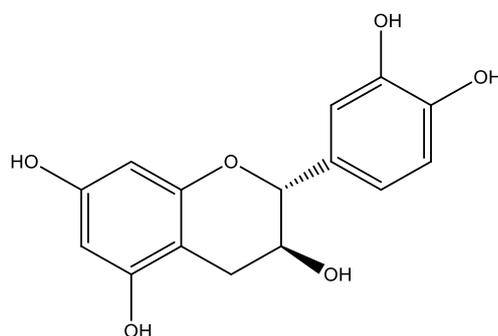
33



34

Las hojas y tallos de la corteza de *Croton cajucara* son usados en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes, de los niveles altos de colesterol en la sangre y para desórdenes gastrointestinales. Su uso correlaciona con los estudios farmacológicos del compuesto **6**, el cual mostró actividad hipolipidémica (Silva y cols. 2001), hipoglucémica (Farías y cols. 1997) y anti-ulcerogénica (Souza y cols. 2008) en ensayo con ratas.

Croton urucurana es empleada en la medicina tradicional debido a su efecto analgésico y anti-inflamatorio, para el tratamiento de diversas infecciones, su uso se correlaciona con los metabolitos aislados catequina (**35**) y ácido acetil aleuritólico (**19**) los cuales mostraron actividad anti-bacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (Peres y cols. 1997).



35

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades del género *Sapium*

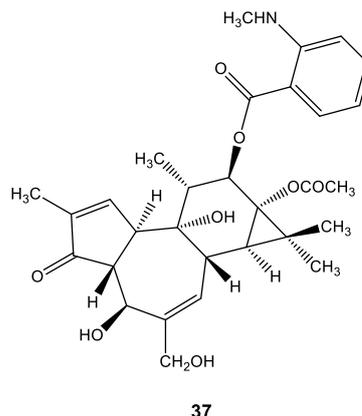
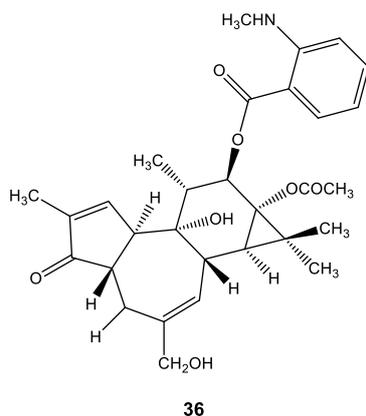
Sapium es un género de plantas de la familia Euphorbiaceae que comprende unas 120 especies distribuidas en todo el mundo, es nativo de los neotrópicos y regiones asiáticas. Algunas de sus especies han sido cultivadas históricamente para la producción de jabón y sebo por ser una rica fuente de ácidos grasos (Hong-Bing y cols. 2012).

3.2. Química y actividad farmacológica del género *Sapium*

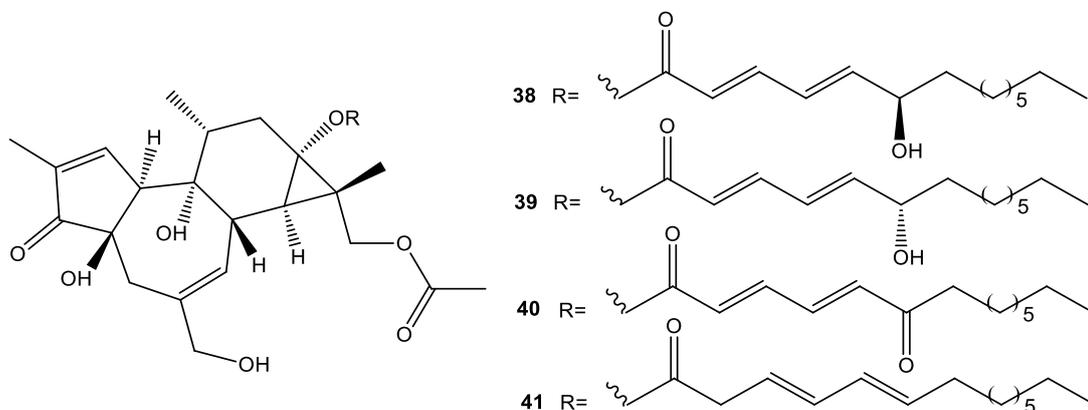
Puede afirmarse que algunas especies de *Sapium* biosintetizan metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, principalmente diterpenos tipo forbol, triterpenos, alcaloides, flavonoides y sustancias fenólicas, los cuales han mostrado actividad farmacológica contra enfermedades como VIH, tuberculosis, cáncer y padecimientos inflamatorios entre otras. A continuación se describen algunos ejemplos.

3.2.1. Diterpenos

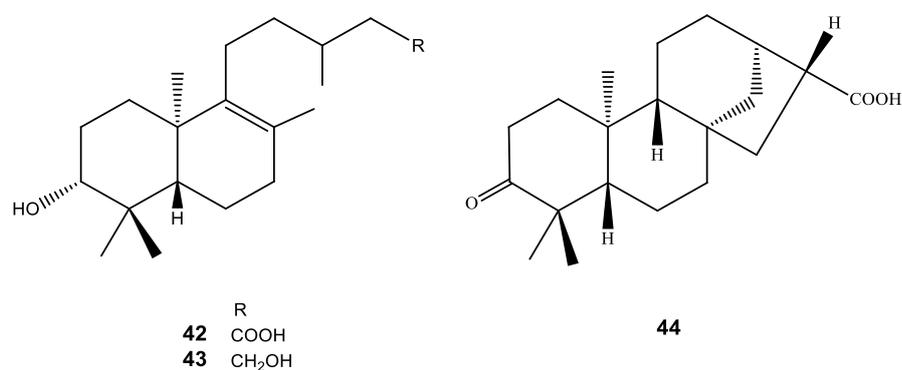
De los frutos de *Sapium indicum* se han aislado diterpenos tipo forbol que contienen nitrógeno como el 12-*O*-(*N*-metilaminobenzoilo)-13-*O*-acetil-4-desoxiforbol (**36**) (Taylor y cols. 1981) y el 12-(*N*-metilaminobenzoilo)-4-desoxi-5-hidroxi-forbol-13-acetato (**37**) (Taylor y cols. 1981). Estos compuestos exhibieron actividad anti-micobacterial con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de 3.12 y 12.5 µg/ml respectivamente comparado con el sulfato de kanamicina que mostró una CIM de 2-5 µg/ml (Chumkaew y cols. 2003).



De las hojas y ramas de *Sapium insigne* se aislaron cuatro ésteres de forbol denominados sapinsignoides A (**38**), B (**39**), C (**40**), D (**41**). Los sapinsignoides A-D mostraron actividad citotóxica contra la línea celular de carcinoma pulmonar A-549 (CI₅₀ 0.2-1.8 μM), mientras los compuestos A-C exhibieron actividad citotóxica moderada contra la línea celular de leucemia HL-60 (CI₅₀ 2.7-6.5 μM).

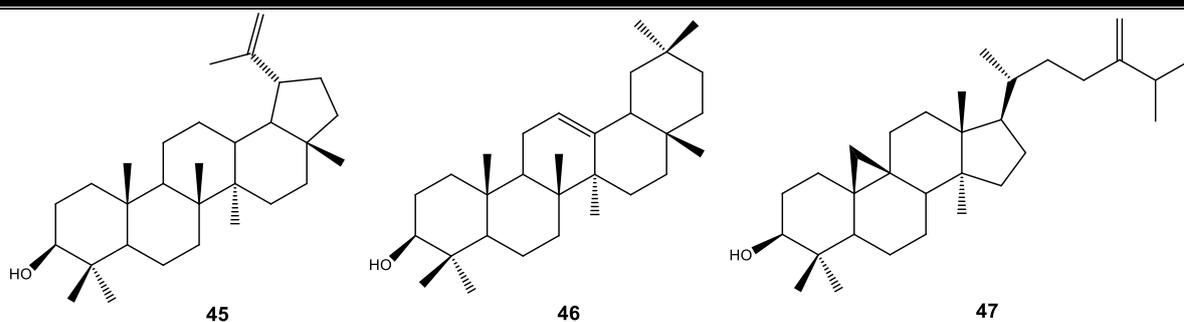


De la misma especie se aislaron dos *ent*-labdanos los sapinsignoides E (**42**) y F (**43**) y un *ent*-kuarano, el sapinsignoide G (**44**) (Hong-Bing 2012).

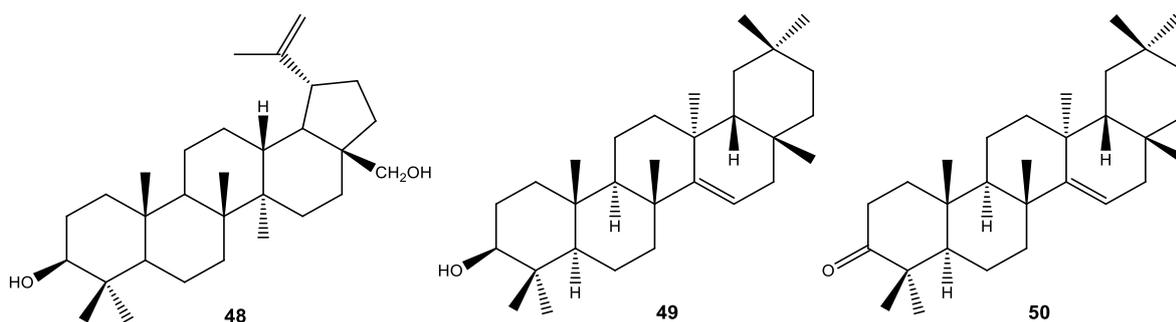


3.2.2. Triterpenos

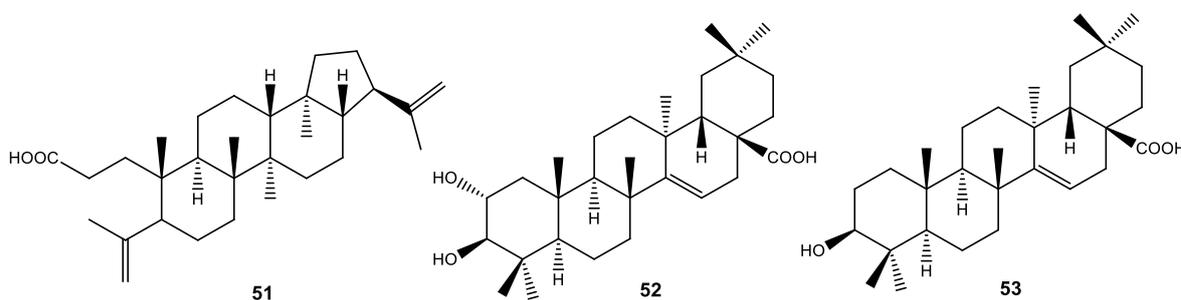
Del extracto DCM-MeOH 1:1 de las partes aéreas de *Sapium haematospermum* se han aislado triterpenos como lupeol (**45**), β-amirina (**46**) y cicloartanol (**47**) quienes han mostrado actividad anti-micobacterial y actividad citotóxica en células Vero (células epiteliales renales de mono verde africano) (Woldemichael y cols. 2004).



Del extracto etéreo de las hojas de *Sapium baccatum* se aislaron varios triterpenos como por ejemplo; betulina (**48**), β -taraxerol (**49**) y taraxerona (**50**) (Ahmed y cols. 2010).

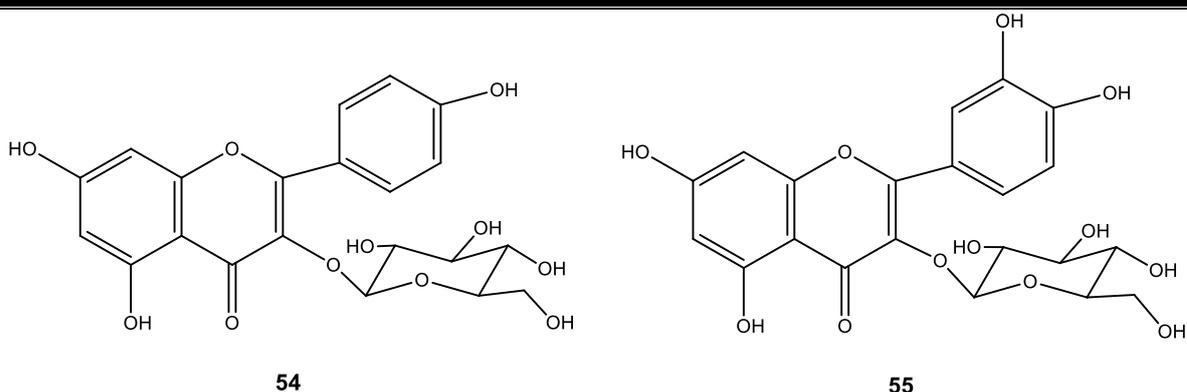


De la corteza de *Sapium sebiferum* se han aislado ácido sebiférico (**51**), ácido sebiferénico (**52**) y ácido aleuritólico (**53**) (Pradhan y cols. 1984).

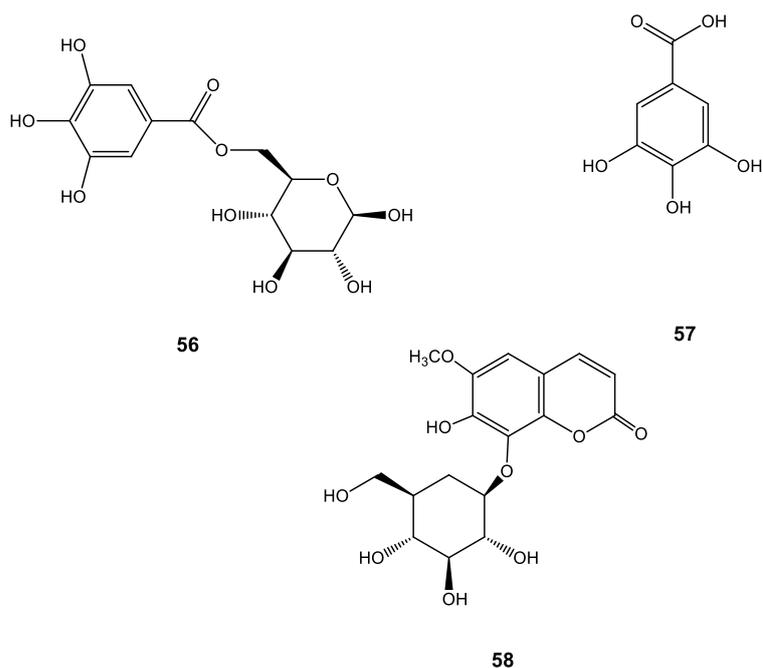


3.2.3. Flavonoides

De *Sapium haemospermum* se han aislado flavonoides glucosilados, el glucósido de kaempferilo (**54**) y el glucósido de quercetilo (**55**) (Chumkaew y cols. 2003).



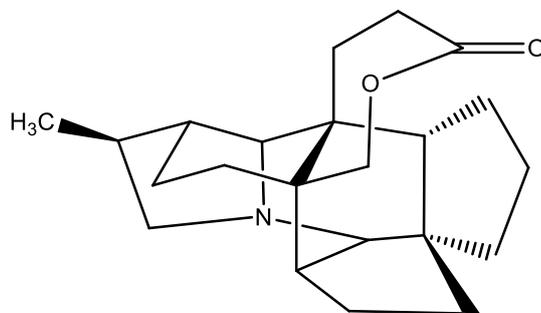
En la medicina tradicional china las hojas de *Sapium sebiferum* son utilizadas por su acción anti-inflamatoria, diurética y anti-parasitaria. En un estudio realizado de las hojas de *S. sebiferum* se aisló el glucósido de 6-O-galoilo (**56**), el cual mostró un efecto anti-hipertensivo a dosis de 5 mg/kg similar a la prazosina a dosis de 0.1 mg/kg y por otro lado mostró disminuir la presión sanguínea a una dosis similar o igual que el nifedipino (Hsu y Lee 1994). De las hojas de *Sapium insigne* se han aislado ácido gálico (**57**) y fraxina (**58**) (Devkota y cols. 2010).



3.2.4. Alcaloides

Bukitingina (**59**), un alcaloide aislado de las hojas de *Sapium baccatum* exhibió un efecto inhibitorio de la inflamación utilizando el método de edema plantar inducido por carragenina y por el método de inducción de artritis en ratas. Esta actividad

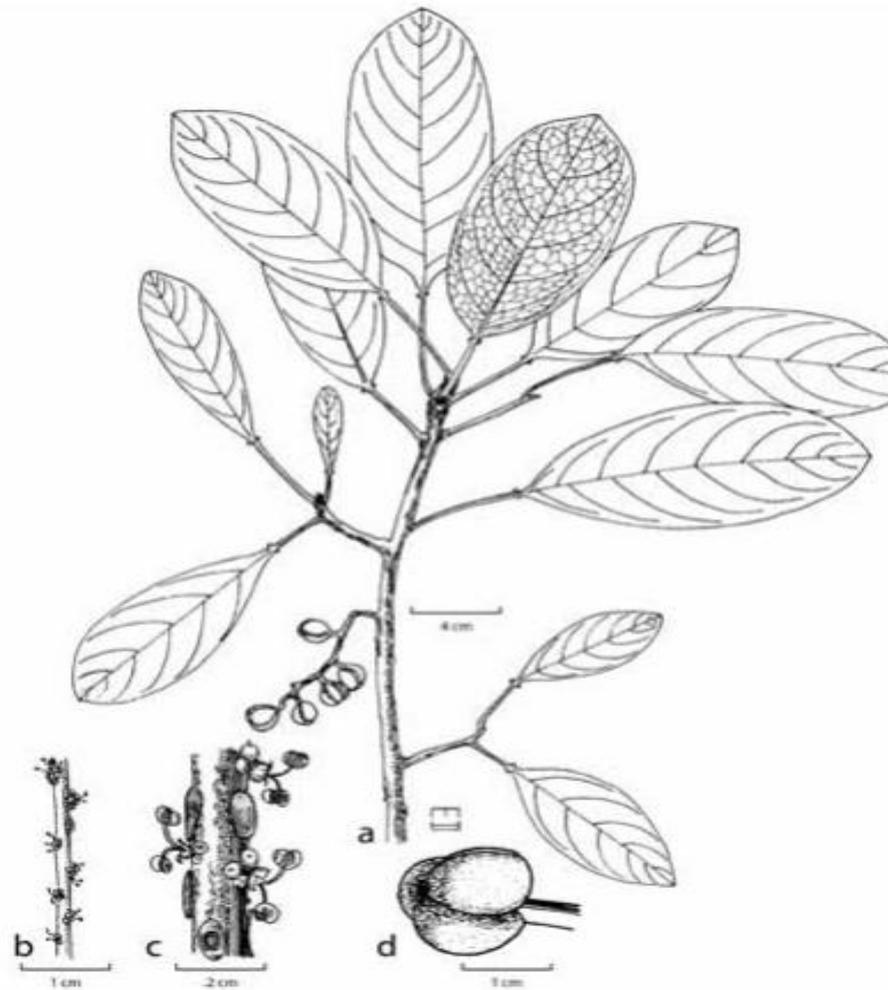
farmacológica en ambos métodos fue comparable al ácido acetilsalicílico. Por otra parte, redujo significativamente la fiebre en ratas hipertérmicas inducida por levaduras y actividad analgésica cuando fue probado por el método de contorsiones en ratón inducido por ácido acético, por lo que se concluyó que **59** poseía un mecanismo de acción anti-inflamatorio, analgésico y anti-pirético similar al ácido acetilsalicílico (Panthong y cols. 1998).



59

3.3. Generalidades de *Sapium nitidum*

Sapium nitidum (Monach) Lundell es un árbol de 9 a 18 m de altura, de corteza lisa, café y exudado blanco, de hojas elíptico-oblongadas y flores. En México se encuentra distribuido en los estados de Jalisco, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Puebla y Veracruz y en Centroamérica en Belice, Guatemala y Honduras. En la región de los Tuxtlas, Veracruz es conocido comúnmente como chicillo y florece en los meses de agosto a octubre (Vázquez, 2010).



a. Rama terminal con infrutescencia; b. Porción de inflorescencia; c. Detalle de flores; d. Fruto.

Figura 1. *Sapium nitidum* (Monach) Lundell

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento de la resistencia oncológica a múltiples agentes antineoplásicos como por ejemplo la sobreexpresión de la glucoproteína-P, la cual interactúa con varios fármacos anti-cancerígenos como la doxorrubicina, colchicina, vincristina y vinblastina transportándolos fuera de la célula evitando la penetración intracelular y causando resistencia al tratamiento (Niel y Scherrmann 2006), al igual que el aumento de enfermedades que involucran procesos inflamatorios ha despertado el interés científico y comercial de descubrir y desarrollar nuevos fármacos.

La gran diversidad de los efectos descritos de la familia Euphorbiaceae, reflejo de su gran diversidad química ha motivado el estudio de este grupo de plantas como una fuente de nuevos fármacos, en particular, del género *Sapium* del cual se han reportado varios diterpenos tipo forbol y triterpenos con diferentes actividades biológicas.

Hasta el momento no hay investigaciones relacionadas con el aislamiento de metabolitos secundarios de *Sapium nitidum* por lo que es importante investigar si los metabolitos aislados tienen actividad anti-inflamatoria y citotóxica como han mostrado algunas otras especies.

5. HIPÓTESIS

Varias especies del género *Sapium* destacan por ser una fuente de compuestos fenólicos, diterpenos tipo forbol, triterpenos, flavonoides y esteroides los cuales han mostrado tener actividad citotóxica y anti-inflamatoria, por lo que se espera que algunos de los metabolitos secundarios aislados de *Sapium nitidum* tengan actividad anti-inflamatoria y citotóxica.

6. OBJETIVOS

General

- ✓ Aislar los metabolitos secundarios de las hojas de *Sapium nitidum* y evaluar su actividad anti-inflamatoria y citotóxica.

Específicos

- ✓ Preparar el extracto DCM-MeOH 1:1 por maceración, partiendo de las hojas de la especie *Sapium nitidum*.
- ✓ Aislar los principales metabolitos secundarios y elucidar la estructura molecular de los compuestos aislados mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- ✓ Realizar bioensayos de citotoxicidad de los metabolitos secundarios aislados por el método de tinción con Sulforrodamina B frente a seis líneas celulares de tumores humanos: cáncer de mama (MCF-7), cáncer de pulmón (SKLU-1),

cáncer de Sistema Nervioso Central (U251), cáncer de colon (HCT-15), leucemia (K562) y cáncer de próstata (PC-3) (Skehan y cols. 1990).

- ✓ Realizar bioensayos de inhibición de la inflamación inducida por ATF en oreja de ratón y por edema plantar de ratón inducido por carragenina de los metabolitos secundarios aislados (De Young y cols. 1989; Winyard y Willoughby 2003).
- ✓ Determinar el contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) (Bradley y cols. 1982; Suzuki y cols. 1983).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material

La separación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna húmeda y por gravedad utilizando un gel de sílice (SiO_2) de 60 a 40 Å, marca Macherey-Nagel y malla 230-400 ASTM como fase estacionaria. Para la separación e identificación de los compuestos se realizó cromatografía en placa analítica (CPA) y cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatoplasmas de gel de sílice marca Merck 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm. Los disolventes que se emplearon como fase móvil fueron hexano, acetato de etilo, tolueno, acetona y metanol en distintas proporciones. Como revelador se utilizó sulfato cérico amoniacal $((\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4)$ al 1% en ácido sulfúrico 2N, utilizando una lámpara de luz UV *Spectroline* ENF-240C (λ de 254 y 365 nm).

Los puntos de fusión se realizaron por triplicado utilizando el aparato *Fisher Johns* y las mediciones no fueron corregidas. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro *FT-IR Bruker Tensor 750* en pastilla de KBr y en el espectrofotómetro de *FT-IR Spectrum RX-1 de Perkin Elmer* en solución de CHCl_3 .

Para elucidar la estructura química de los metabolitos aislados se realizaron espectros de RMN ^1H y ^{13}C utilizando los espectrómetros *Varian Unity 300* (300/75 MHz) y *Bruker Avance III* (400/100 MHz). Los espectros fueron obtenidos en cloroformo deuterado

(CDCl₃) y piridina deuterada (C₅D₅N), y se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

7.2. Metodología

7.2.1. Colecta de la especie vegetal

Las hojas de *Sapium nitidum* fueron colectadas en la localidad de Nueva Palestina en el estado de Chiapas y fueron identificadas por el Biólogo Esteban Manuel Martínez Salas del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra del material vegetal fue depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM registrado con la clave: MEXU EMM39268.

Datos taxonómicos

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Euphorbioideae

Género: *Sapium*

Especie: *Sapium nitidum*

7.2.2. Preparación del extracto

Las hojas de *Sapium nitidum* fueron secadas a temperatura ambiente y trituradas, obteniéndose 1464 g. Se realizó la maceración con DCM-MeOH 1:1 por 24 h, 3 veces consecutivas, de este procedimiento se obtuvo el extracto total de las hojas (161.3 g). Una parte alícuota (1 g) del extracto se separó y almacenó en refrigeración para la realización de las pruebas biológicas.

7.2.3. Separación y aislamiento de los metabolitos secundarios

7.2.3.1. Fraccionamiento primario

Para la separación de los compuestos se realizó un fraccionamiento primario utilizando una columna cromatográfica con el extracto DCM-MeOH 1:1 de las hojas de *Sapium nitidum* (160.3 g). Como fase estacionaria se utilizaron 750 g de sílica gel de 230-400 y como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad, acetato de etilo, acetona, acetona-metanol 1:1, obteniéndose 313 eluatos (de 450 ml cada uno), los cuales fueron reunidos con base en sus características

cromatográficas observadas en las placas en capa fina. Este procedimiento permitió la obtención de 8 fracciones, rotuladas de la A-H (**Tabla 1**).

Tabla 1. Fraccionamiento primario del extracto DCM-MeOH 1:1 de las hojas de *Sapium nitidum*

Fracción	Columna
1-13	A (Ceras)
14-23	B
24-40	C
41-51	D
52-107	E
108-149	F
150-264	G
265-313	H (Lavado)

A continuación se describirá sucintamente el procedimiento experimental que se siguió en cada una de las fracciones con el objetivo de obtener los productos naturales puros.

7.2.3.2. Columna B

- a) Al evaporarse el disolvente se obtuvo por precipitación un sólido blanco (23.9 g) el cual resultó ser una mezcla de dos sustancias, de acuerdo al análisis por CCF (ΔR_f 0.05). Debido a la similitud de los valores de R_f , se decidió realizar la separación de una parte de la mezcla (400 mg) mediante cromatografía en columna húmeda, utilizando la fase móvil hexano-tolueno 90:10. La aplicación del procedimiento usual permitió la separación de los dos compuestos, los cuales fueron identificados por análisis de los datos de infrarrojo, espectrometría de masas, RMN ^1H y RMN ^{13}C como palmitato de β -amirilo (210.7 mg) (**60**) y palmitato de lupeólo (52.5 mg) (**61**) y los 136.8 mg restantes no se lograron separar quedando la mezcla.

b) De las aguas madres (6.1 g) se realizó una columna cromatográfica eluida con hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona. Se recolectaron 121 fracciones de 250 ml cada una de las cuales:

- ✓ De la fracción 25-55 se realizó una columna húmeda eluida con hexano-tolueno 90:10, obteniéndose 111 fracciones de 10 ml cada una, en donde de la fracción 65-111 se obtuvo por re-cristalización hexano-acetona, 26.5 mg de cristales en forma de agujas finas identificándose por análisis de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C como acetato de lupeílo (**62**).
- ✓ De la fracción 55-67 se obtuvo por precipitación un sólido anaranjado que fue lavado con acetona y se recristalizó con DCM-acetona obteniéndose 80.9 mg de cristales blancos en forma de agujas finas identificándose por análisis de los datos de infrarrojo, espectrometría de masas, RMN ^1H y RMN ^{13}C como 3β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (**63**).

7.2.3.3. Columna C

Al concentrar el disolvente de esta fracción se obtuvo un sólido blanco amorfo (2.9 g) lavado con acetona y por análisis del espectro de RMN ^1H se determinó que se trataba de un alcohol lipídico (**64**).

7.2.3.4. Columna D

- a)** Al evaporarse el disolvente se obtuvo un sólido blanco (100.2 mg) el cual fue lavado con acetona y recristalizado de acetona-hexano identificándose por análisis del espectro de RMN ^1H como una mezcla de β -sitosterol (**65**) y estigmasterol (**66**).
- b)** De las aguas madres (3 g) se realizó una columna cromatográfica eluida con hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona, obteniéndose 197 fracciones de 100 ml cada una.

-
-
- ✓ De la fracción 25-61 (1 g) se realizó un fraccionamiento terciario recolectándose 137 fracciones de 100 ml cada una, en donde de la fracción 16-25 se observó un compuesto por CCF por lo que se procedió a su separación por CPA eluida con hexano-acetato de etilo 70:30 por 7 veces, lo que permitió obtener el compuesto deseado (18 mg) y por análisis de los datos de infrarrojo, espectrometría de masas, RMN ¹H y RMN ¹³C se identificó como cicloeucalenol (**67**).

7.2.3.5. Columna E

Se realizó una columna cromatográfica con 5.4 g y se obtuvieron 126 eluatos de 110 ml cada uno.

- ✓ De la fracción 3-7 al evaporarse el disolvente se obtuvo un sólido amarillo el cual fue lavado con acetona y metanol, obteniéndose 19.6 mg de un sólido blanco amorfo y por análisis de los datos de infrarrojo y RMN ¹H se propuso la estructura de un ácido graso (**68**).
- ✓ De la fracción 62-85 precipitó un sólido y por filtración y re-cristalización con hexano-acetona se obtuvieron 36.2 mg de cristales blancos en forma de agujas finas. De las aguas madres (1.1 g) se realizó una columna cromatográfica obteniéndose en total 52.2 mg del mismo compuesto y por análisis de los datos de espectrometría de masas, RMN ¹H y RMN ¹³C se identificó como 3β-palmitoiloxi-1β, 11α-dihidroxi-olean-12-eno (**69**).

7.2.3.6. Columna F

Con 4.2 g de residuo se realizó una columna cromatográfica utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo y acetona como fase móvil, obteniéndose 205 fracciones de 100 ml cada una. De la fracción 140-175 se obtuvieron 38.8 mg de un sólido amarillo amorfo, que por su baja solubilidad en disolventes deuterados no se realizó su elucidación estructural.

7.2.3.7. Columna G

Se realizó una columna cromatográfica con 13.5 g de residuo, utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona como fase móvil, recolectándose 221 eluatos de 400 ml cada uno:

- ✓ De la fracción 150-171, precipitó un sólido blanco (51.1 mg), filtrado y lavado con acetona y recristalizado con DCM-acetona, obteniéndose cristales blancos. Sin embargo, por la limitada información obtenida de los espectros de masas, RMN ^1H y RMN ^{13}C no se logró su elucidación estructural.
- ✓ De la fracción 182-195, se obtuvo un sólido amorfo (29.7 mg) por precipitación, de baja solubilidad en disolventes deuterados por lo que no se logró realizar su elucidación estructural.
- ✓ Finalmente, de la fracción 195-214 se aisló un sólido blanco amorfo (53 mg), lavado con hexano y acetona, de baja solubilidad en disolventes orgánicos. Por análisis del espectro de RMN ^1H y por comparación de una muestra de referencia obtenida en el laboratorio se logró identificar como β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**).

7.2.4. Actividad biológica

7.2.4.1. Ensayo de inhibición de la inflamación inducida por ATF en oreja de ratón.

Para la realización de la actividad anti-inflamatoria se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con pesos entre 25-30 g. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado (temperatura 22 ± 3 °C, humedad 40-70, ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h), con agua y alimento *ad libitum*. Para la realización de la actividad anti-inflamatoria se formaron 3 grupos de 6 ratones cada uno: control (ATF + vehículo), sustancias en estudio (ATF + sustancia en estudio) y sustancia de

referencia (ATF + indometacina). A cada ratón bajo anestesia con pentobarbital sódico (32 mg/kg, vía intraperitoneal) se le aplicó ATF (2.5 µg) disuelto en etanol (10 µl), distribuidos sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha (5 µl/lado) para inducir la inflamación. Diez minutos después de la administración del ATF las sustancias en estudio (1 µmol/oreja), el extracto total (1 mg/oreja) y la indometacina (1 µmol/oreja) disueltas en 20 µl de vehículo, se aplicaron tópicamente sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha (10 µl/lado). En la oreja izquierda de cada ratón se administró 10 µl de etanol y 20 µl del vehículo de las sustancias en estudio (control negativo). Transcurridas 4 h desde la administración del ATF, los animales se sacrificaron en cámaras de CO₂ y se tomaron secciones circulares (7 mm de diámetro) de ambas orejas del ratón (tratada y no tratada), los cuales se pesaron para determinar por diferencia de peso entre la oreja tratada y no tratada el edema producido.

La inhibición del edema se calculó con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (P_t - P_{nt}) \text{ control} - (P_t - P_{nt}) \text{ tratamientos} / (P_t - P_{nt}) * 100$$

Dónde:

P_t: Es el peso de la sección de la oreja tratada

P_{nt}: Es el peso de la sección de la oreja no tratada.

7.2.4.2. Contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina)

El contenido de la MPO fue medida en las biopsias tomadas de las orejas de cada grupo después de la administración del ATF. Cada oreja se colocó en un vial y se le agregó 1 ml de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTA) al 0.5 % frío y se homogenizó por 30 s a 4 °C a una velocidad de 25000 rpm. El homogenizado se congeló y descongeló por tres veces, finalmente se sonicó por 20 s y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a 4 °C. Inmediatamente después se tomaron por cuadruplicado 10 µl del sobrenadante y se colocaron en pozos de un microplato (96 pozos). Se adicionaron 180 µl de búfer de fosfatos (pH 5.4) sin BHTA y se calentó la placa a 37 °C,

entonces se adicionaron 20 µl de peróxido de hidrógeno al 0.017 % a cada uno. Para iniciar la reacción se adicionó 20 µl de TMB (18.4 mM) disuelto en dimetilformamida al 50 % y se incubó por 5 min a 37 °C con agitación suave. Finalmente se agregaron 20 µl de H₂SO₄ 2M para detener la reacción y se midió la densidad óptica a 450 nm.

7.2.4.3. Ensayo del edema plantar de ratón inducido por carragenina

Las sustancias puras que presentaron un porcentaje de inhibición de la inflamación por el método de edema auricular de ratón inducido por ATF mayor al 50 % se utilizaron para el ensayo del edema plantar inducido por carragenina. Para la realización de la prueba se utilizaron ratones hembras cepa CD-1 con pesos entre 25-30 g, divididos en 3 grupos de 4 ratones cada uno, control (carragenina al 1 %), sustancias en estudio (carragenina al 1 % + sustancia en estudio), referencia (carragenina al 1 % + indometacina).

Inicialmente, se midió por triplicado el volumen inicial (V_o) de la pata derecha de cada ratón mediante la medición del volumen de desplazamiento de agua utilizando un pletismómetro (Modelo 7140 Ugo Basile) previamente calibrado. Inmediatamente, a cada uno de los ratones se les administró por vía intraperitoneal la sustancia en estudio (31.6 mg/kg) y la indometacina (7.5 mg/kg). Media hora después se administró por vía subcutánea en la aponeurosis plantar de la pata derecha 50 µl de carragenina al 1% (10 mg/1 ml SSI) para inducir la inflamación. El volumen de inflamación final (V_t) se cuantificó midiendo el volumen de desplazamiento de agua de las patas inflamadas a las 1.5, 3, 4.5 y 6 h después de la inyección de carragenina.

La inhibición de la inflamación se calculó con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{V_o - V_t}{V_o} 100$$

Dónde:

V_o: Volumen de la pata derecha no inflamada

V_t: Volumen de la pata derecha inflamada

7.2.4.4. Ensayo de citotoxicidad por el método de tinción con Sulforrodamina B

Para la determinación de la actividad citotóxica del extracto total y de los compuestos puros se utilizó el método colorimétrico con Sulforrodamina B frente a seis líneas celulares de tumores humanos de cáncer de mama (MCF-7), cáncer de pulmón (SKLU-1), cáncer de Sistema Nervioso Central (U251), cáncer de colon (HCT-15), leucemia (K562) y cáncer de próstata (PC-3). Cada una de las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2 μ M de L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina G, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B, conservados a una temperatura de 37 °C, en un ambiente húmedo con 95 % de aire y 5 % de CO₂.

Para la realización del ensayo se tomaron suspensiones celulares de 5 x 10⁴ células/ml (K562 y MCF-7), 7.5 x 10⁴ células/ml (U251, PC-3 y SKLU-1) y 10 x 10⁴ células/ml (HCT – 15). Se sembraron 100 μ l de cada suspensión celular en pozos de un microplato (96 pozos) y se incubaron por 24 h para fijar las células a las paredes del pozo. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 μ l de cada muestra (50 μ g/ml para extracto total y 50 μ M para sustancias puras) y fueron incubadas por 48 h adicionales. Al término de las 48 h, las células adheridas fueron fijadas *in situ* utilizando 50 μ l de ácido tricloroacético (ATCA) frío al 50 % (peso/vol) y se incubaron a 4 °C por 60 min. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante y los platos fueron lavados tres veces con agua destilada y posteriormente se secaron con aire. Los cultivos fijados con ATCA fueron teñidos con 100 μ l de una solución de SRB al 0.4 % y se dejó en tinción por 30 min. Concluido el tiempo de tinción fueron lavados 4 veces con ácido acético al 1 % y luego secados en cámara de flujo de aire. Después del secado de las placas el colorante unido a proteínas fue solubilizado con 10 μ M de una base sin búfer. Finalmente la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 515 nm.

7.2.5. Análisis estadístico

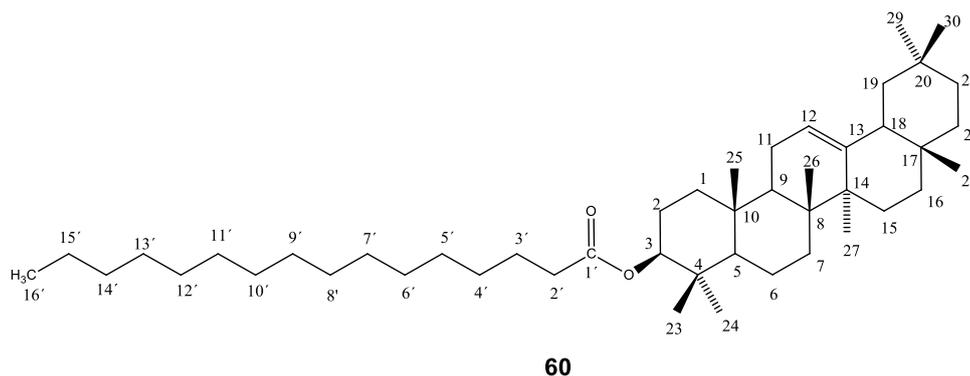
Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM) y se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para

las comparaciones múltiples entre grupos se realizaron pruebas *Dunnett*, *Tukey* y *Tukey-Kramer* los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados.

8.1.1. Palmitato de β -amirilo (60)



➤ Características físicas y espectroscópicas.

✓ Físicas

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (13.62 g)

Rendimiento extracto total seco: 8.5 %

Pf. 71-73 ° C, Lit. Pf. 70-73 ° C (Wahlberg y cols. 1972)

✓ Espectroscopia de infrarrojo

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4215, 3680, 3020, 2927, 2857, 2401, 1719, 1599, 1524, 1471, 1424, 1215, 1016, 929, 851, 759, 669, 627, 454.

✓ Espectrometría de masas

EM-IE (m/z): 664, 649, 592, 552, 445, 409, 393, 365, 339, 305, 297, 257, 218, 203, 189, 147, 135, 95, 69, 57, 42, 18,17.

✓ Espectroscopia de RMN

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0.83 (3H, s, H-28), 0.88 (15H, s, H-23, 24, 29, 30, 16'), 0.97 (6H, d, $J = 2.2$ Hz, H-25, 26), 1.13 (3H, s, H-27), 1.25 (20H, s, H4'-13'), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 4.50 (1H, dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, H-3), 5.18 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ): 38.26 (C-1), 22.69 (C-2), 80.57 (C-3), 37.76 (C-4), 55.26 (C-5), 18.27 (C-6), 32.60 (C-7), 39.81 (C-8), 47.55 (C-9), 36.85 (C-10), 23.61 (C-11), 121.64 (C-12), 145.20 (C-13), 41.72 (C-14), 26.93 (C-15), 26.14 (C-16), 33.32 (C-17), 47.24 (C-18), 46.79 (C-19), 31.08 (C-20), 34.87 (C-21), 37.14 (C-22), 28.06 (C-23), 16.81 (C-24), 15.55 (C-25), 16.77 (C-26), 25.95 (C-27), 28.39 (C-28), 33.32 (C-29), 23.69 (C-30), 173.67 (C-1'), 34.73 (C-2'), 25.18 (C-3'), 29.18-29.69 (C4'-13'), 31.92 (C-14'), 23.54 (C-15'), 14.11 (C-16').

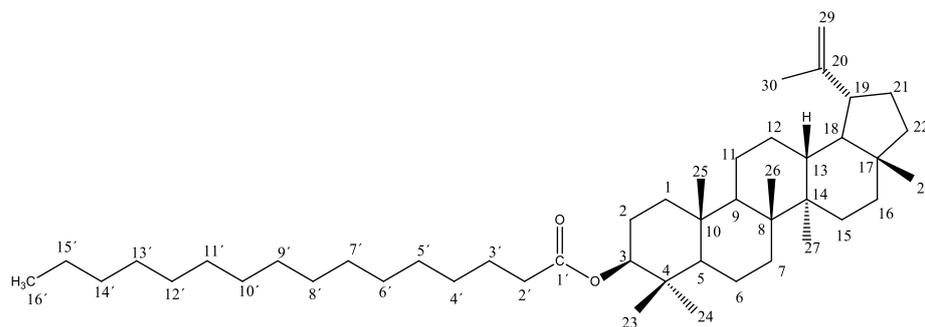
➤ Elucidación estructural

En el espectro de infrarrojo (**Espectro 1**) se observa una banda de estiramiento C=O en 1719 cm^{-1} , vinculada a una banda de estiramiento C-O en 1215 cm^{-1} junto con una banda de estiramiento O-C-C en 1016 cm^{-1} , lo que sugiere la presencia de un éster. Por otro lado, se observan bandas de estiramiento asimétrico sp^2 a 3020 y sp^3 a 2927 cm^{-1} y bandas de estiramiento simétrico C-H a 2857 cm^{-1} , correspondiente a grupos metilo y bandas de flexión en tijera C-H a 1471 cm^{-1} correspondiente a metilenos lo que demuestra la naturaleza hidrocarbonada del compuesto.

En el espectro de masas (**Espectro 2**) se observa la presencia del ion molecular M^+ a m/z 664 acorde a su fórmula general $\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{O}_2$, a m/z 649 se observa un pico de pequeña intensidad correspondiente a la pérdida de un grupo metilo, el pico base del espectro se observa a m/z 218 el cual se forma tras una reacción de Retro Diels-Alder a nivel del anillo C y a partir del cual se originan los iones con m/z 203 por la pérdida de un grupo metilo y m/z 189 debido a la pérdida del grupo C_2H_5 por la ruptura del enlace que une a los anillos D y E, estos patrones de fragmentación son típicos de esqueletos tipo amirina con una insaturación en el carbono 12.

El espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 4**) y DEPT mostraron 46 señales correspondientes a 9 metilos, 24 metilenos, 5 metinos y 8 carbonos cuaternarios. En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 3**) se observa un triplete correspondiente a un metino en δ_{H} 5.18 ($J = 3.7$ Hz), el cual integra para un hidrógeno vinílico H-12, lo que concuerda con el espectro de RMN ^{13}C en δ_{C} 121.64 (CH) y δ_{C} 145.20 (C) de los C-12 y C-13 respectivamente; en δ_{H} 4.50 ($J = 9.2, 6.8$ Hz) se observa un doble de dobles correspondiente al H-3 unido a un grupo éster, concordando con el carbono carbinólico en δ_{C} 80.57. A campo alto en δ_{H} 1.25 se observa una señal intensa correspondiente a una cadena alifática de metilenos de la posición 4' a 13' y en δ_{H} 2.29 ($J = 7.5$ Hz) se observa un triplete que integra para dos hidrógenos correspondiente al metileno de la posición 2' unido al carbonilo. Asimismo, en el espectro de RMN ^{13}C a δ_{C} 173.67 se observa la señal del carbonilo de éster. Estos desplazamientos químicos son idénticos con los reportados para la estructura del palmitato de β -amirilo (**60**) (Wang 2007), por lo que se concluye la identidad entre ambas sustancias.

8.1.2. Palmitato de lupeólo (**61**)



61

➤ Características físicas y espectroscópicas.

✓ Físicas

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (10.27 g).

Rendimiento extracto total seco: 6.4 %

Pf. 74-76 ° C

✓ Espectroscopia de infrarrojo

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4215, 3676, 3020, 2929, 2862, 2400, 1717, 1601, 1522, 1474, 1424, 1215, 1018, 929, 851, 757, 669, 624, 454, 442.02.

✓ Espectrometría de masas

EM-IE (m/z): 664, 649, 608, 593, 553, 526, 485, 459, 445, 409, 408, 393, 365, 299, 297, 257, 218, 189, 161, 135, 109, 95, 69, 57, 42, 18, 17.

✓ Espectroscopia de RMN

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.79 (3H, s, H-28), 0.84 (6H, s, H-16', 25), 0.85 (3H, s, H-24), 0.88 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 1.03 (3H, s, H-26), 1.25 (24H, s, H4'-13'), 1.68 (3H, s, H-30), 2.28 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 2.38 (1H, td, $J = 11, 5.8$ Hz, H-19), 4.47 (1H, dd, $J = 10.7, 5.6$ Hz, H-3), 4.57 (1H, dd, $J = 2.3, 1.3$ Hz, H-29b), 4.69 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-29a).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, δ): 38.38 (C-1), 23.75 (C-2), 80.61 (C-3), 37.84 (C-4), 55.39 (C-5), 18.21 (C-6), 34.22 (C-7), 40.86 (C-8), 50.34 (C-9), 37.09 (C-10), 20.95 (C-11), 25.11 (C-12), 38.05 (C-13), 42.83 (C-14), 27.44 (C-15), 35.57 (C-16), 43.00 (C-17), 48.30 (C-18), 48.01 (C-19), 150.95 (C-20), 29.69 (C-21), 40.00 (C-22), 27.97 (C-23), 16.57 (C-24), 16.17 (C-25), 15.98 (C-26), 14.52 (C-27), 18.00 (C-28), 109.33 (C-29), 19.28 (C-30), 173.68 (C-1'), 34.86 (C-2'), 25.17 (C-3'), 29.17-29.84 (C4'-13'), 31.92 (C-14'), 22.69 (C-15'), 14.11 (C-16').

➤ Elucidación estructural

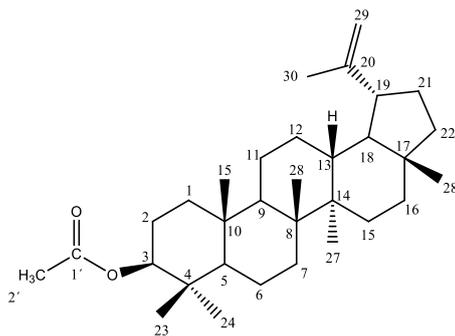
En el espectro de infrarrojo (**Espectro 5**) se observan bandas de estiramiento C=O en 1717 cm⁻¹, C-C-O en 1215 cm⁻¹, O-C-C en 1018 cm⁻¹ lo que sugiere la presencia de un éster. Por otro lado, se observan bandas de estiramiento asimétrico C-H en 2929 cm⁻¹ y bandas de estiramiento simétrico C-H a 2862 cm⁻¹, correspondiente a grupo metilo y bandas de flexión en tijera C-H a 1471 cm⁻¹ correspondiente a metilenos lo que demuestra la naturaleza hidrocarbonada del compuesto. Finalmente, se observa una

banda de tensión C=C en 1601 cm^{-1} , que relacionada a la banda de estiramiento C-H en 3020 cm^{-1} y la banda de flexión fuera del plano en 851 cm^{-1} sugiere la presencia de dobles enlaces olefínicos en la estructura.

En el espectro de masas (**Espectro 6**) se observa la presencia del ion molecular M^+ a m/z 664 acorde a su fórmula general $C_{46}H_{80}O_2$, los fragmentos más característicos para el diagnóstico estructural son: el pico base a m/z 189 coincide con la eliminación de parte de la estructura hidrocarbonada correspondiente a una pérdida parcial del anillo C, la pérdida completa de los anillos D, E y el grupo isoprenilo, el fragmento del ion correspondiente a m/z 408 [$M^+ - C_{16}H_{32}O_2$] corresponde a la pérdida completa de la cadena alifática.

El espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 8**) mostró 46 señales y mediante la modalidad DEPT se observaron 8 metilos, 24 metilenos, 6 metinos y 8 carbonos cuaternarios. En el espectro de RMN 1H (**Espectro 7**) se observa un doblete en δ_H 4.69 ($J = 2.3\text{ Hz}$) el cual integra para un hidrógeno vinílico correspondiente al H-29a, lo que concuerda con el espectro de RMN ^{13}C en δ_C 150.95 (C) y δ_C 109.33 (CH) correspondiente al C-20 y C-29 respectivamente. En δ_H 4.57 se observa un doble de dobles ($J = 2.3, 1.3\text{ Hz}$) el cual integra para un hidrógeno correspondiente al H-29b y en δ_H 4.47 se observa otro doble de dobles ($J = 10.7, 5.6\text{ Hz}$) correspondiente al H-3 unido a un grupo éster, lo cual concuerda con el carbono carbinólico en δ_C 80.61. En δ_H 2.38 ($J = 11, 5.8\text{ Hz}$) se observa un triple de dobles el cual integra para un hidrógeno en C-19, en δ_H 2.28 ($J = 7.5\text{ Hz}$) se observa un triplete el cual integra para dos hidrógenos correspondientes a la posición 2' de la cadena alifática. En δ_C 173.68 se observa la señal del carbonilo del grupo éster. A campo alto en δ_H 1.25 se observan los hidrógenos de la cadena alifática C4' a C13' y finalmente en δ_H 1.68, 1.03, 0.94, 0.88, 0.85, 0.84, 0.79 se observan señales singulete correspondientes a los metilos de las posiciones 30, 26, 27, 23, 24, 16', 25 y 28 respectivamente. Estos desplazamientos químicos son idénticos con los reportados para la estructura del palmitato de lupeílo (**61**) (Wang 2007).

8.1.3. Acetato de lupeól (62)



62

➤ Características físicas y espectroscópicas.

✓ Físicas

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (26.5 mg).

Rendimiento en el extracto total seco: 0.02 %

Pf. 216 - 218 ° C, Lit. Pf. 215-216 ° C (Matsunaga y cols. 1988)

✓ Espectroscopia de RMN

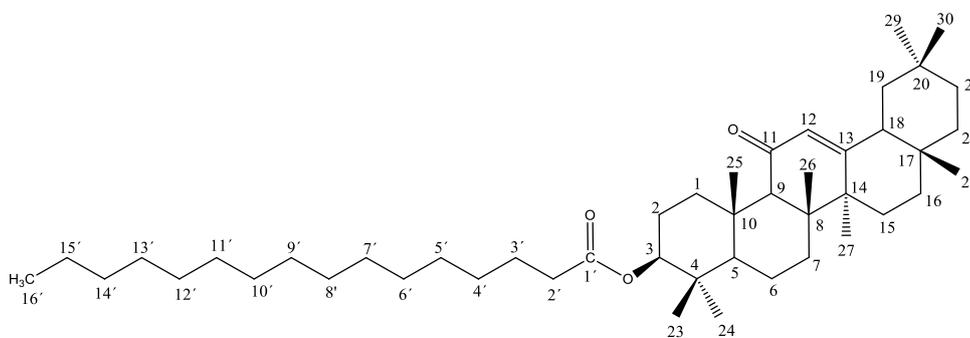
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 0.79 (3H, s, H-28), 0.84 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 1.03 (3H, s, H-26), 1.68 (3H, s, H-30), 2.04 (3H, s, OAc), 2.37 (1H, *td*, *J* = 11.1, 5.7 Hz, H-19), 4.47 (1H, *m*, H-3), 4.57 (1H, *dd*, *J* = 2.7, 1.4 Hz, H-29b), 4.69 (1H, *d*, *J* = 2.5 Hz, H-29a).

RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃, δ): 38.42 (C-1), 23.73 (C-2), 80.99 (C-3), 38.08 (C-4), 55.41 (C-5), 18.01 (C-6), 34.25 (C-7), 40.88 (C-8), 50.38 (C-9), 37.11 (C-10), 20.97 (C-11), 25.14 (C-12), 38.08 (C-13), 42.85 (C-14), 27.46 (C-15), 35.59 (C-16), 43.01 (C-17), 48.02 (C-18), 48.33 (C-19), 150.94 (C-20), 29.86 (C-21), 40.01 (C-22), 27.95 (C-23), 15.99 (C-24), 16.17 (C-25), 16.49 (C-26), 14.52 (C-27), 18.22 (C-28), 109.33 (C-29), 19.29 (C-30), 170.96 (C-1'), 21.28 (C-2').

➤ Elucidación estructural

En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 9**) se observa un doblete en δ_{H} 4.69 ($J = 2.5$ Hz) el cual integra para un hidrógeno vinílico correspondiente al H-29a, lo que concuerda con el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 10**) en δ_{C} 150.94 (C) y δ_{C} 109.33 (CH) correspondiente al C-20 y C-29 respectivamente. En δ_{H} 4.57 aparece un doble de dobles ($J = 2.7, 1.4$ Hz) el cual integra para un hidrógeno correspondiente al H-29b; en δ_{H} 4.47 se observa un multiplete que integra para un hidrógeno correspondiente al H-3 unido a un grupo éster, concordando con el carbono carbinólico en δ_{C} 80.99. En δ_{H} 2.37 ($J = 11.1, 5.7$ Hz) se observa un triple de dobles correspondiente al hidrógeno de C-19, en δ_{H} 2.04 se observa una señal intensa que integra para tres hidrógenos correspondientes al metilo de la posición 2' del grupo acetilo. En δ_{C} 170.96 se observa la señal del carbonilo del grupo éster. A campo alto se observan señales singulete en δ_{H} 1.68, 1.03, 0.94, 0.86, 0.85, 0.84 y 0.79 que corresponden a los metilos de las posiciones 30, 26, 27, 23, 24, 25, y 28 respectivamente. Estos desplazamientos químicos concuerdan con lo reportado para el acetato de lupeólo (**62**) (Matsunaga y cols. 1988), por lo que se establece la identidad de esta sustancia.

8.1.4. 3 β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (**63**)



63

➤ **Características físicas y espectroscópicas.**

✓ **Físicas**

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (80.9 mg).

Rendimiento en el extracto total seco: 0.05 %

Pf. 148 - 150 ° C

✓ **Espectroscopia de infrarrojo**

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4215, 3684, 3020, 2927, 2856, 2400, 1718, 1654, 1522, 1424, 1216, 1020, 929, 754, 669, 627, 450.

✓ **Espectrometría de masas**

EM-IE (m/z): 678, 663, 651, 557, 551, 523, 495, 464, 440, 423, 407, 368, 353, 302, 287, 273, 232, 217, 175, 174, 135, 121, 95, 69, 57, 42, 18, 17.

✓ **Espectroscopia de RMN**

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.88 (21H, *m*, H-23, 24, 26, 27, 29, 30, 16'), 1.13 (3H, *s*, H-25), 1.16 (3H, *s*, H-28), 1.25 (20H, *s*, H4'-13'), 2.29 (2H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 2.36 (1H, *s*, H-9), 4.52 (1H, *dd*, *J* = 11.6, 4.8 Hz, H-3), 5.59 (1H, *s*, H-12).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, δ): 38.80 (C-1), 23.62 (C-2), 80.62 (C-3), 38.10 (C-4), 54.04 (C-5), 17.40 (C-6), 32.72 (C-7), 43.40 (C-8), 61.68 (C-9), 36.96 (C-10), 200.12 (C-11), 128.08 (C-12), 170.57 (C-13), 45.44 (C-14), 26.41 (C-15), 26.46 (C-16), 32.38 (C-17), 47.63 (C-18), 45.17 (C-19), 31.05 (C-20), 34.46 (C-21), 36.52 (C-22), 28.08 (C-23), 16.41 (C-24), 16.76 (C-25), 18.72 (C-26), 23.39 (C-27), 28.76 (C-28), 33.06 (C-29), 23.50 (C-30), 173.66 (C-1'), 34.86 (C-2'), 25.17 (C-3'), 29.19-29.69 (C4'-13'), 31.93 (C-14'), 22.69 (C-15'), 14.11 (C-16').

➤ **Elucidación estructural**

En el espectro de infrarrojo (**Espectro 11**) se observan bandas de estiramiento C=O en 1718 cm⁻¹, C-C-O en 1216 cm⁻¹ y O-C-C en 1020 cm⁻¹ lo que sugiere la presencia de un éster. Por otro lado, se observan bandas de estiramiento asimétrico y simétrico sp³ a

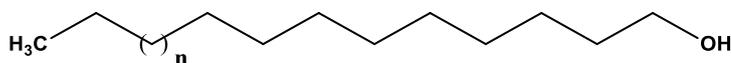
2928 y 2856 cm^{-1} respectivamente, correspondiente a metilos y bandas de flexión en tijera C-H a 1424 cm^{-1} correspondiente a metilenos, en 3019.87 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento asimétrico sp^2 lo que confirma la naturaleza hidrocarbonada del compuesto. Finalmente, en 1654 cm^{-1} se observa una banda correspondiente al carbonilo de la cetona α , β insaturada.

En el espectro de masas (**Espectro 12**) se observa la presencia del ion molecular M^+ a m/z 678 acorde a su fórmula general $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_3$, los fragmentos más interesantes para el diagnóstico estructural son: el pico base se observa a m/z 232 lo que coincide con la eliminación de parte de la estructura hidrocarbonada correspondiente a una pérdida parcial del anillo C y la pérdida completa de los anillos D y E. El fragmento del ion correspondiente a m/z 273 corresponde a la pérdida completa de los anillos C, D y E de la estructura hidrocarbonada. Por último el fragmento de ion correspondiente a m/z 423 corresponde a la pérdida completa del fragmento del oleaneno.

El espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 14**) mostró 46 señales y mediante la modalidad DEPT se observaron 9 metilos, 23 metilenos, 5 metinos y 9 carbonos cuaternarios. El espectro de RMN ^{13}C muestra señales características a δ_{C} 200.2, 128.1 y 170.36 correspondiente a una cetona α , β insaturada de las posiciones 11, 12 y 13 respectivamente, lo anterior se corrobora en el espectro de RMN ^1H (**Espectro 13**) con la presencia en δ_{H} 5.59 de un singulete que integra para un hidrógeno vinílico asignado al H-12. En δ_{H} 4.52 ($J = 11.6, 4.8 \text{ Hz.}$) se observa un doble de dobles que integra para un oximetino correspondiente al hidrógeno de la posición 3, lo que coincide con el desplazamiento químico a δ_{C} 80.27 del carbono carbinólico. En adición, se observa un singulete a δ_{H} 2.36 que corresponde al H-9, lo que concuerda con el metino a δ_{C} 61.68 del C-9, en δ_{H} 1.25 se observa una señal intensa cuyo desplazamiento químico a campo alto nos indica que se trata de una serie de metilenos correspondiente a una cadena alifática y en δ_{H} 2.29 se observa un triplete que integra para dos hidrógenos correspondientes al metileno de la posición 2' de la cadena alifática. Finalmente en δ_{C} 173.66 se observa una señal correspondiente al C-1' del grupo éster. La

comparación de los desplazamientos químicos coincide con lo reportado para la estructura del 3 β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (**63**) (Wang 2007).

8.1.5. Alcohol lipídico (**64**)



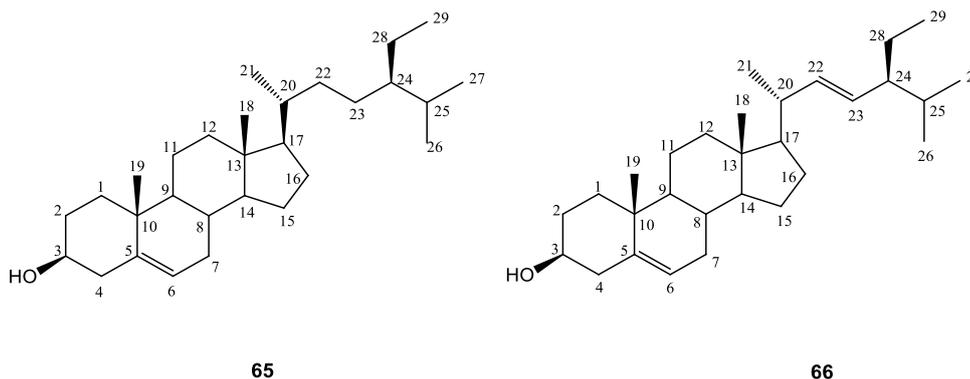
➤ Características físicas

Sólido blanco amorfo (2.9 g)
Rendimiento en el extracto total seco: 1.8 %
Pf. 74 -76 ° C

➤ Elucidación estructural

En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 15**) se observa un triplete en δ_{H} 3.65 correspondiente a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, en δ_{H} 1.26 se observa una señal intensa la cual integra para 22 hidrógenos aproximadamente correspondiente a metilenos de una cadena alifática. Por las señales observadas se puede deducir que se trata de un alcohol lipídico. Sin embargo, a campo alto (δ_{H} 0.6 – 1) se observan señales de baja intensidad correspondiente a metilos y metilenos y a campo bajo se observan señales bajas entre (δ_{H} 4.5 - 5.5) que pueden corresponder a hidrógenos vinílicos, por lo que se deduce que se trata de una mezcla del alcohol lipídico con un terpeno que se encuentra en menor proporción. Debido a la ubicuidad de este tipo de sustancias naturales en especies vegetales, no se continuó con el análisis estructural.

8.1.6. Mezcla β -sitosterol y estigmasterol (65) y (66)



➤ Características físicas y espectroscópicas.

✓ Físicas

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (100.2 mg).

Rendimiento en el extracto total seco: 0.06 %

Pf. 131 - 133 ° C, Lit. Pf. 137-139 ° C (Matsunaga y cols. 1988)

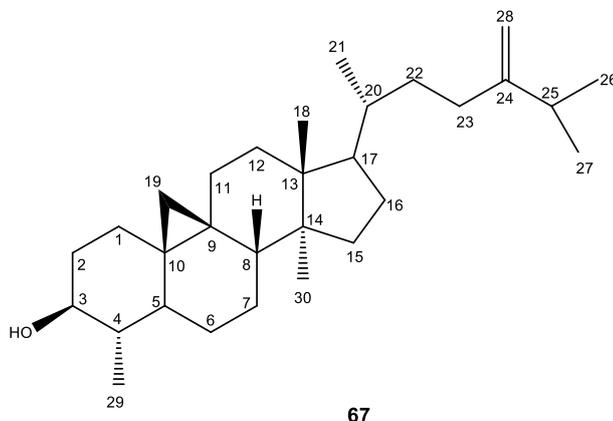
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 0.68 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26), 0.85 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-27), 0.91 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 1 (3H, s, H-19), 3.51 (1H, m, H-3), 5.01 (1H, dd, $J = 15.4, 8.3$ Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, H-22), 5.34 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6).

➤ Elucidación estructural

El espectro de RMN ^1H (**Espectro16**) muestra una señal múltiple en δ_{H} 3.51 que integra para un hidrógeno, correspondiente a un hidrógeno geminal al hidroxilo que puede asignarse al H-3. Lo anterior se corrobora por las señales que se describen a continuación: En δ_{H} 5.34 se observa un doblete distorsionado que integra para un hidrógeno correspondiente al hidrógeno vinílico H-6. A campo alto (δ_{H} 0.67 – 1.00) se observan señales singulete que corresponden a los metilos H-18 y H19 de un fitoesterol. Estos desplazamientos químicos concuerdan con lo reportado para la estructura del β – sitosterol (**65**). Sin embargo, en δ_{H} 5.15 y en δ_{H} 5.01 se observan dos dobles de dobles que corresponden a una olefina *trans*- disustituida que se asignarían al H-22 y H-23 del estigmasterol (**66**). Por lo que se deduce que esta muestra consiste

en una mezcla de dos compuestos β -sitosterol (**65**) y estigmasterol (**66**), los cuales se encuentran en proporción 85:15 (Ahmed y cols. 2010).

8.1.7. Cicloeucalenol (**67**)



➤ Características físicas y espectroscópicas

✓ Físicas

Sólido blanco amorfo (18 mg)

Rendimiento en el extracto total seco: 0.01 %

Pf. 105-110 ° C, Lit. Pf. 138-139 ° C (Song y cols. 2007).

✓ Espectroscopia de infrarrojo

IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4215, 3020, 2923, 2852, 2398, 1521, 1422, 1216, 1028, 929, 851, 757, 670, 471, 461, 442.

✓ Espectrometría de masas

EM-IE (m/z): 426, 408, 393, 340, 312, 300, 284, 256, 241, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 129, 115, 98, 83, 73, 60, 43, 29.

✓ Espectroscopia de RMN

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.14 (1H, *d*, *J* = 4.1 Hz, H-19a), 0.38 (1H, *d*, *J* = 3.9 Hz, H-19b), 0.89 (1H, *s*, H-30), 0.97 (1H, *s*, H-18), 0.98 (1H, *s*, H-29), 1.01 (1H, *d*, *J* = 2.2

Hz, H-26), 1.03 (1H, *d*, $J = 2.2$ Hz, H-27), 1.25 (22H, *s*, 4'-15'), 2.13 (1H, *ddd*, $J = 15.4$, 9.5, 3.8, H-23), 2.23 (1H, *m*, H-25), 2.34 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 3.21 (1H, *ddd*, $J = 10.7$, 9.1, 4.7, H-3), 4.66 (1H, *d*, $J = 1.4$ Hz, H-28b), 4.71 (1H, *s*, H-28a).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ): 30.78 (C-1), 34.78 (C-2), 76.60 (C-3), 44.57 (C-4), 43.32 (C-5), 24.66 (C-6), 24.70 (C-7), 46.87 (C-8), 23.54 (C-9), 29.68 (C-10), 26.96 (C-11), 32.87 (C-12), 45.34 (C-13), 48.89 (C-14), 34.99 (C-15), 28.11 (C-16), 52.20 (C-17), 17.79 (C-18), 27.24 (C-19), 36.12 (C-20), 18.33 (C-21), 35.33 (C-22), 31.31 (C-23), 156.91 (C-24), 33.80 (C-25), 21.99 (C-26), 21.86 (C-27), 105.91 (C-28), 14.39 (C-29), 19.13 (C-30).

➤ **Elucidación estructural**

En el espectro de infrarrojo (**Espectro 17**) se observa una banda de estiramiento asimétrico sp^2 a 3020 y sp^3 a 2923 cm^{-1} y una banda de estiramiento simétrico C-H en 2852 cm^{-1} que corresponde a metilenos, lo que nos sugiere una estructura hidrocarbonada del compuesto. Adicionalmente, se observa en 1422 cm^{-1} una banda de flexión O-H en el plano que indica la presencia de un alcohol, lo cual se confirma al observar una banda de estiramiento asimétrico C-C-O en 1216 cm^{-1} y una banda de flexión O-H fuera del plano en 670 cm^{-1} .

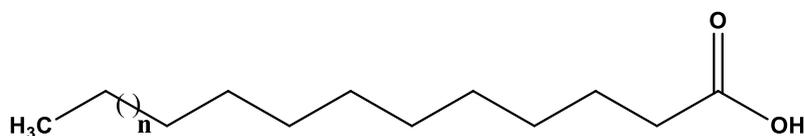
En el espectro de masas (**Espectro 18**) el ion molecular M^+ se observa a m/z 426 conforme a su fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, el fragmento de ion a m/z 408 corresponde a la pérdida de una molécula de agua.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 20**) se observan 41 señales y mediante la modalidad DEPT se encontraron que 6 metilos, 12 metilenos, 7 metinos y 5 carbonos cuaternarios correspondían a las señales para el compuesto (**67**). Esta afirmación se corrobora con el espectro de RMN ^1H (**Espectro 19**) donde se observan dos protones vinílicos uno como singulete en δ_{H} 4.71 que integra para un hidrógeno correspondiente al H-28a y el otro en δ_{H} 4.66 ($J = 1.4$ Hz) donde se observa un doblete que integra para el hidrógeno de la posición H-28b, lo que concuerda con los desplazamientos químicos de los carbonos en δ_{C} 156.91 y 105.91. Adicionalmente, en δ_{H} 3.21 ($J = 10.7$, 9.1, 4.7

H_z.) se observa un doble de doble de dobles correspondiente a un hidrógeno geminal al hidroxilo de la posición 3, concordando con el desplazamiento químico del carbono carbinólico a δ_C 76.60. A campo alto se observa un doblete en δ_H 0.14 ($J = 4.1$ Hz.) y un doblete en δ_H 0.38 ($J = 3.9$ Hz.) correspondiente a los protones de la posición 19a y 19b respectivamente de un grupo ciclopropilo. Estos desplazamientos químicos coinciden con lo reportado para el cicloeucalenol (**67**) (Kikuchi y cols. 1986).

Sin embargo, las señales adicionales observadas sugieren la presencia de un ácido graso. Lo anterior se corrobora por las señales que se describen a continuación: en el espectro de RMN ¹H se observa una señal intensa en δ_H 1.25 cuyo desplazamiento químico corresponde a una serie de metilenos que forman una cadena alifática lo que concuerda con las señales de carbono en δ_C 29.06 a 29.68 y en δ_H 2.34 se observa un triplete correspondiente al protón de la posición 2 del ácido graso. Finalmente, en el espectro de RMN ¹³C en δ_C 178.37 se observa la señal de un grupo carbonilo correspondiente al C-1 del grupo éster. La observación de estas señales nos indica que **67** se encuentra mezclado con un ácido graso.

8.1.8. Ácido graso (68)



68

➤ Características físicas y espectroscópicas

✓ Físicas

Sólido blanco amorfo (19.6 mg)
Rendimiento en el extracto total seco: 0.1 %
Pf. 72-74°C

✓ Espectroscopia de infrarrojo

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2956, 2915, 2847, 1700, 1466, 1431, 1376, 1348, 1300, 1262, 1227, 1210, 1097, 1022, 934, 908, 804, 723, 688, 547, 434, 403.

✓ Espectroscopia de RMN

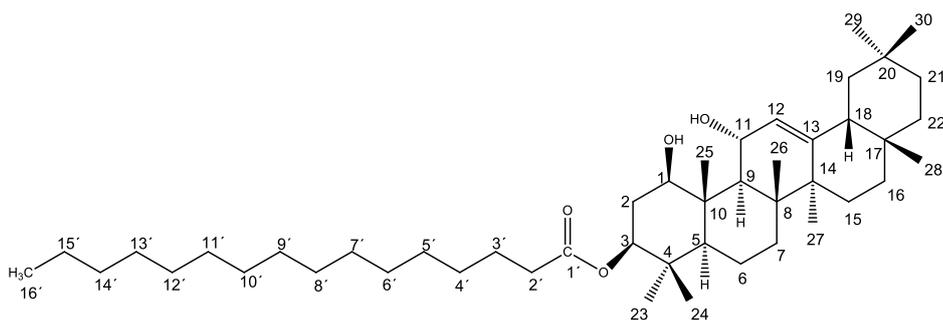
RMN ^1H (300 MHz. CDCl_3 , δ): 0.88 (3H, *t*, $J = 6.7$ Hz, H-14), 1.29 (22H, *s*, 4-11), 1.60 (1H, *dd*, $J = 14.5, 7.3$ Hz, H-3), 2.29 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-2).

➤ Elucidación estructural

En el espectro de infrarrojo (**Espectro 21**) se observa una banda de estiramiento asimétrico C-H en 2956 cm^{-1} correspondiente a un grupo metilo, en 2915 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento asimétrico C-H de gran intensidad y en 2847 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento simétrico C-H de intensidad fuerte, ambas señales corresponden al grupo metileno, en 1770 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento C=O correspondiente al grupo carbonilo de un ácido orgánico saturado. En 724 se observa una banda de balanceo de cadena responsable de al menos 4 grupos metileno. Finalmente de 2500 a 3200 cm^{-1} aproximadamente se observa una banda ancha correspondiente al OH del grupo carboxilo.

En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 22**) aparece un triplete en δ_{H} 2.29 que integra para un protón presumiblemente pertenece al H-2, en δ_{H} 1.60 ($J = 14.5, 7.3$ Hz) se observa un doble de dobles que aparentemente pertenece al H-3. En δ_{H} 1.25 aparece una señal intensa la cual integra aparentemente para 22 hidrógenos de una cadena alifática de metilenos. Finalmente, en δ_{H} 0.88 ($J = 6.7$ Hz) aparece un triplete que podría ser asignado al metilo de la posición 14. Debido a que no se realizaron otros experimentos de RMN y con base al análisis de los espectros de infrarrojo y RMN ^1H , se propone la posible estructura del compuesto como la de un ácido graso (**68**). Debido a la ubicuidad de este tipo de sustancias naturales en especies vegetales, no se continuó con el análisis estructural.

8.1.9. 3 β -palmitoiloxi-1 β , 11 α -dihidroxi-olean-12-eno (69)



69

➤ Características físicas y espectroscópicas.

✓ Físicas

Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas (52.2 mg).

Rendimiento en el extracto total seco: 0.03 %

Pf. 222 – 224 °C

✓ Espectrometría de masas

EM-IE (*m/z*): 678, 663, 651, 557, 551, 523, 495, 464, 440, 423, 407, 368, 353, 302, 287, 273, 232, 217, 175, 174, 135, 121, 95, 69, 57, 42, 18, 17.

✓ Espectroscopia de RMN

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.83 (3H, *s*, H-29), 0.86 (6H, *d*, *J* = 3.6 Hz, H-23, 24), 0.89 (9H, *s*, H-5, 30, 16'), 1 (3H, *s*, H-27), 1.08 (3H, *s*, H-26), 1.25 (20H, *s*, H-4'-13'), 2.30 (2H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 3.59 (1H, *dd*, *J* = 11.5, 4.6 Hz, H-1), 4.31 (1H, *dd*, *J* = 7.9, 4.0 Hz, H-11), 4.56 (1H, *dd*, *J* = 12.2, 4.5 Hz, H-3), 5.28 (1H, *d*, *J* = 4.0 Hz, H-12).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, δ): 76.49 (C-1), 32.15 (C-2), 77.32 (C-3), 44.05 (C-4), 52.26 (C-5), 17.65 (C-6), 32.79 (C-7), 43.84 (C-8), 56.82 (C-9), 37.83 (C-10), 66.99 (C-11), 123.76 (C-12), 150.56 (C-13), 41.68 (C-14), 26.38 (C-15), 26.65 (C-16), 32.18 (C-17), 46.34 (C-18), 46.59 (C-19), 31.09 (C-20), 34.60 (C-21), 36.91 (C-22), 27.95 (C-23),

16.24 (C-24), 13.09 (C-25), 18.04 (C-26), 26.23 (C-27), 28.46 (C-28), 33.23 (C-29), 23.61 (C-30), 173.50 (C-1'), 34.79 (C-2'), 25.18 (C-3'), 29.17-29.69 (C4'-13'), 31.92 (C-14'), 22.69 (C-15'), 14.11 (C-16').

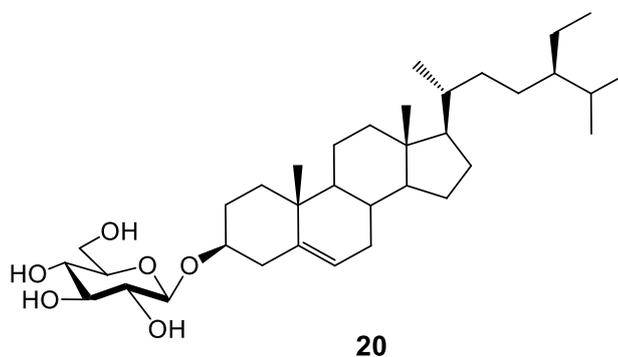
➤ **Elucidación estructural**

En el espectro de masas (**Espectro 23**) no se observa la presencia del ion molecular, esto se debe a una β eliminación en el anillo C, lo que se corrobora con la presencia del fragmento de ion a m/z 678. Los fragmentos más interesantes para el diagnóstico estructural son: el pico base se observa a m/z 217 lo que coincide con la eliminación de parte de la estructura hidrocarbonada correspondiente a una pérdida parcial del anillo C y la pérdida completa de los anillos D y E. El fragmento del ion correspondiente a m/z 422 corresponde a la pérdida completa del ácido graso, junto con la pérdida total del anillo A y la pérdida parcial del anillo B de la estructura hidrocarbonada. Por último el fragmento de ion correspondiente a m/z 255 coincide con la pérdida completa del ácido graso.

En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 24**) se observa un doblete en δ_{H} 5.28 ($J = 4.0$ Hz) el cual integra para un hidrógeno vinílico correspondiente al H-12 y cuya multiplicidad y posición indica que el C-11 es un metino, esto se confirma con el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 25**) donde se observan las señales a δ_{C} 150.56 y 123.76 correspondiente al C y CH del enlace vinílico respectivamente. Además en δ_{H} 4.31 ($J = 7.9, 4.0$ Hz) se observa un doble de dobles debido a un hidroximetino correspondiente al H-11 lo que se corrobora con la presencia de un oximetino a δ_{C} 66.99. La comparación de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C de **69** con las señales descritas para el 3 α , 11 α , 21 β -trihidroxi-olean-12-eno (Cáceres y cols. 2008) permitió establecer la estereoquímica relativa α para el hidroxilo del C-11. Por ejemplo, la señal del H-11 del 3 α , 11 α , 21 β -trihidroxi-olean-12-eno aparece en δ_{H} 4.21 ($dd, J = 8.2, 3.8$ Hz) mientras que en **69** aparece en δ_{H} 4.31 ($dd, J = 7.9, 4.0$ Hz). Similarmente, el desplazamiento químico para el C-11 de 3 α , 11 α , 21 β -trihidroxi-olean-12-eno aparece a δ_{C} 67.6 mientras que en **69** aparece a δ_{C} 66.99. Por otra parte, el acoplamiento pseudo-*trans*-diaxial entre el H-9 y el H-11 ($J = 7.9$) de **69** confirmó la orientación α ecuatorial del grupo OH, la cual se

encuentra menos congestionada. Como evidencia adicional a la anterior afirmación, puede mencionarse que la oxidación del C-11 por métodos químicos de la hederagenina, un triterpeno con el mismo esqueleto, genera el hidroxilo con orientación α (Chávez y Delgado 1994). En δ_H 4.56 ($J = 4.5, 12.2$ Hz) se observa un doble de dobles el cual integra para un hidrógeno correspondiente al H-3 unido al grupo éster de la cadena alifática, concordando con la señal en δ_C 76.49 del carbono carbinólico, en δ_H 3.59 ($J = 4.6, 11.5$ Hz.) se observa un doble de dobles correspondiente al H-1 unido a un grupo hidroxilo, en δ_H 2.30 ($J = 7.5$ Hz.) se observa un triplete el cual integra para dos hidrógenos correspondientes a la posición 2' de la cadena alifática unido al grupo éster. En δ_H 1.25 se observa un singulete de gran intensidad correspondiente a los metilenos de la cadena alifática, los cuales concuerdan con los desplazamientos en δ_C 29.69 a 29.172 de los carbonos en la posición 4' a 13'. Estos desplazamientos químicos coinciden con la estructura del 3 β -palmitoiloxi-1 β -11 α -dihidroxi-olean-12-eno (**69**) reportada por Wang en 2008, sin embargo, se corrige la orientación del hidroxilo del C-11 reportada en orientación β por la orientación α .

8.1.10. β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**)



➤ Características físicas y espectroscópicas

✓ Físicas

Sólido blanco amorfo (53 mg)
Rendimiento en el extracto total seco: 0.03%
Pf. 275-277 ° C

✓ Espectroscopia de RMN

RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ): 0.67 (3H, s, H-18), 0.85-0.97 (12H, 26, 27, 21, 29), 1 (3H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-19), 2.50 (1H, *t*, $J = 12.5$, H-4b), 2.77 (1H, *dd*, $J = 12.5, 4.5$ Hz, H-4a), 3.9 - 4.33 (H-glucósido), 4.45 (1H, *dd*, $J = 11.7, 5.2$ Hz, H-6'a), 4.61 (1H, *dd*, $J = 11.8, 2.4$ Hz, H-6'b), 5.09 (1H, *d*, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 5.37 (1H, *d*, $J = 5.2$ Hz, H-6).

➤ Elucidación estructural

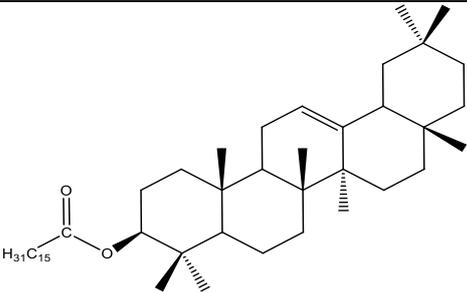
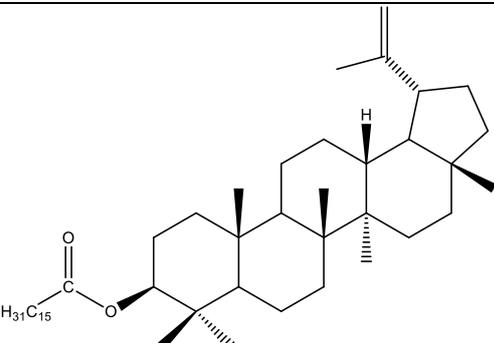
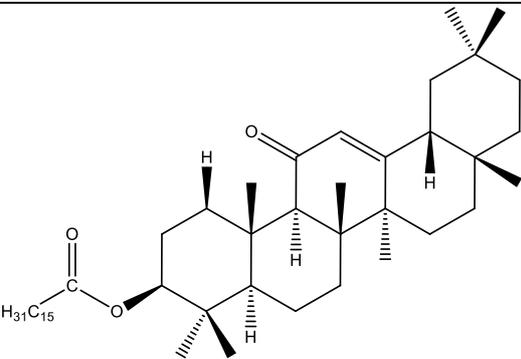
El perfil del espectro de RMN ^1H (**Espectro 26**) permitió deducir que se trata de un glucósido de fitoesterol, de acuerdo a la descripción siguiente: Se observa un doblete a δ_{H} 5.37 que integra para el H-6 vinílico, de δ_{H} 3.9 a 4.33 se observa una serie de señales correspondientes a hidrógenos geminales a hidroxilos, lo que sugiere la presencia de un grupo glucopiranósido, en δ_{H} 5.09 se observa un doblete que integra para un hidrógeno que corresponde al hidrógeno anomérico del glucopiranósido H-1'. En δ_{H} 4.61 se observa un doble de dobles que integra para un hidrógeno el cual corresponde al H-6'b y otro doble de dobles a δ_{H} 4.45 asignada al H-6'a del glucopiranósido. Con base a las señales asignadas se deduce que la estructura corresponde al β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**) (Kim y cols. 2005).

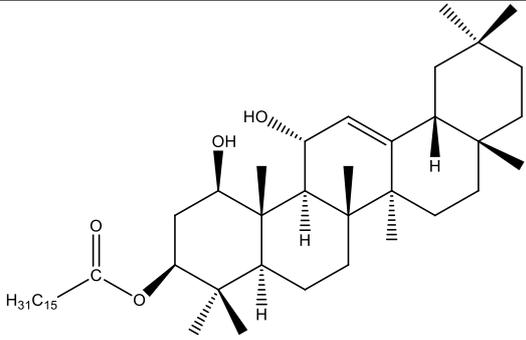
8.2. Actividad biológica

8.2.1. Ensayo de inhibición de la inflamación inducida por ATF en oreja de ratón.

El proceso inflamatorio en respuesta a la aplicación tópica del 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (ATF) se debe a la activación de la proteína cinasa C (PCC) dérmica, la cual inicia la respuesta inflamatoria. Todos los agentes anti-inflamatorios muestran actividad en este modelo, pero principalmente los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) aunque los inhibidores de la COX parecen ser más efectivos que los inhibidores de la LOX para reducir la respuesta edematosa (De Young y cols. 1989; Goel y cols. 2007).

Tabla 2. Ensayo preliminar de la actividad anti-inflamatoria por ATF

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
 60^a	1 μmol/oreja	8.18±2.43	48.26*
 61^a	1 μmol/oreja	12.28±1.74	22.31
 63^a	1 μmol/oreja	10.83±1.62	31.49

 <p style="text-align: center;">69^b</p>	1 μ mol/oreja	4.80 \pm 1.24	68.76**
Extracto total^a	1 mg/oreja	10.30 \pm 1.29	34.81

Control: ^aacetona:diclorometano 1:1 (15.80 \pm 1.45), ^bcloroformo (15.37 \pm 0.52). Los datos representan el promedio de cuatro animales \pm el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnnett*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Como se observa (**Tabla 2**), tanto el compuesto **60** como **69** muestran un porcentaje de inhibición de la inflamación mayor al extracto total y a pesar de que el compuesto **60** es el compuesto mayoritario (13.62 g, 8.5 %), no se observa su efecto anti-inflamatorio en dicho extracto. Esto podría deberse al sinergismo de todos los componentes del extracto que pueden inhibir el efecto anti-inflamatorio de **60** y **69** o por la presencia de algún compuesto pro-inflamatorio que no fue aislado.

Por otra parte, de los metabolitos secundarios evaluados tres tienen el esqueleto de la β -amirina y varios estudios han propuesto que a mayor número de grupos hidroxilos presentes en el esqueleto de la β -amirina mayor será su actividad anti-inflamatoria. Esta propuesta está apoyada por este estudio en el que se observa que **69** con dos grupos hidroxilos tiene una mayor actividad anti-inflamatoria comparado con el compuesto **60** que no tiene ningún grupo hidroxilo en su esqueleto. También puede observarse que la presencia del grupo funcional cetona en el C-11 en **63** disminuye la actividad anti-inflamatoria comparada con **60** que no tiene ningún sustituyente en esa posición. Por otra parte se observa que **61** el cual presenta un esqueleto derivado del lupeol es el que tuvo menor actividad anti-inflamatoria.

La diversidad estructural de los triterpenos y su naturaleza hidrofóbica podría ser la responsable de sus efectos biológicos y farmacológicos. Estos efectos pueden deberse a su interacción con diversas moléculas o mecanismos del proceso de inflamación y como se observa en este estudio hay una correlación entre la actividad biológica y la estructura química.

En este ensayo preliminar **60** y **69** mostraron diferencias significativas con respecto al control, **69** mostró un porcentaje de inhibición de la inflamación mayor al 50 % comparado con los otros compuestos, por lo que se procedió a realizar la curva dosis-respuesta para obtener la dosis inhibitoria media (DI_{50}) de este compuesto, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. DI_{50} del compuesto **69** por método de edema auricular de ratón inducido por ATF

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)	DI_{50}
Indometacina	0.031	12.78 \pm 1.21	13.36	0.24 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r = 0.98
	0.1	10.74 \pm 1.13	27.19*	
	0.31	5.62 \pm 0.89	61.90**	
	1	2.88 \pm 0.73	78.76**	
69	0.1	12.63 \pm 0.54	14.06	0.60 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r = 0.99
	0.31	10.98 \pm 0.90*	25.28**	
	1	4.18 \pm 0.89**	71.54**	
	1.78	1.72 \pm 0.79**	88.32**	

Los datos representan el promedio de seis animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

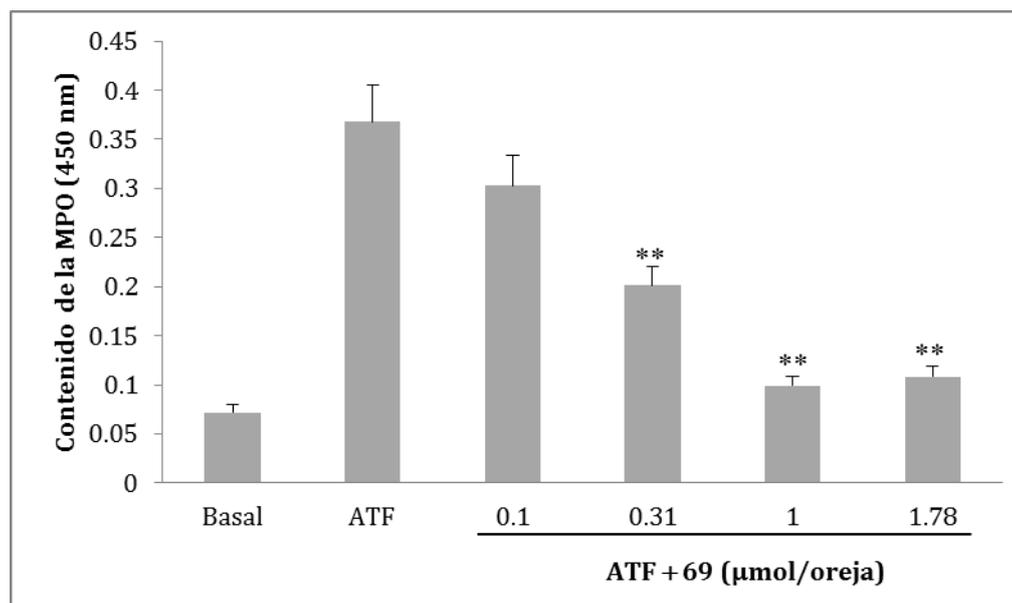
Como puede observarse (**Tabla 3**), la administración tópica de **69** disminuyó significativamente el edema auricular inducido por ATF a dosis de 0.31, 1, 1.78 ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$) comparado con el grupo control y su máximo efecto anti-inflamatorio

(88.32 %) fue a una dosis de 1.78 $\mu\text{mol/oreja}$ comparado con la indometacina (78.76 %) que mostró su máximo efecto anti-inflamatorio a una dosis de 1 $\mu\text{mol/oreja}$. Por otra parte, tanto indometacina como **69** mostraron un efecto anti-inflamatorio dosis-dependiente y valores de DI_{50} de 0.24 $\mu\text{mol/oreja}$ ($r = 0.98$) y 0.60 $\mu\text{mol/oreja}$ ($r = 0.99$) respectivamente. Durante el proceso de inflamación los leucocitos (neutrófilos) son las primeras células que son transportadas desde la sangre periférica hasta el sitio de inflamación. La MPO se ha utilizado como marcador bioquímico del contenido tisular de leucocitos en sitios de inflamación ya que el contenido de la MPO esta correlacionada con el número de células infiltradas en regiones inflamadas (Bradley y cols. 1982; Suzuki y cols. 1983). Por lo que después de evaluar la inflamación de las orejas se evaluó el contenido de MPO en dichos tejidos.

8.2.2. Contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina)

La aplicación tópica de **69** en la oreja de ratón a dosis de 0.31, 1, 1.78 $\mu\text{mol/oreja}$ disminuyó significativamente el contenido de la MPO (**Gráfica 1**) lo que correlaciona con lo observado en la **Tabla 3**, indicando que la inhibición de la migración de neutrófilos al sitio de inflamación es parte de su mecanismo anti-inflamatorio. El análisis de correlación de Pearson de todas las biopsias de **69** mostró una correlación positiva ($r = 0.67$, $p < 0.05$), lo que sugiere que la inhibición del edema de **69** está asociado con la inhibición de la infiltración de neutrófilos en la biopsia de la oreja.

Gráfica 1. Contenido de MPO en el modelo de edema auricular de ratón inducido por ATF.



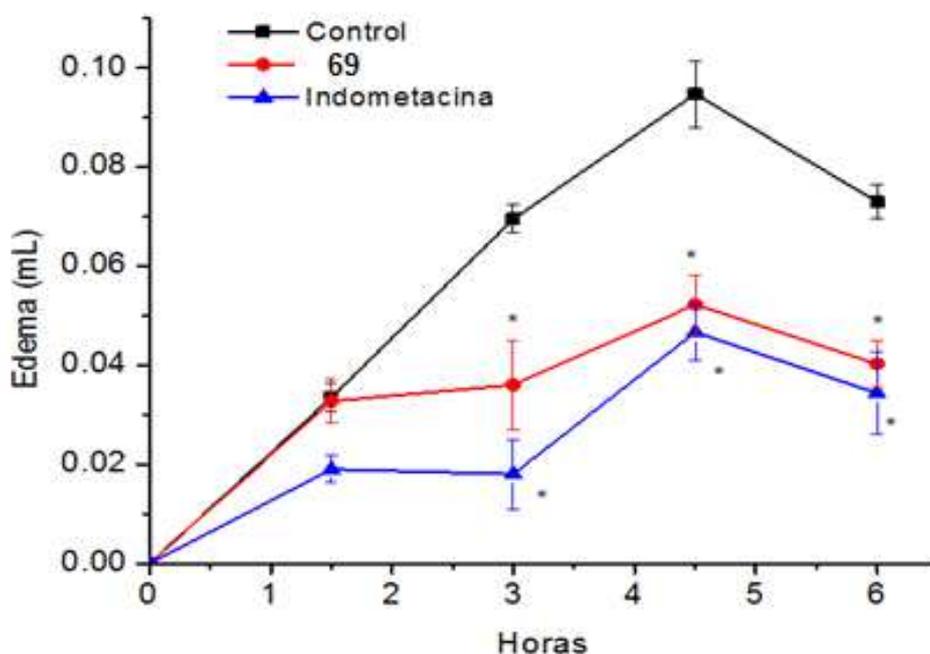
Los datos representan el promedio de seis animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Para evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto total de las hojas y de las sustancias puras aisladas, obtenidas de *Sapium nitidum*, se utilizó el método de edema auricular de ratón inducido por ATF como criterio de inclusión para seleccionar los compuestos más activos y posteriormente evaluarlos por el ensayo del edema plantar de ratón inducido por carragenina el cual ha mostrado ser altamente predictivo de la actividad anti-inflamatoria de fármacos en enfermedades inflamatorias humanas y la dosis efectiva de los AINEs (anti-inflamatorios no esteroides) en este modelo ha correlacionado bien con la dosis efectiva en pacientes (Otterness y cols. 1979).

8.2.3. Ensayo del edema plantar de ratón inducido por carragenina

La respuesta inflamatoria a carragenina consiste de tres fases. La primera fase mediada por histamina y serotonina seguida de una fase secundaria mediada por cininas (bradicinina) y la fase final es atribuida a la producción local de prostaglandinas (Di Rosa y cols. 1971). Muchos fármacos anti-inflamatorios son efectivos en la última fase de formación del edema.

Gráfica 2. Actividad anti-inflamatoria de **69** por método de edema plantar de ratón inducido por carragenina.



Los datos representan el promedio de cada grupo de animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Tukey-Kramer* y los valores $p \leq 0.05$ (*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Como se observa (**Gráfica 2**), **69** a las 1.5 h no presenta efecto anti-inflamatorio con respecto al control sin embargo, a la 3 h (48.20 %) empieza a mostrar actividad anti-inflamatoria y el efecto persiste hasta la 6 h (44.86 %) (**Tabla 4**). Tanto la indometacina como el compuesto **69** muestran un comportamiento de inhibición de la inflamación similar a las 4.5 y 6 h, indicando que al igual que muchos fármacos anti-inflamatorios ambos compuestos muestran actividad anti-inflamatoria en la fase 3.

Tabla 4. Actividad anti-inflamatoria de **69** por método de edema plantar de ratón inducido por carragenina.

Muestra	Dosis (mg/kg)	Volumen del edema (ml)			
		1.5 h	3 h	4.5 h	6 h
Control	-	0.033±0.002	0.069±0.002	0.094±0.006	0.073±0.003
69	31.6	0.032±0.004 (2.24 %)	0.036±0.008 (48.20 %)*	0.052±0.005 (44.85 %)*	0.040±0.004 (44.86 %)*
Indometacina	7.5	0.019±0.002 (43.28 %)	0.018±0.007 (74.10 %)*	0.046±0.005 (50.75 %)*	0.034±0.008 (52.97 %)*

Los datos representan el promedio de cada grupo de animales ± el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Tukey-Kramer* y los valores $p \leq 0.05$ (*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

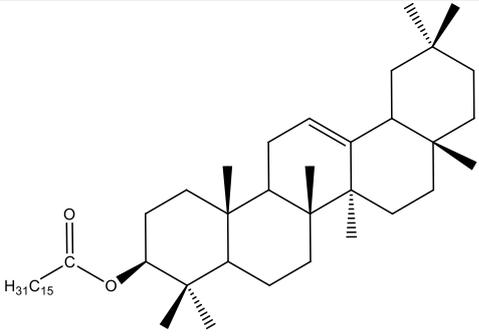
Con respecto a las dosis utilizadas en este estudio, podemos observar (**Tabla 4**) que **69** es menos tóxico que la indometacina (DL_{50} 15 mg/kg) (Gongolli 1999) por lo que se recomienda realizar la DL_{50} del compuesto **69** para conocer más acerca de su toxicidad. Estos resultados demuestran que **69** presenta un efecto anti-inflamatorio similar a la indometacina.

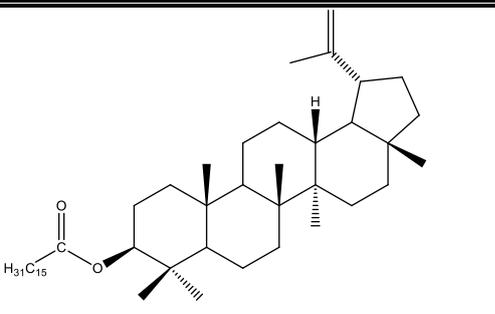
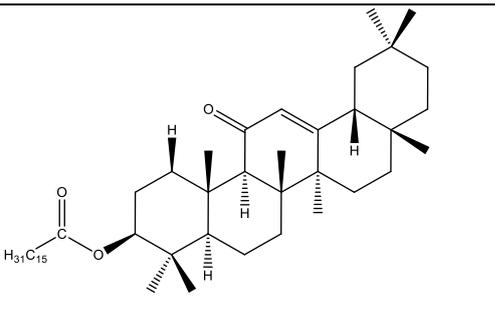
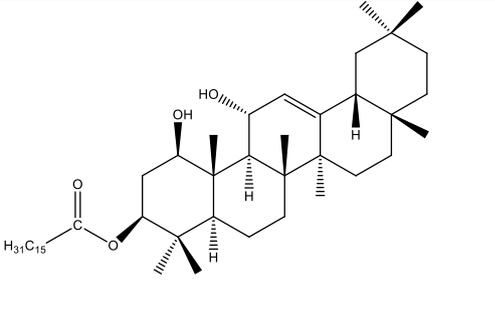
8.2.4. Ensayo de citotoxicidad por el método de tinción con Sulforrodamina B (SRB)

La SRB es un colorante que posee dos grupos sulfónicos $-\text{SO}_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y se fija selectivamente a estos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular (Vichai y Kirtikara 2006).

La actividad citotóxica del extracto total y de los metabolitos secundarios que fueron obtenidos en cantidades suficientes, se evaluaron utilizando el método de tinción con Sulforrodamina B.

Tabla 5. Ensayo preliminar de la actividad citotóxica por método con SRB.

Muestra	% de Inhibición de la proliferación por línea celular					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
 60	SA	1.81	6.88	10.46	3.24	21.95

 <p style="text-align: center;">61</p>	SA	3.05	3.46	10.24	13.43	19.59
 <p style="text-align: center;">63</p>	SA	0.08	SA	18.69	5.15	20.06
 <p style="text-align: center;">69</p>	29.56	20.72	9.86	7.24	11.53	12.89
Extracto total	39.14	30.91	100	28.17	23.18	41.73

Concentración: 50 µg/ml para extracto total, 50 µM para los compuestos puros, vehículo DMSO, U251= Glía de sistema nervioso central, PC-3= Próstata, K562= Leucemia, HCT-15 = Colon, MCF-7= Mama, SKLU= Pulmón, S.A= Sin actividad.

Como se puede observar en el ensayo preliminar (**Tabla 5**) todas las sustancias puras evaluadas tuvieron un porcentaje de inhibición de la proliferación celular menor al 50 % en cada una de las líneas celulares por lo que ya no fue necesario realizar la DI_{50} de los compuestos. Cabe mencionar que el extracto total en la línea celular K562 mostró un porcentaje de inhibición del 100 %, esto podría deberse al sinergismo entre todos los compuestos que integran el extracto total o por la presencia de un metabolito secundario que no fue aislado.

La línea celular K562, es una línea eritroleucémica por lo que la capacidad citotóxica del extracto total podría deberse a diferentes mecanismos de inhibición de la proliferación de las células eritropoyéticas mediante la intercalación del extracto sobre el material genético, afectando el funcionamiento mitocondrial, produciendo especies reactivas para activar la apoptosis o inhibiendo mediadores celulares que forman parte del metabolismo de las células tumorales. Finalmente se recomienda realizar otras pruebas para comprobar que el extracto total solo inhibe la proliferación de células tumorales y no afecta células normales.

9. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Del extracto DCM-MeOH de las hojas de *Sapium nitidum* se aislaron los triterpenos esterificados palmitato de β -amirilo (**60**), palmitato de lupeólo (**61**), 3β -palmitoiloxi-11-oxo-olean-12-eno (**63**) y 3β -palmitoiloxi-1 β , 11 α -dihidroxi-olean-12-eno (**69**) los cuales no habían sido reportados en el género.
- Adicionalmente, se aislaron los triterpenos acetato de lupeólo (**62**), cicloeucalenol (**67**), β -sitosterol (**65**), estigmasterol (**66**), β -D-glucósido de β -sitosterilo (**20**) y un alcohol lipídico (**64**).
- Se corrigió la configuración del C-11 de la estructura **69**, para la cual se informó originalmente que el hidroxilo en ese átomo de carbono tenía orientación β , y en este trabajo se estableció con orientación α .
- Se obtuvieron 23.9 g de la mezcla de **60** + **61**, una cantidad considerable que no se había reportado en el género *Sapium*.
- La presencia de los dos grupos hidroxilos en el compuesto **69** le confirió una mayor actividad anti-inflamatoria comparada con **60** que no presenta ningún grupo hidroxilo en su estructura. Por otra parte, **69** disminuyó significativamente el contenido de MPO lo que sugiere que la inhibición de migración de neutrófilos al sitio de inflamación es parte de su mecanismo anti-inflamatorio.
- El efecto anti-inflamatorio producido por **69** y su menor toxicidad comparada con la indometacina podría hacerlo un candidato para ser evaluado terapéuticamente en diversas enfermedades inflamatorias.
- Además la presencia de un grupo cetónico en el C-11 de **63** disminuyó su actividad anti-inflamatoria comparada con **60**.

-
- El extracto total mostró actividad citotóxica del 100 % frente a la línea celular K562 lo que nos sugiere que actúa inhibiendo la proliferación de las células eritropoyéticas mediante diferentes mecanismos de acción.
 - No hay información bibliográfica sobre el uso medicinal de *Sapium nitidum*, sin embargo, en este estudio se sustenta su actividad anti-inflamatoria.
 - Finalmente, este trabajo generó un nuevo conocimiento acerca de la estructura molecular y bioactividad de los metabolitos secundarios presentes en una especie de la flora medicinal de nuestro país.

10.REFERENCIAS

- Ahmed, Y.; Sohrab, H.; Al-Reza, S.; Tareq, F.S.; Hasan, C.; Sattar, M.A. *Food and Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 549-552.
- Barbosa, P.R.; Fascio, M.; Martins, D.; Guedes, M.L.S.; Roque, N.F. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 307-308.
- Betancur, L.; Palomares, E.; Marco, J.A.; Estornell, E. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *85*, 279-282.
- Bradley, P.P.; Priebat, D.A.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206-209.
- Cáceres, D.; Mena, G.J.; Cedillo, R.; Quijano, L. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1057-1064.
- Chavez, M.I.; Delgado, G. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3869-3878.
- Choi, E.M.; Hwang, J. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 171- 175.
- Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, K. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 540-543.
- Cocco, G.; Chu, D.; Pandolfi, S. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 503-508.
- De Young, L.M.; Kheifets, J.B.; Ballaron, S.J.; Young, J.M. *Agents Actions* **1989**, *26*, 335-341.
- Devkota, H.P.; Basnet, P.; Yahara, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1289-1291.
- Di Rosa, M.; Giroud, J.P.; Willoughby, D.A. *J. Pathol.* **1971**, *104*, 15-29.
- El-Mekkawy, S.; Meselhy, M.R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 457-64.
- Farías, R.A.; Rao, V.S.; Viana, G.S.; Silveira, E.R.; Maciel, M.A.; Pinto, A.C. *Planta Med.* **1997**, *63*, 558-560.
- García, A.; Delgado, G. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 16-29.
- García, A.; Ramírez, T.; Cogordan, J.A.; Delgado G. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 1593-1602.
- Goel, G.; Makkar, H.P.S.; Francis, G.; Becker, K. *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 279-288.
- Gongolli, S. *The dictionary of substances and their effects*, 2a. Ed., Royal Society of Chemistry, **1999**, *4*, 759-761.
- Gupta, D.D.; Haque, E.; Islam, N.; Rahman, S.; Hasan, M; Shibib, B.A. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *10*, 9-11.

Hong-Bing, L.; Hua, Z.; Jin-Hai, Y.; Cheng-Hui, X.; Jian, D.; Jian-Min, Y. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 722-727.

Hsu, F.L.; Lee, Y.Y. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 308-312.

Jassbi, A.R. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1977-1984.

Johnson, I.S.; Armstrong, J.G.; Gorman, M. *Cancer Res.* **1963**, *23*, 1390-1427.

Kikuchi, T.; Kadota, S.; Tsubono, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2479-2486.

Kim, D.K.; Lim, J.P.; Kim, J.W.; Park, H.W.; Eun, J.S. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 39-43.

Machado, D.; Palmeira, S.; Conserva, L.; Lemos, R. *Biochem. Syst. and Ecol.* **2005**, *33*, 555-558.

Martínez, M.; Jiménez, J.; Cruz, R.; Juárez, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía, R. *An. Inst. Biol. UNAM* **2002**, *73*, 155-281.

Matsunaga, S.; Tanaka, R.; Akagi, M. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 535-537.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.

Niel, E.; Scherrmann, J.M. *Joint Bone Spine* **2006**, *73*, 672-678.

Organización Mundial de la Salud; www.who.int. Consultado el 30/01/2014.

Otterness, I.G.; Wiseman, E.H.; Gans, D. *Agents Actions* **1979**, *9*, 177-183.

Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Thitiponpant, Y.; Arbain, D. *Planta Med.* **1998**, *64*, 530-535.

Peres, M.T.; Delle Monache, F.; Cruz, A.B.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *56*, 223-226.

Pradhan, B.P.; De, S.; Nath, A.; Shoolery, J.M. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2593-2595.

Purushothaman, K.K.; Chandrasekharan, S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *11*, 979-980.

Ravindranath, N.; Venkataiah, B.; Ramesh, C.; Jayaprakash, P.; Das, B. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 870-871.

Reyes, B.M.; Ramírez, M.T.; Toscano, R.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1839-1845.

Sabandar, C.W.; Ahmat, N.; Jaafar, F.M.; Sahidin, I. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 27-29.

Salatino, A.; Faría, M.L.; Negri, G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 11-33.

Sawada, N.; Staecker, J.L.; Pitot, H.C. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5665-5671.

Silva, R.M.; Santos, F.A.; Rao, V.S.; Maciel, M.A.; Pinto, A.C. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 535-539.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

Song, M.C.; Yang, H.J.; Lee, D.Y.; Ahn, E.M.; Kim, D.K.; Kim, J.Y.; Chung, D.K.; Baek, N.I. *J. Appl. Bio. Chem.* **2007**, *50*, 259-263.

Souza, A.R.M.; Rodríguez, JA.; Hiruma, C.A.; Haun, M.; Nunes D.S. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 315-324.

Srinivasan, K.; Muruganandan, S.; Lal, J.; Chandra, S.; Tandan, SK.; Prakash, V.R. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *78*, 151-157.

Steinmann, V.W. *Act. Bot. Mex.* **2002**, *61*, 61-93.

Suárez, Al.; Blanco, Z.; Delle Monache, F.; Compagnone, R.S.; Arvelo, F. *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18*, 421-426.

Subramanian, S.; Nagarajan, S.; Sulochana, N. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2548-2549.

Sutthaivaiyakit, S.; Nareeboon, P.; Ruangrangsi, N.; Ruchirawat, S.; Pisutjaroenpong, S.; Mahidol, C. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 811-814.

Suzuki, K.; Ota, H.; Sasagawa, S.; Sakatani, T.; Fujikura, T. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 345-352.

Taylor, S.E.; Gafur, M.A.; Choudhury, A.K.; Evans, F.J. *Experientia* **1981**, *37*, 681-682.

Taylor, S.E.; Gafur, M.A.; Choudhury, A.K.; Evans, F.J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2749-2751.

Thomas, R.; Sah, N.K.; Sharma, P.B. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 315-324.

Vázquez, M.; Campos, J.; Armenta, S.; Carvajal, Cl. *Árboles de la región de los tuxtlas* 2010, 1ª edición, 146-147.

Vichai, V.; Kirtikara, K. *Natural Protocols* **2006**, *1*, 1112-1116.

Wahlberg, I.; Karlsson, K.; Enzell, C. *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 1383-1388.

Wang, K. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 311-313.

Wang, K. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 669-674.

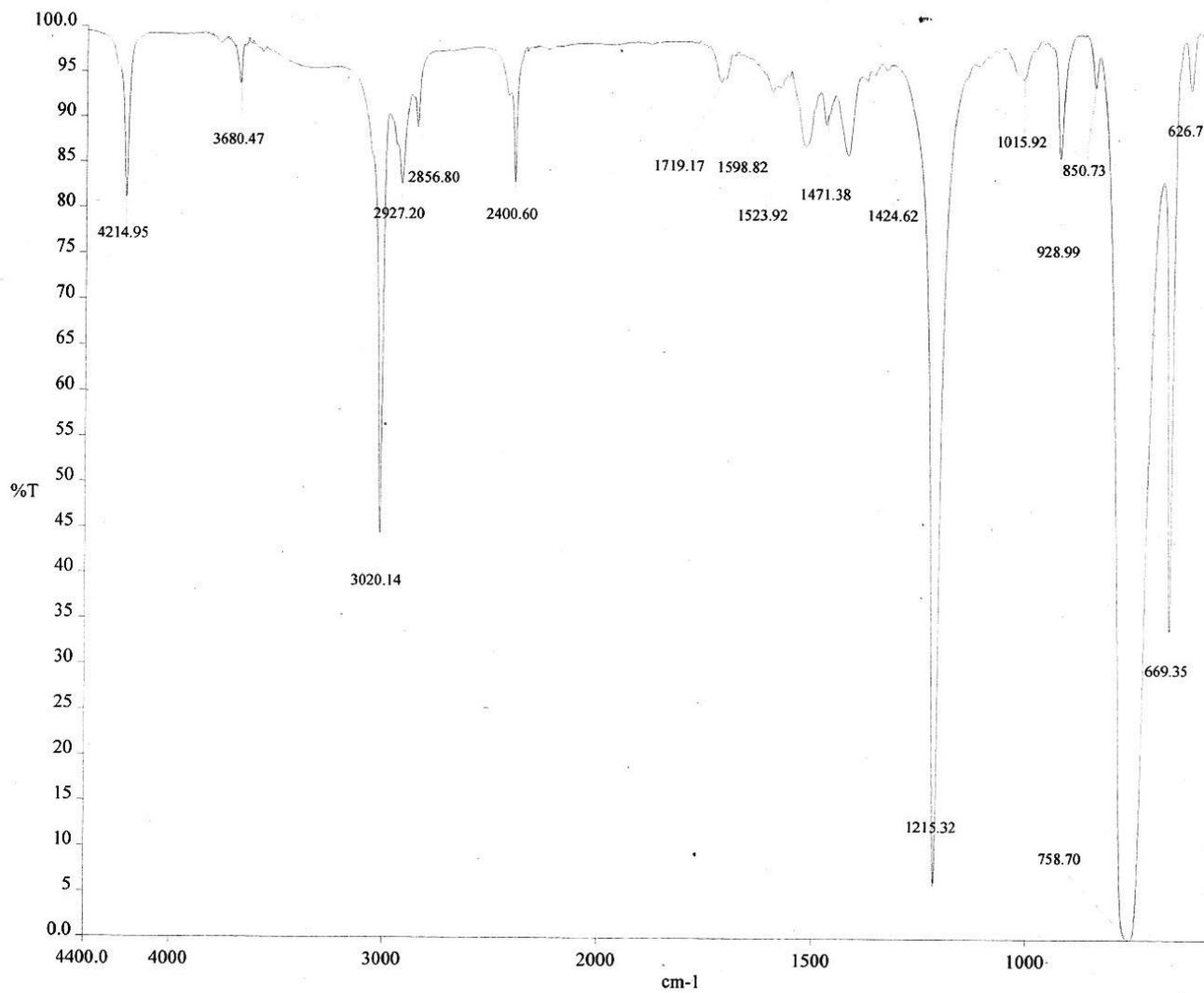
Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.

Winyard, P.G.; Willoughby, D.A. *Inflammation Protocols* **2003**, *225*, 115-121.

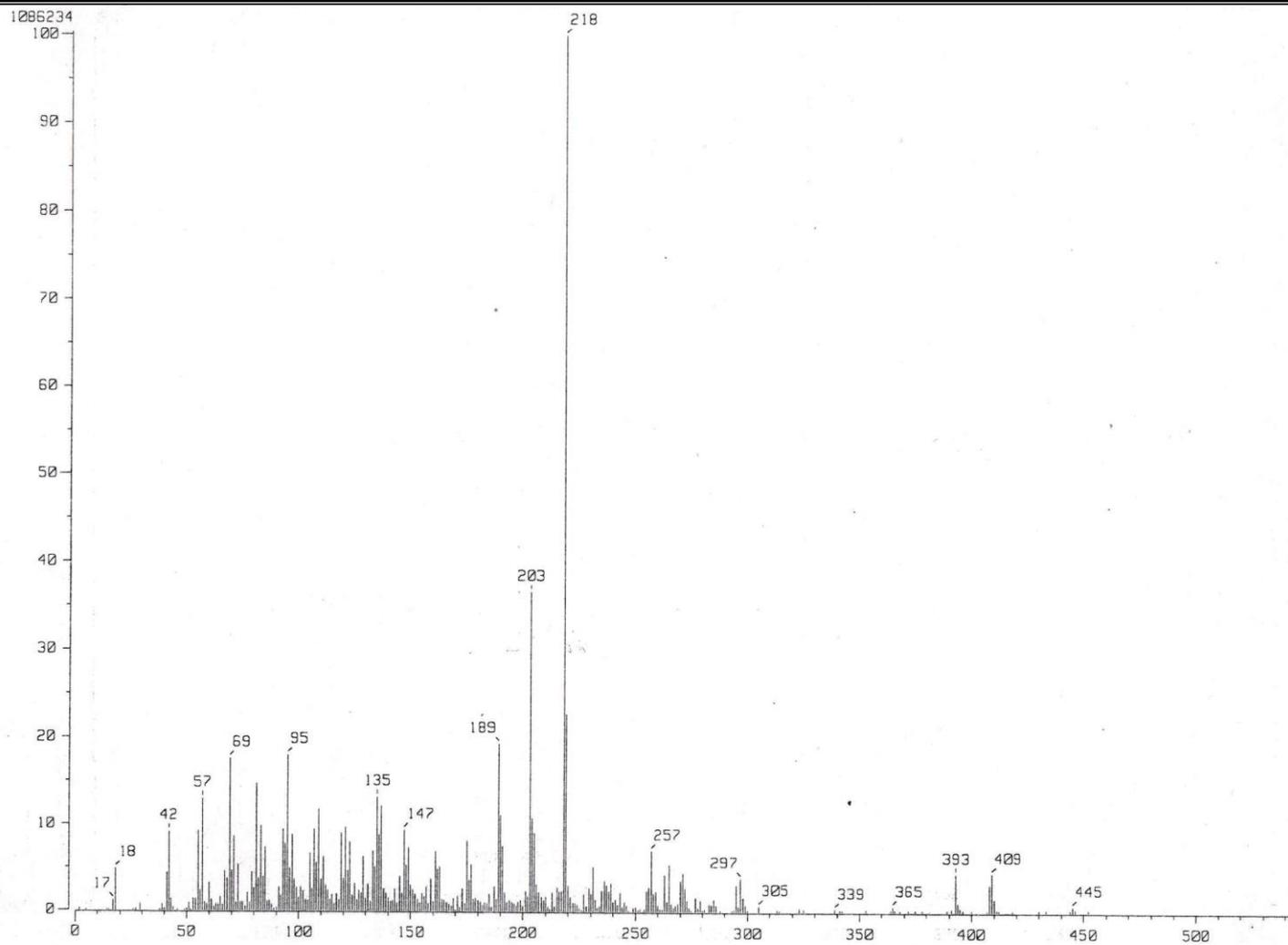
Woldemichael, G.; Gutierrez, M.T.; Franzblau, S.; Yuehong, W.; Suárez, E.;
Timmermann, B. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 598-603.

Yesilada, E.; Üstun, O.; Sezik, E.; Takaishi, Y.; Ono, Y.; Honda, G. *J. Ethnopharmacol.*
1997, *58*, 59-73.

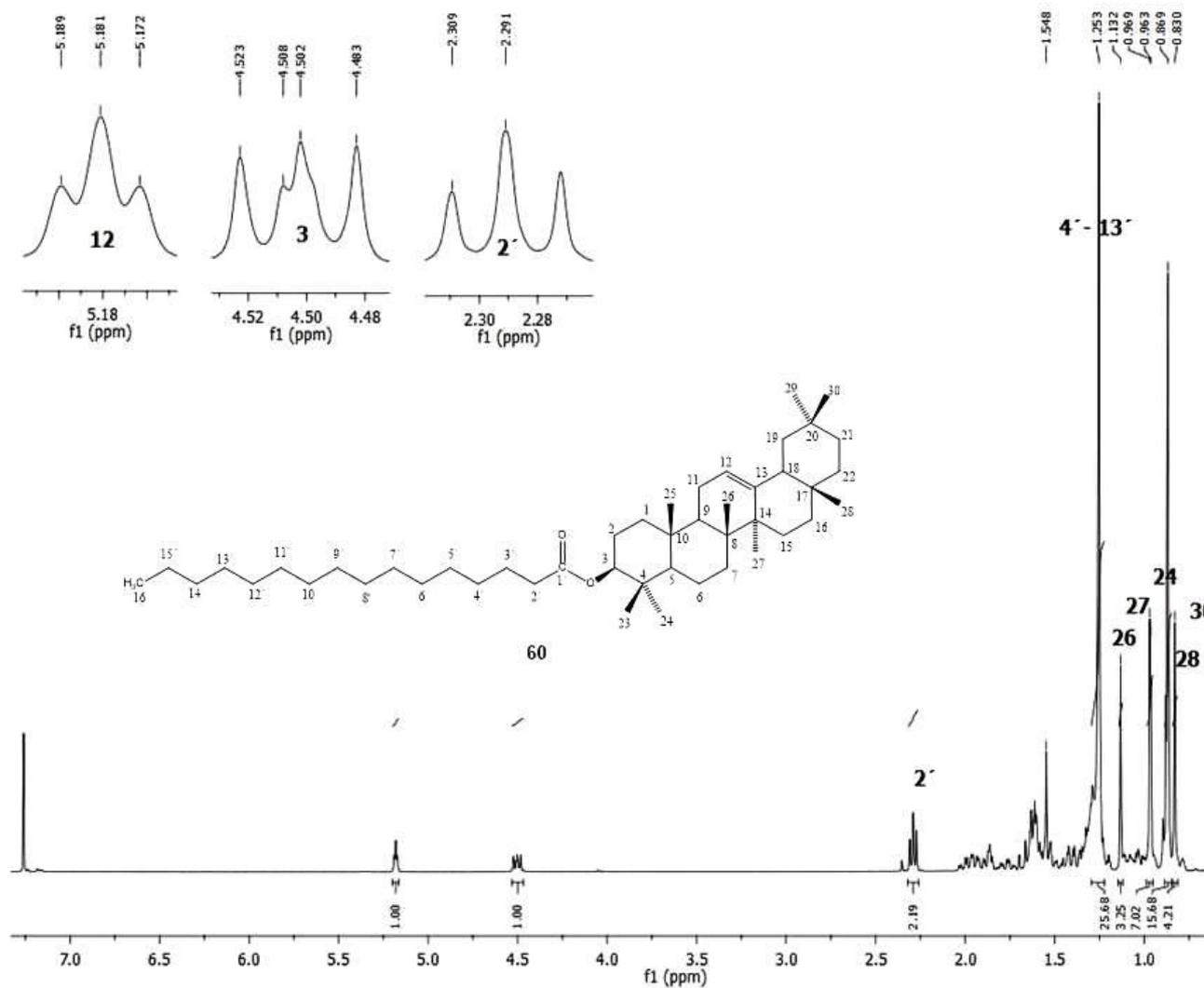
Espectros



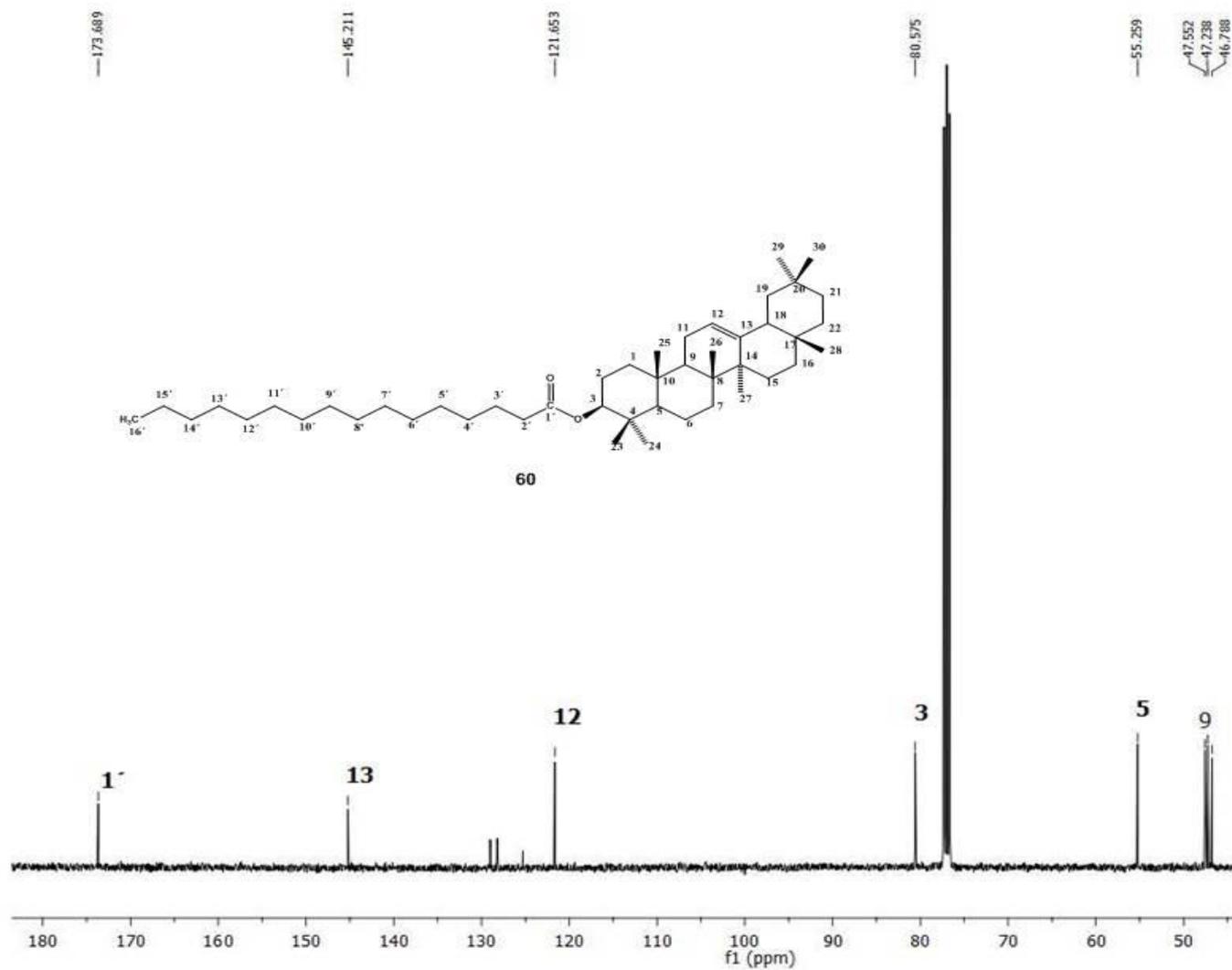
Espectro 1. IR (CHCl₃) de 60



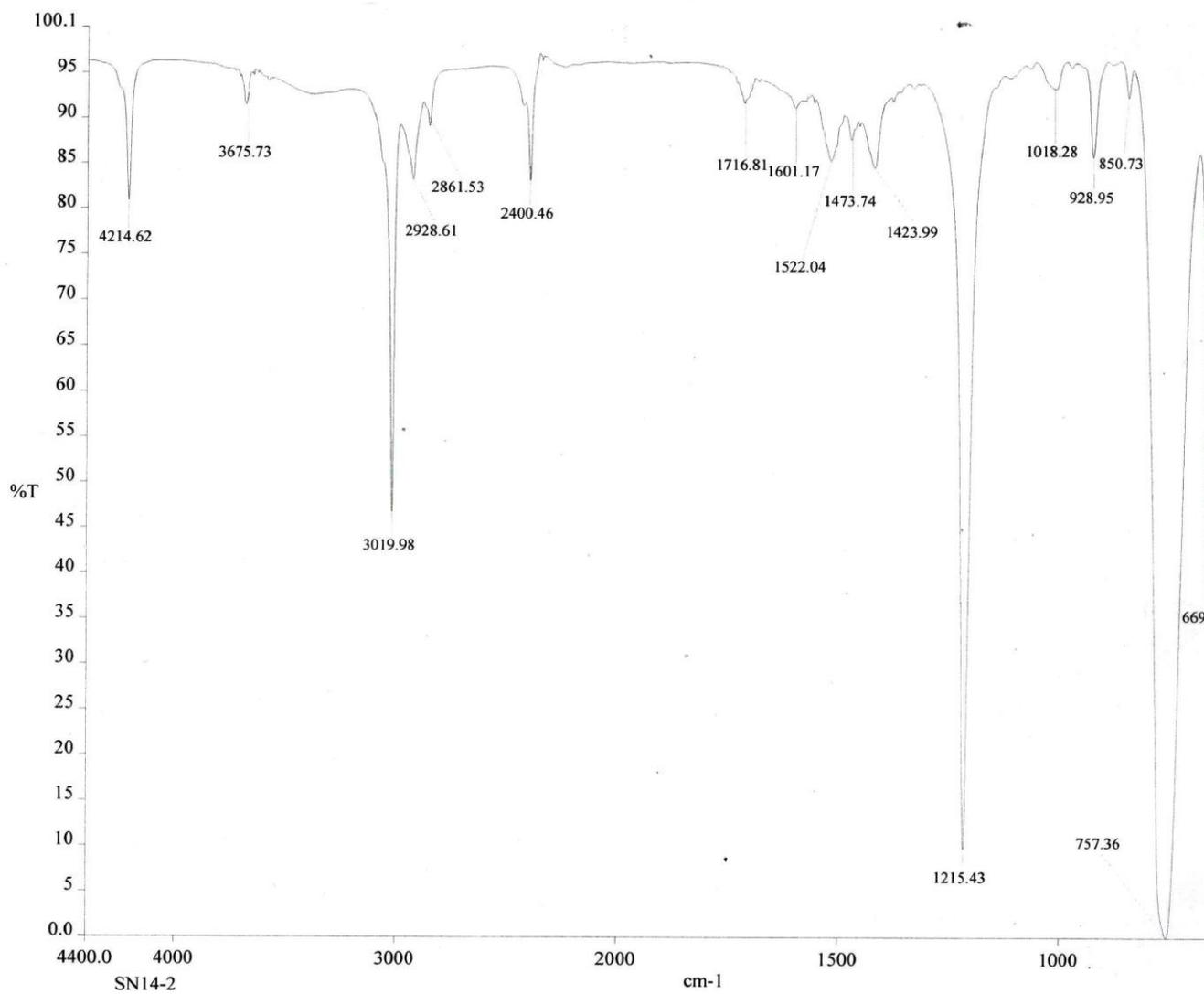
Espectro 2. EM-IE de 60



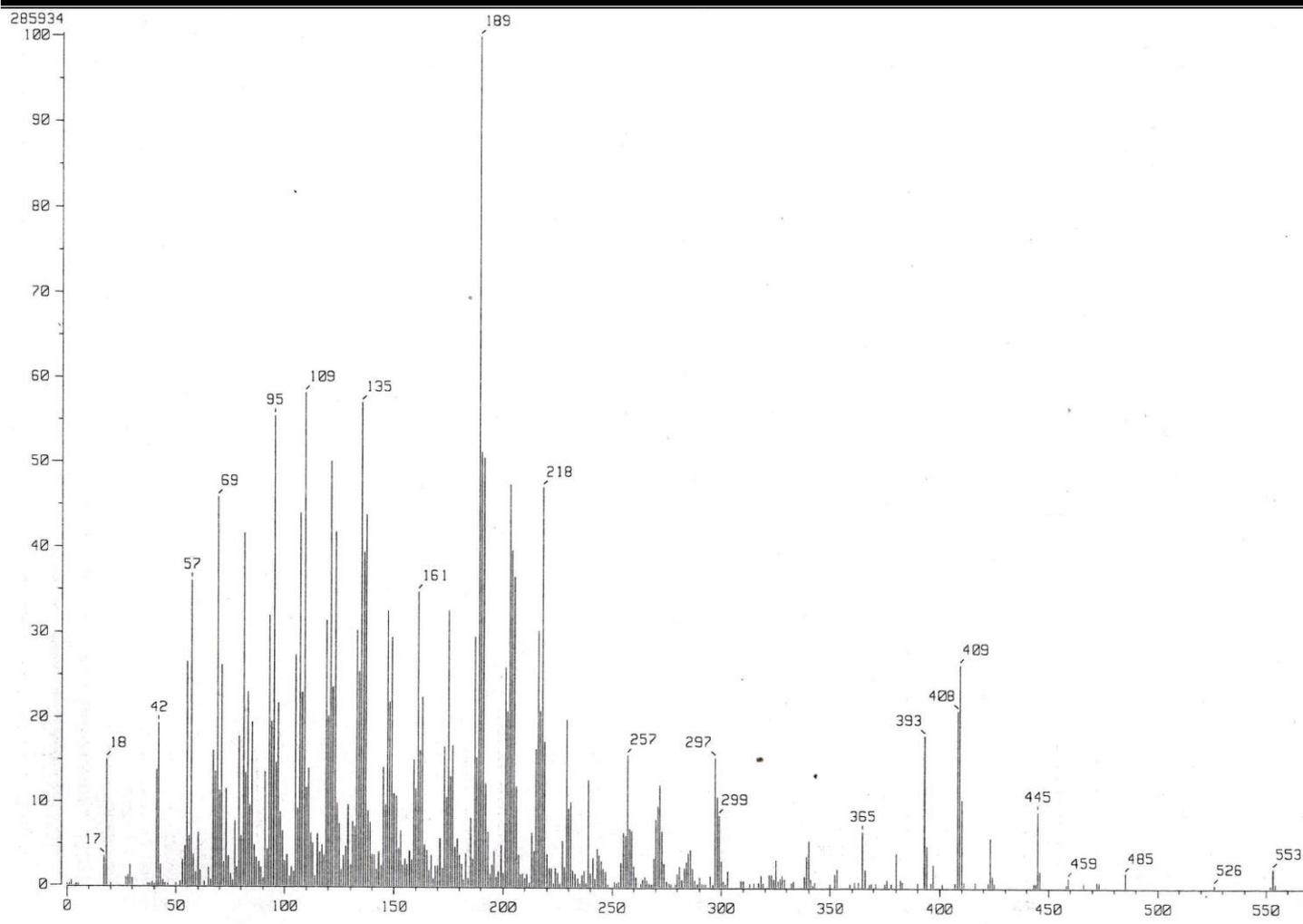
Espectro 3. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 60



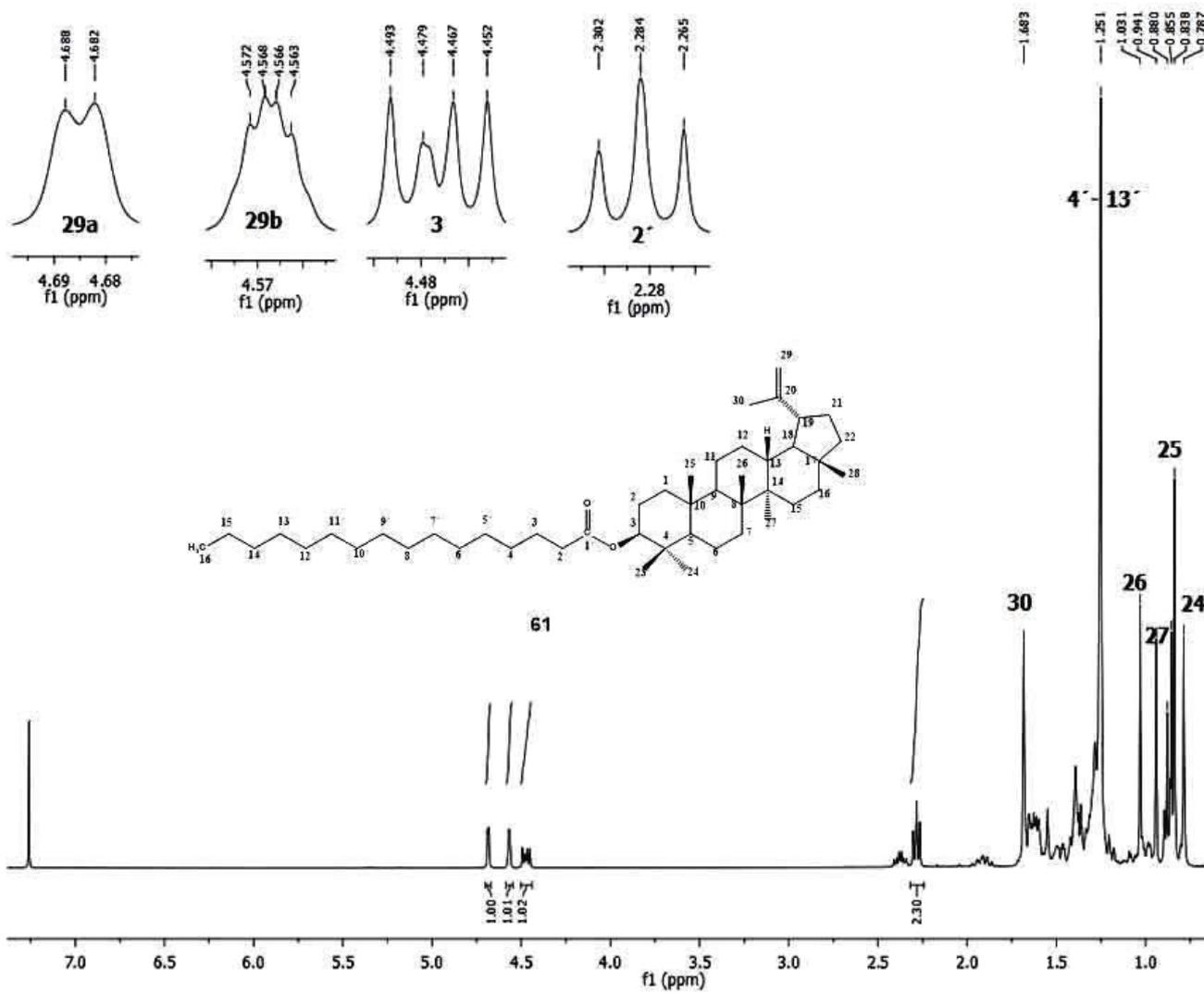
Espectro 4. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 60



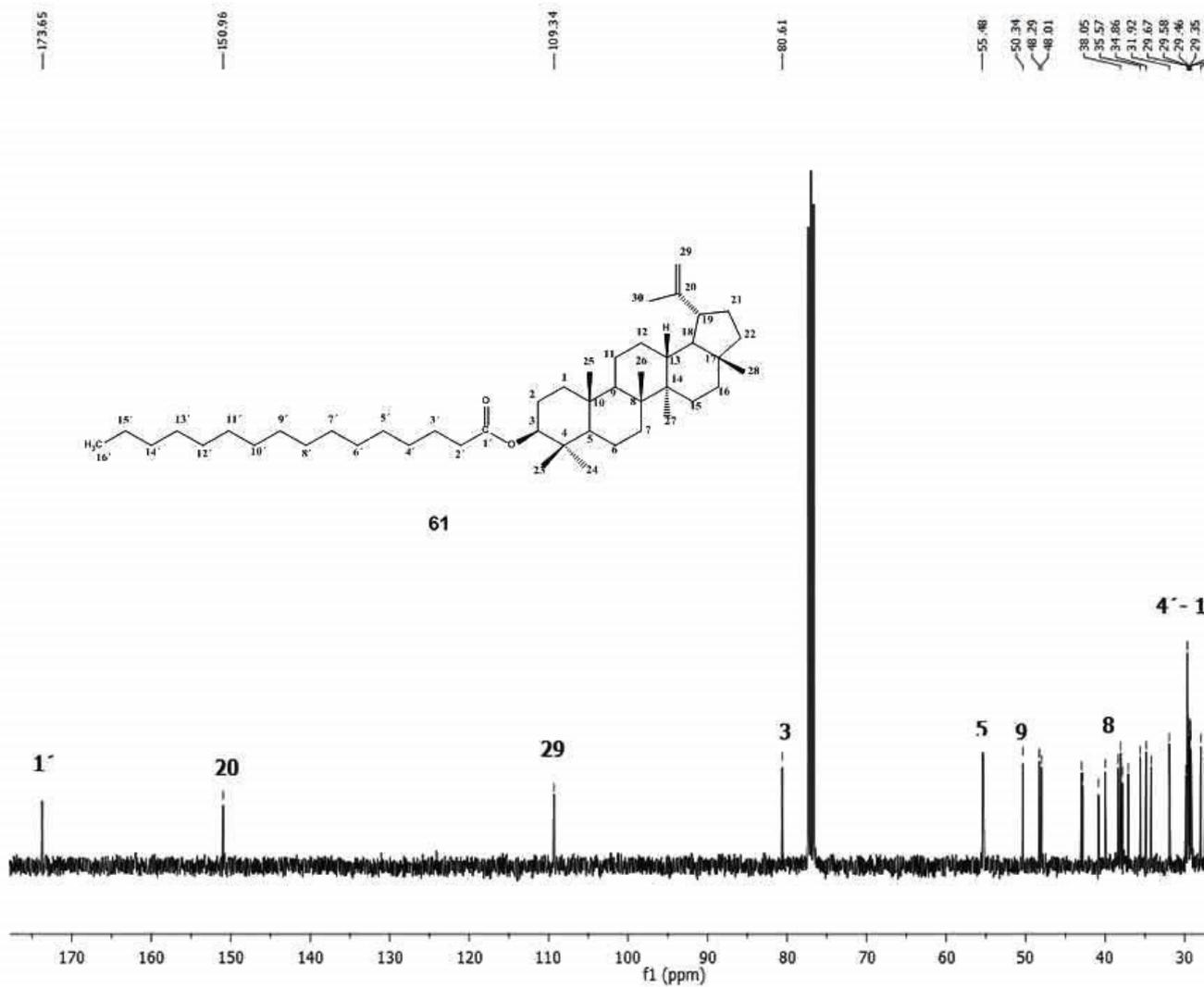
Espectro 5. IR (CHCl₃) de 61



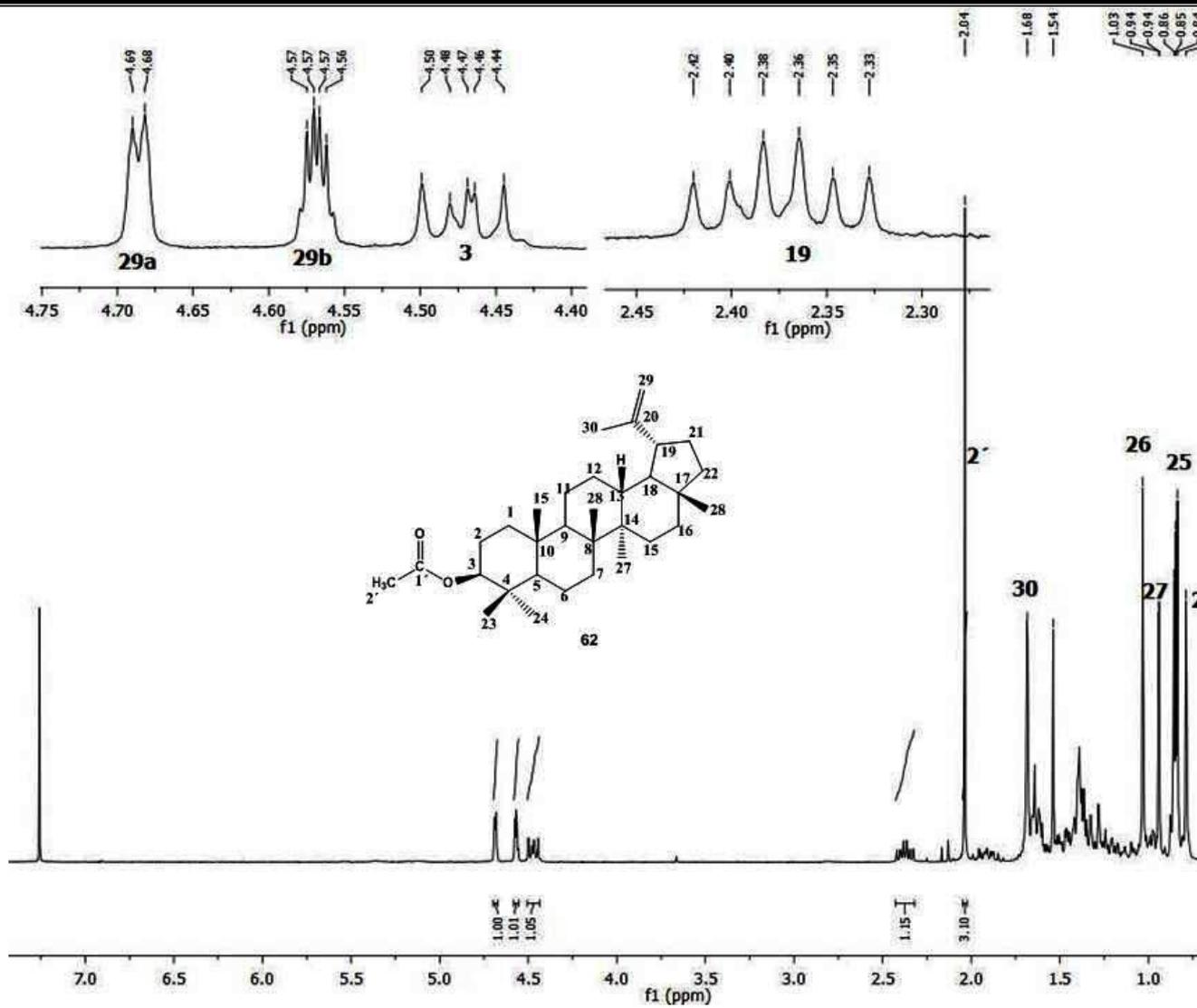
Espectro 6. EM-IE de 61



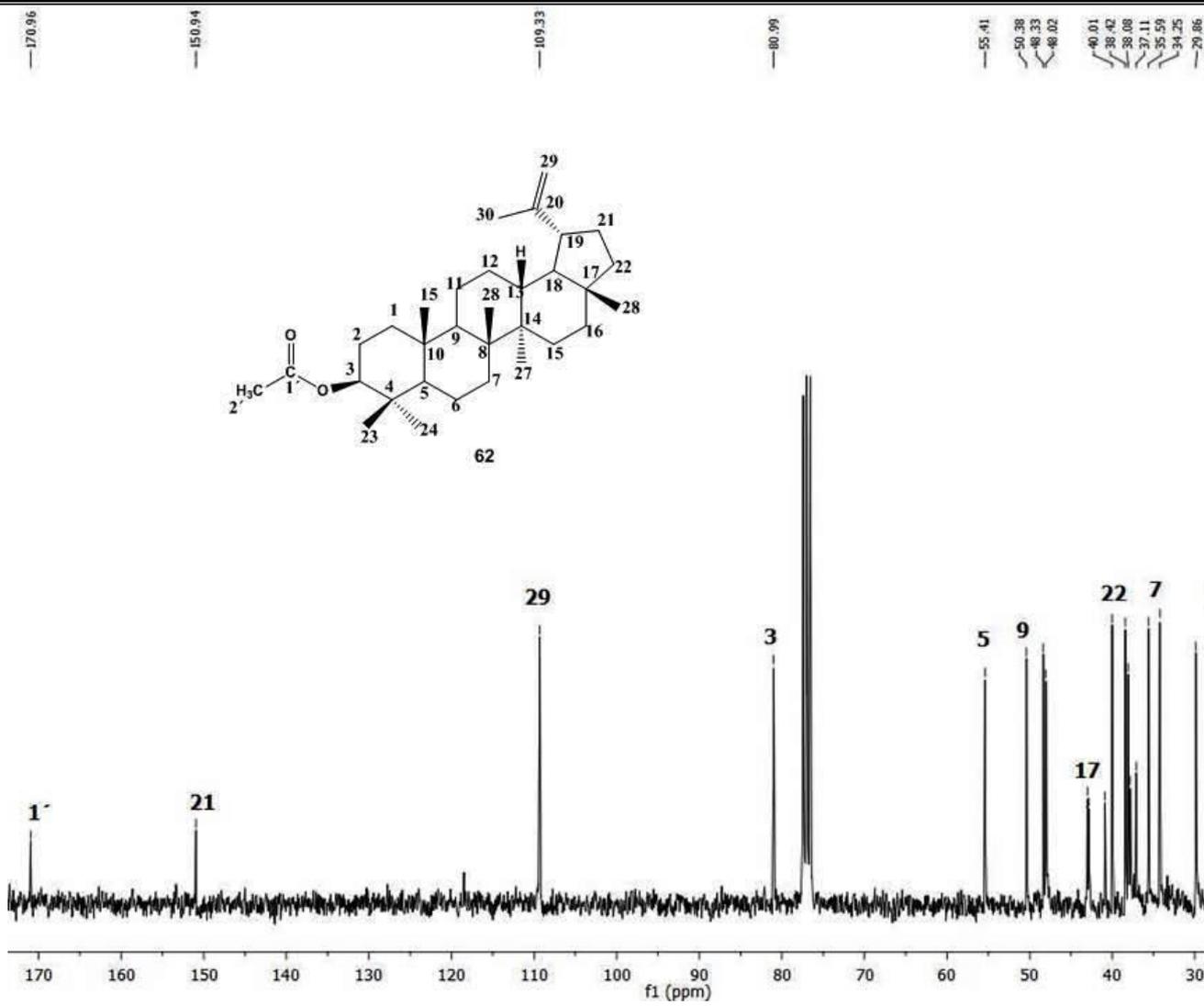
Espectro 7. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 61



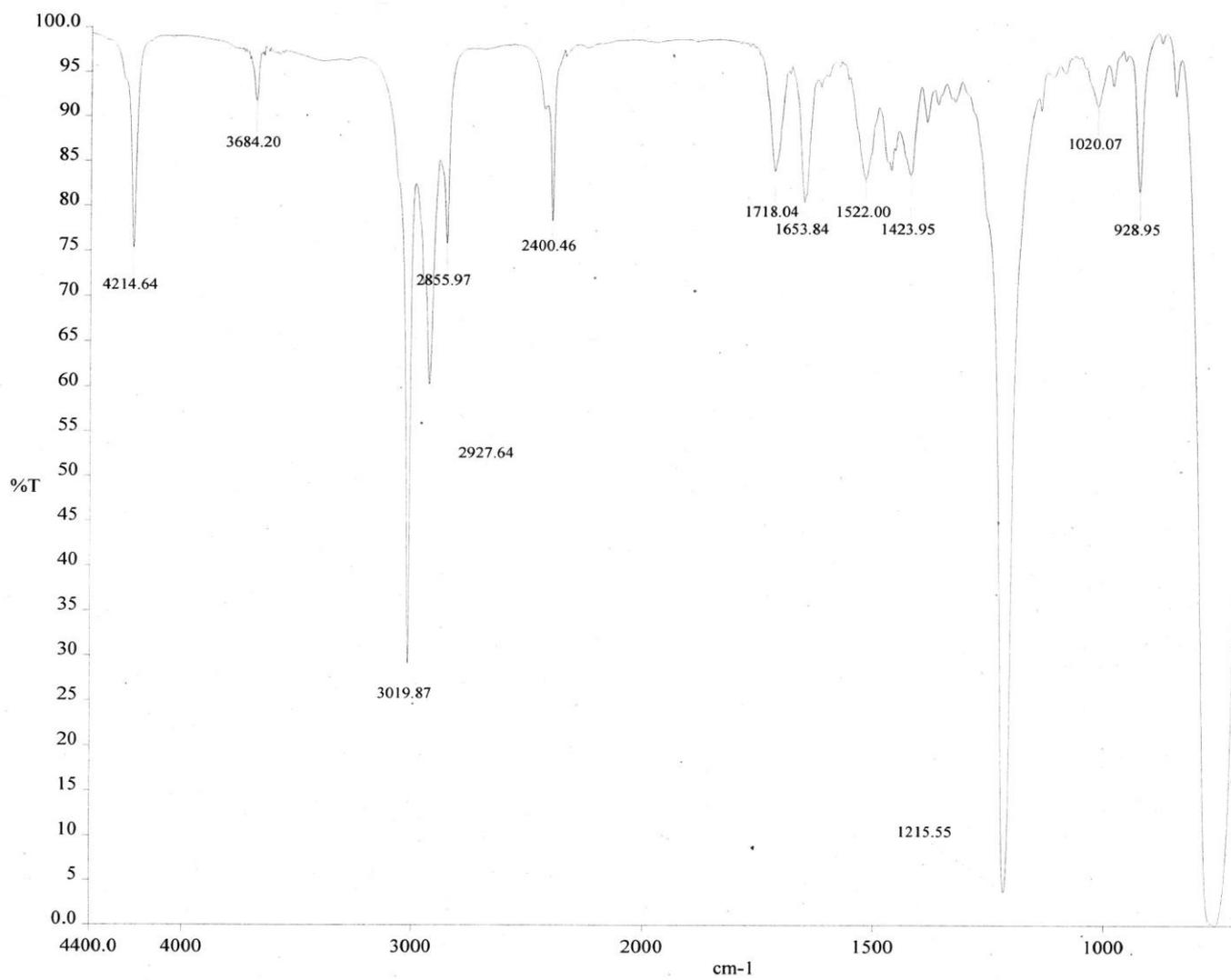
Espectro 8. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **61**



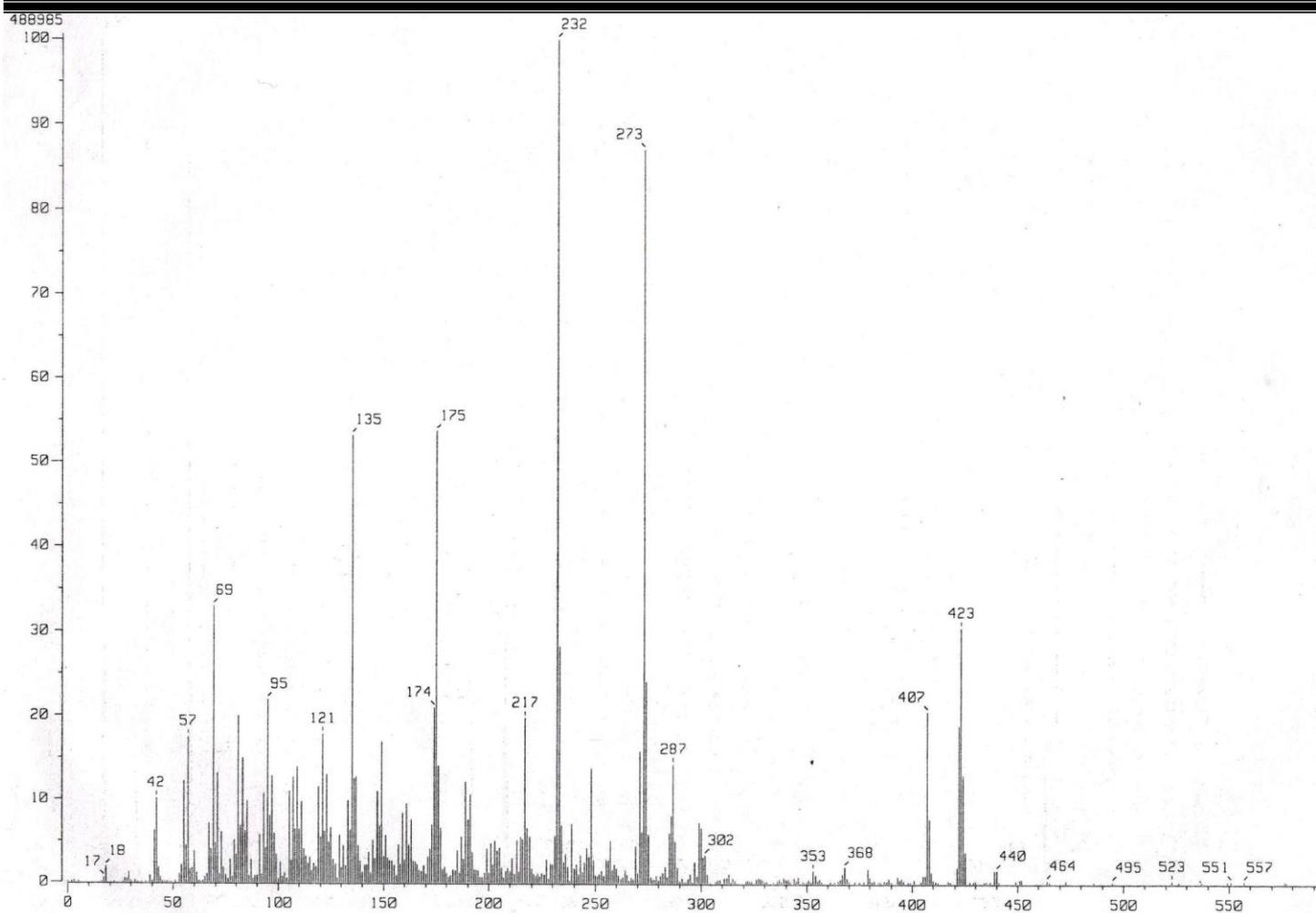
Espectro 9. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **62**



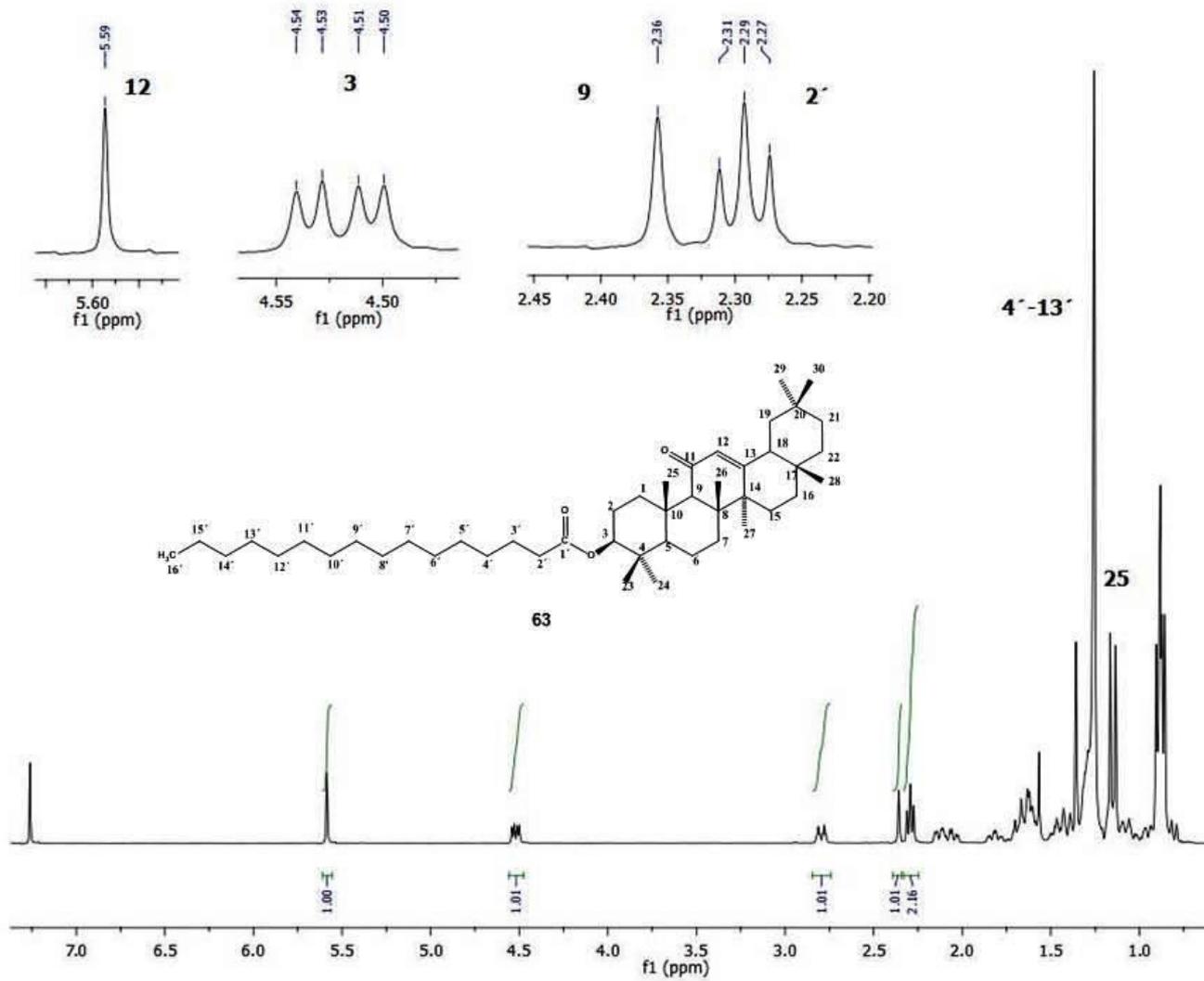
Espectro 10. RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) de 62



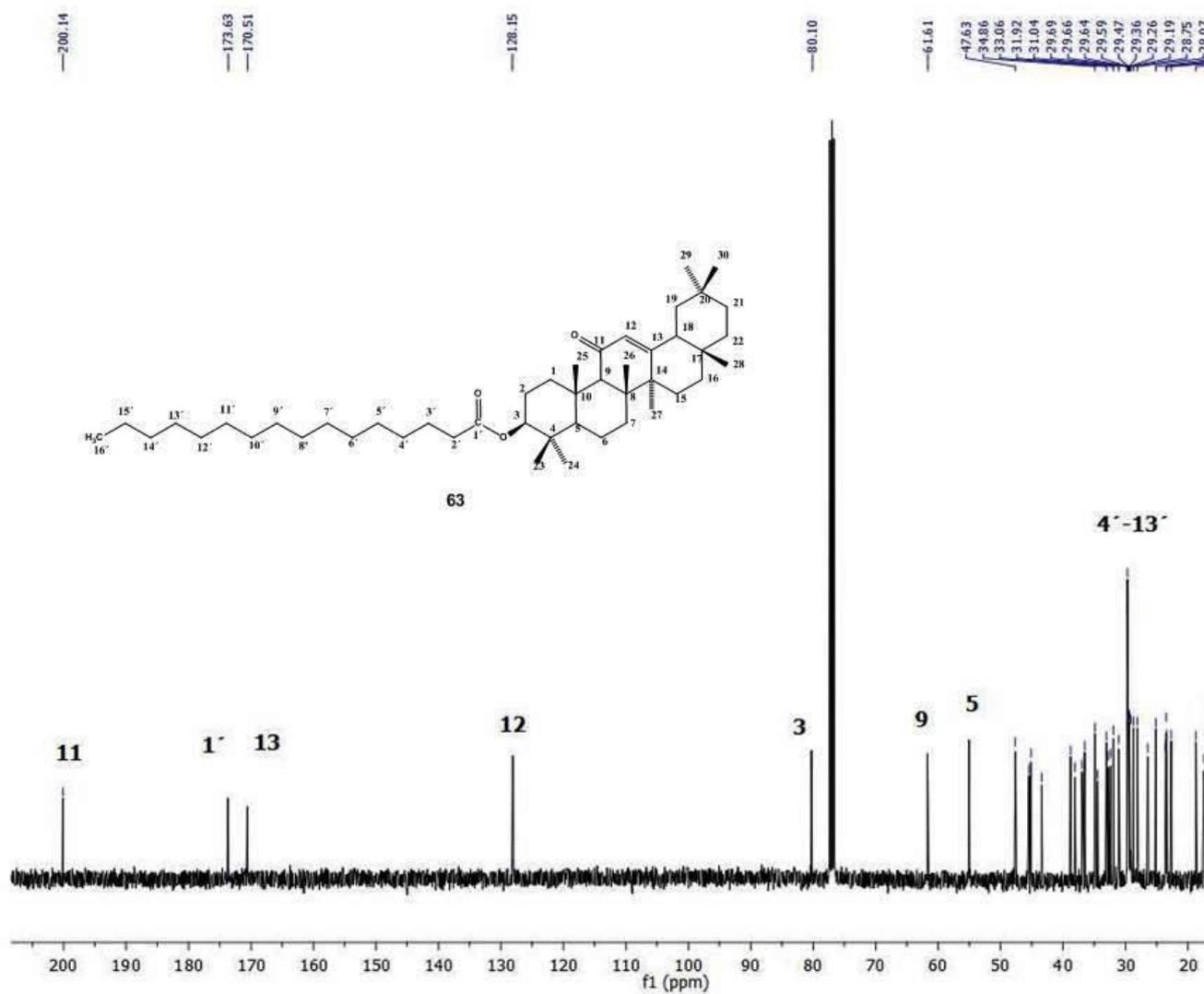
Espectro 11. IR (CHCl₃) de 63



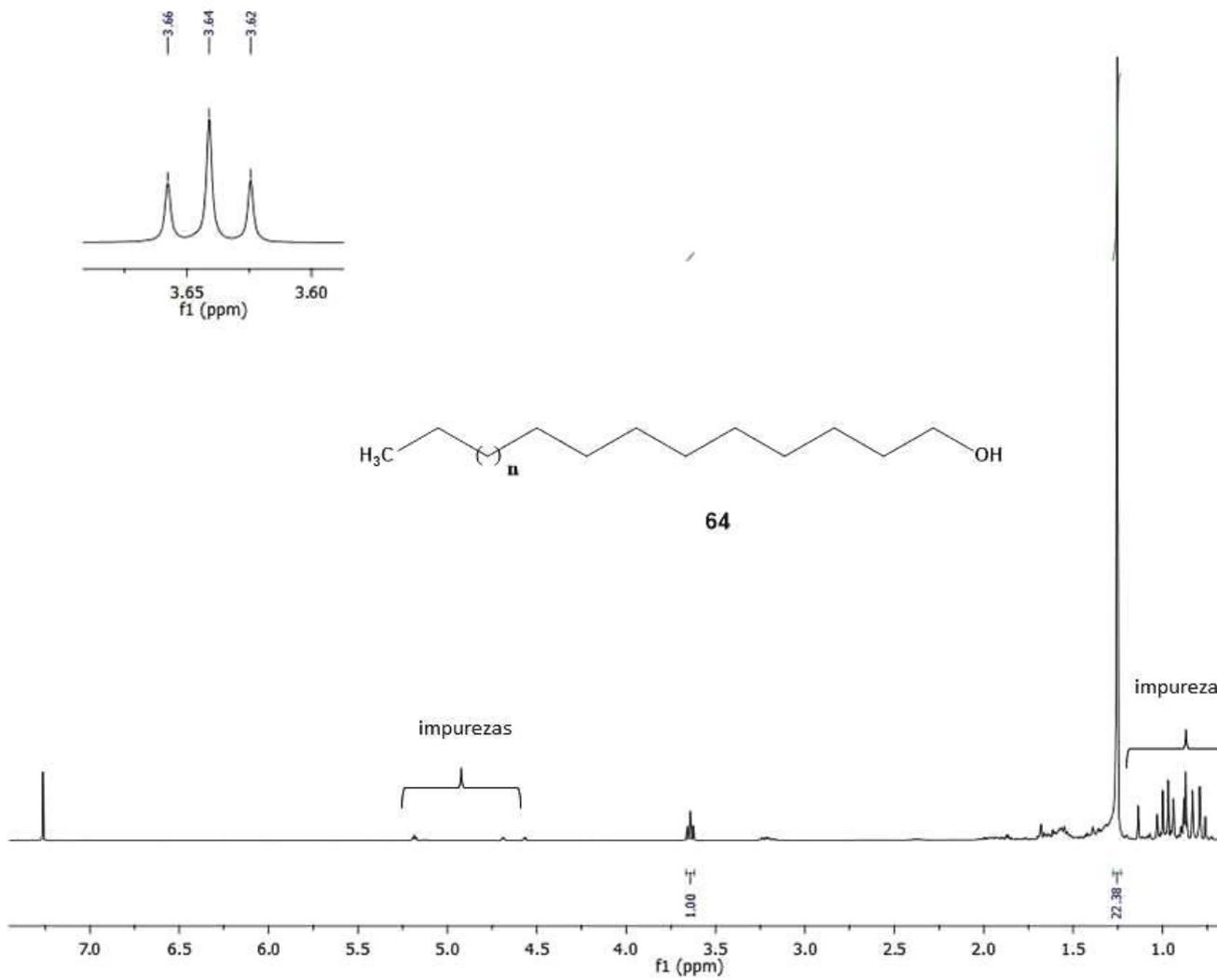
Espectro 12. EM-IE de 63



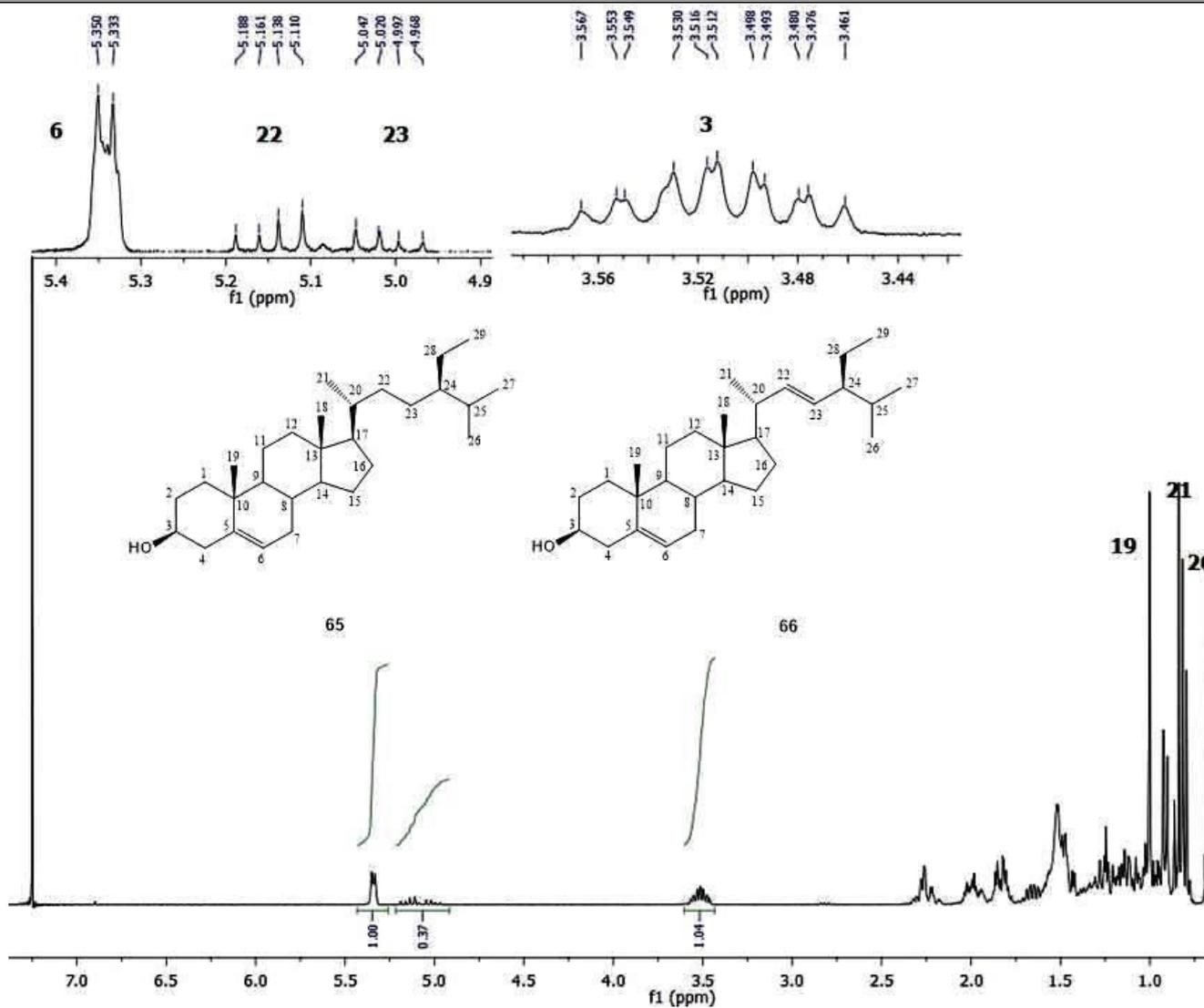
Espectro 13. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **63**



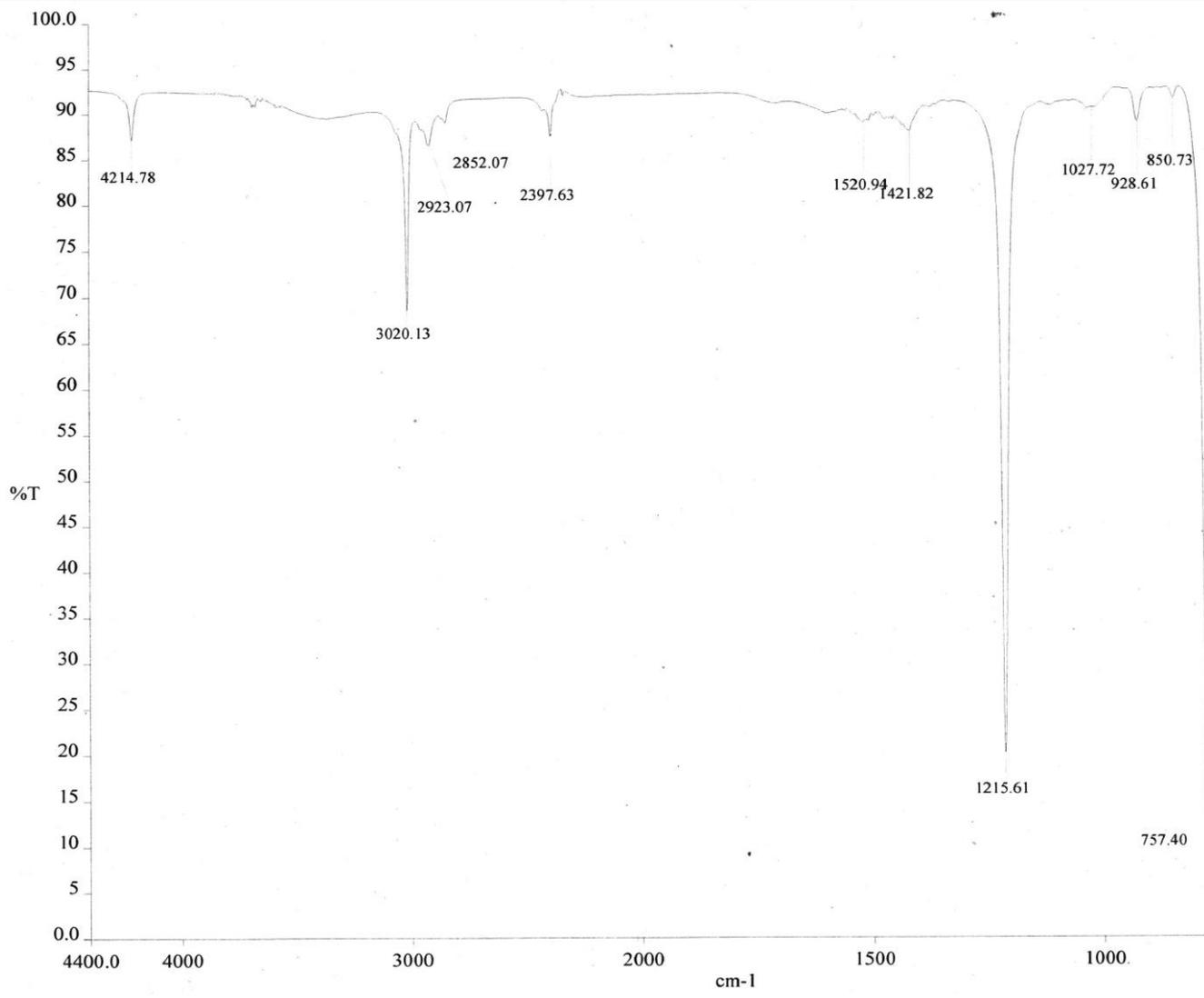
Espectro 14. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **63**



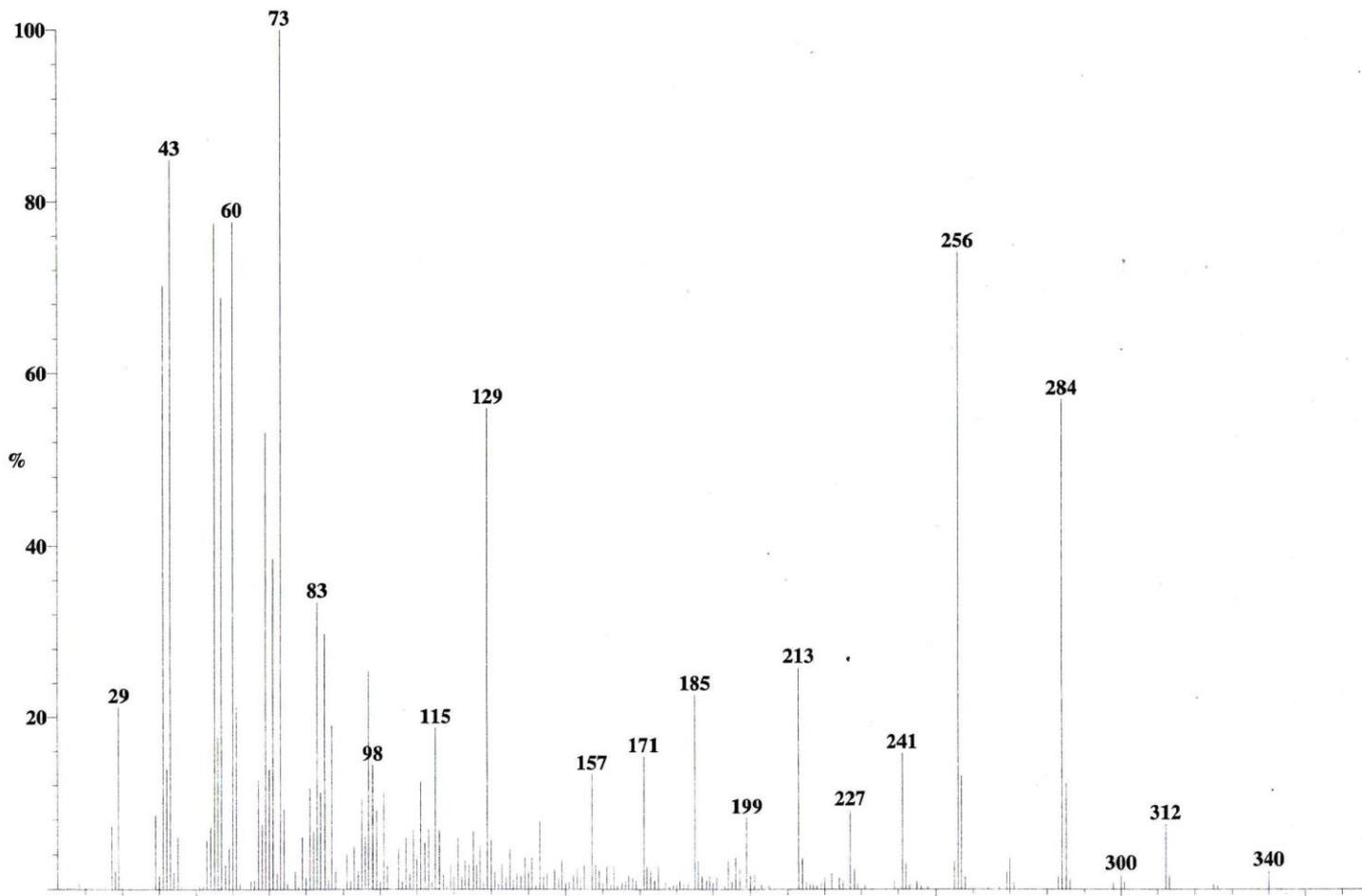
Espectro 15. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **64**



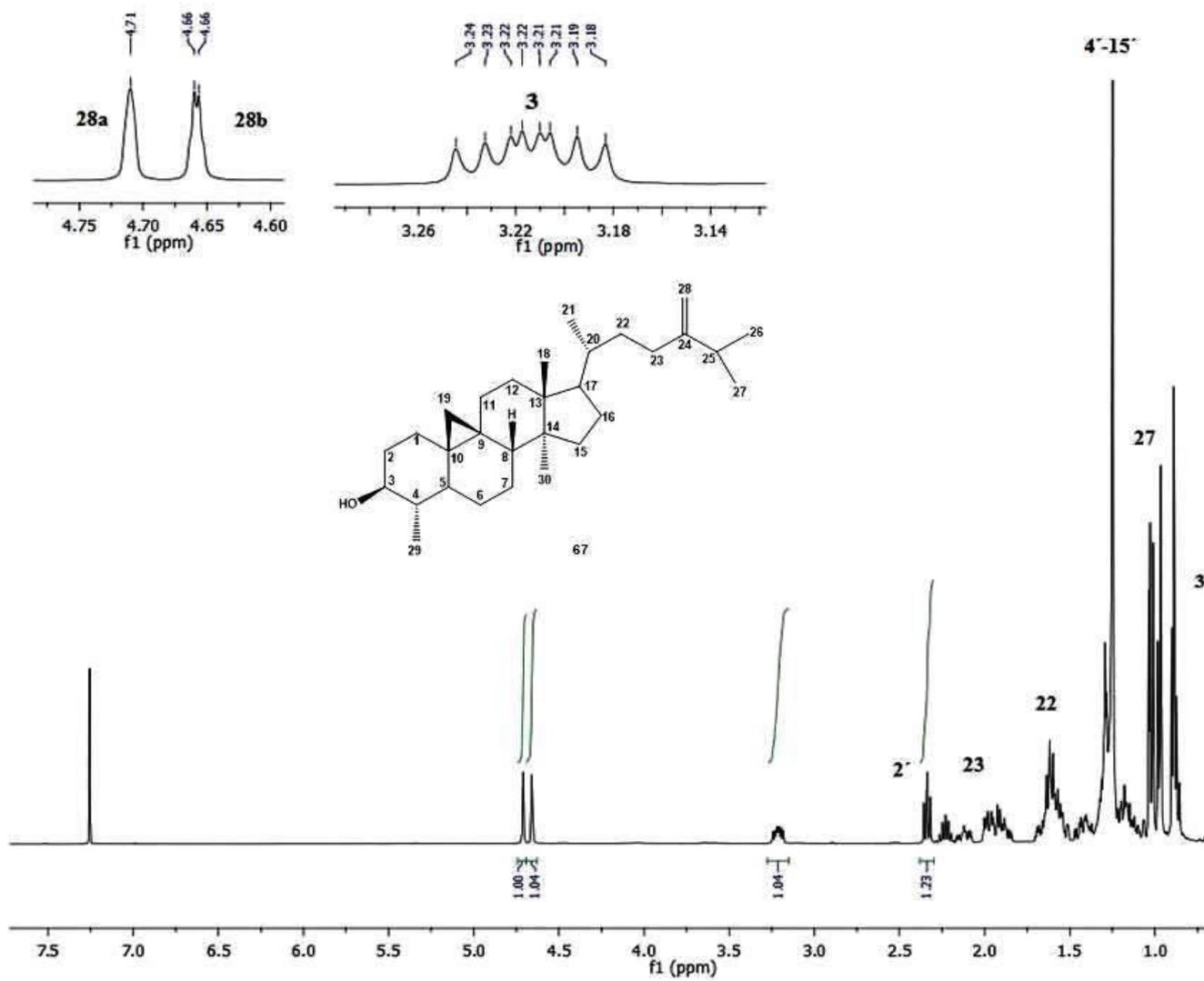
Espectro 16. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **65** y **66**



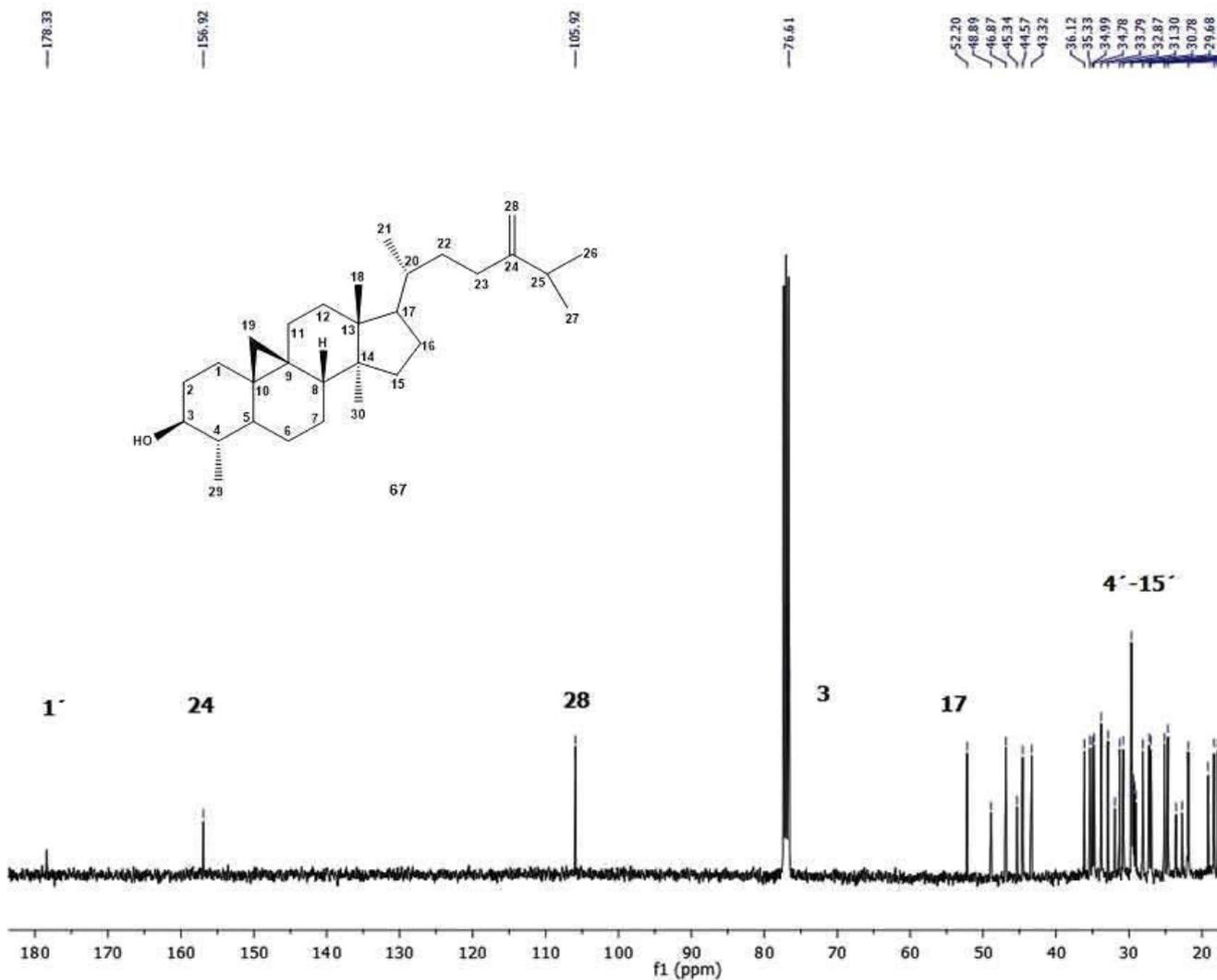
Espectro 17. IR (CHCl₃) de 67



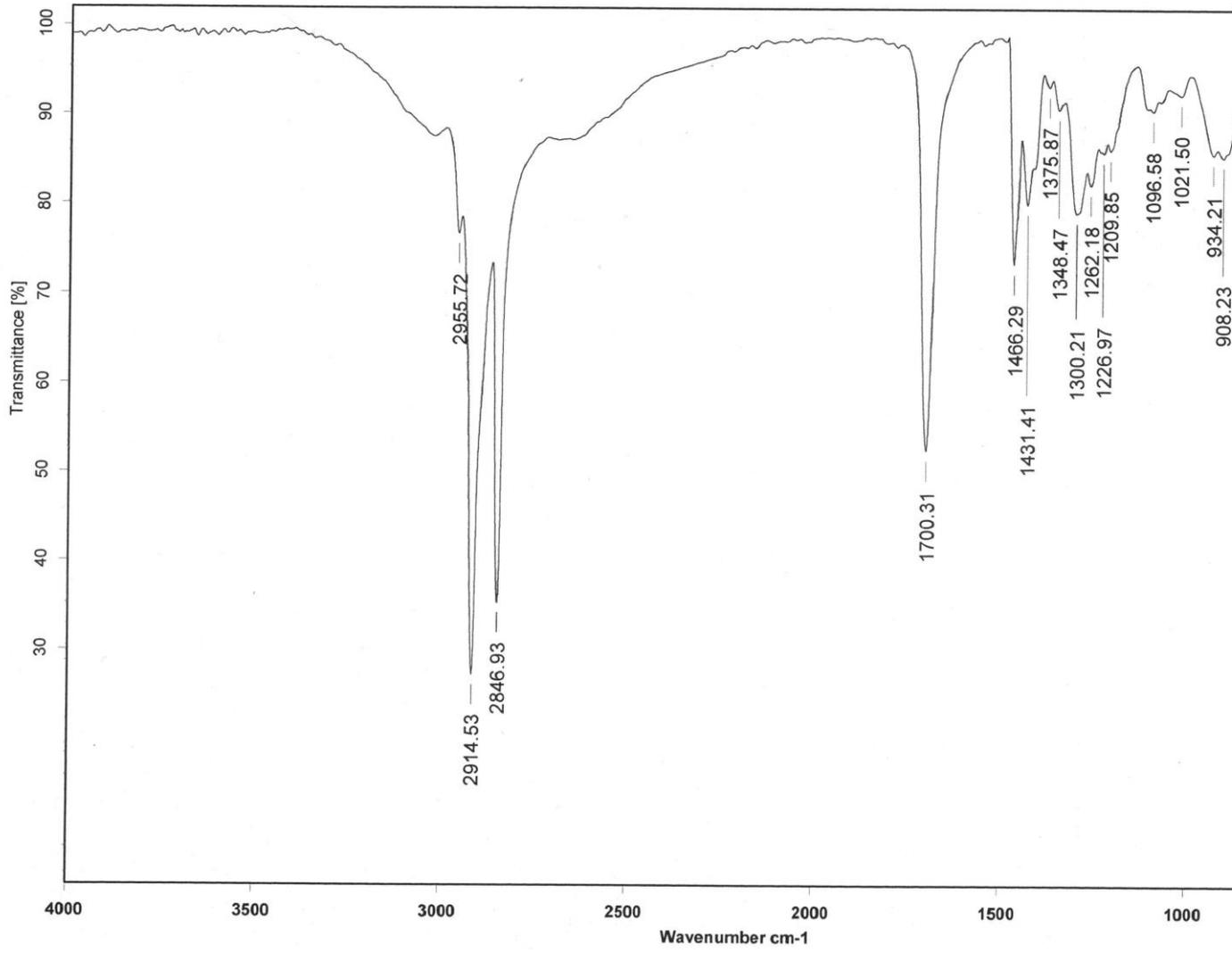
Espectro 18. EM-IE de 67



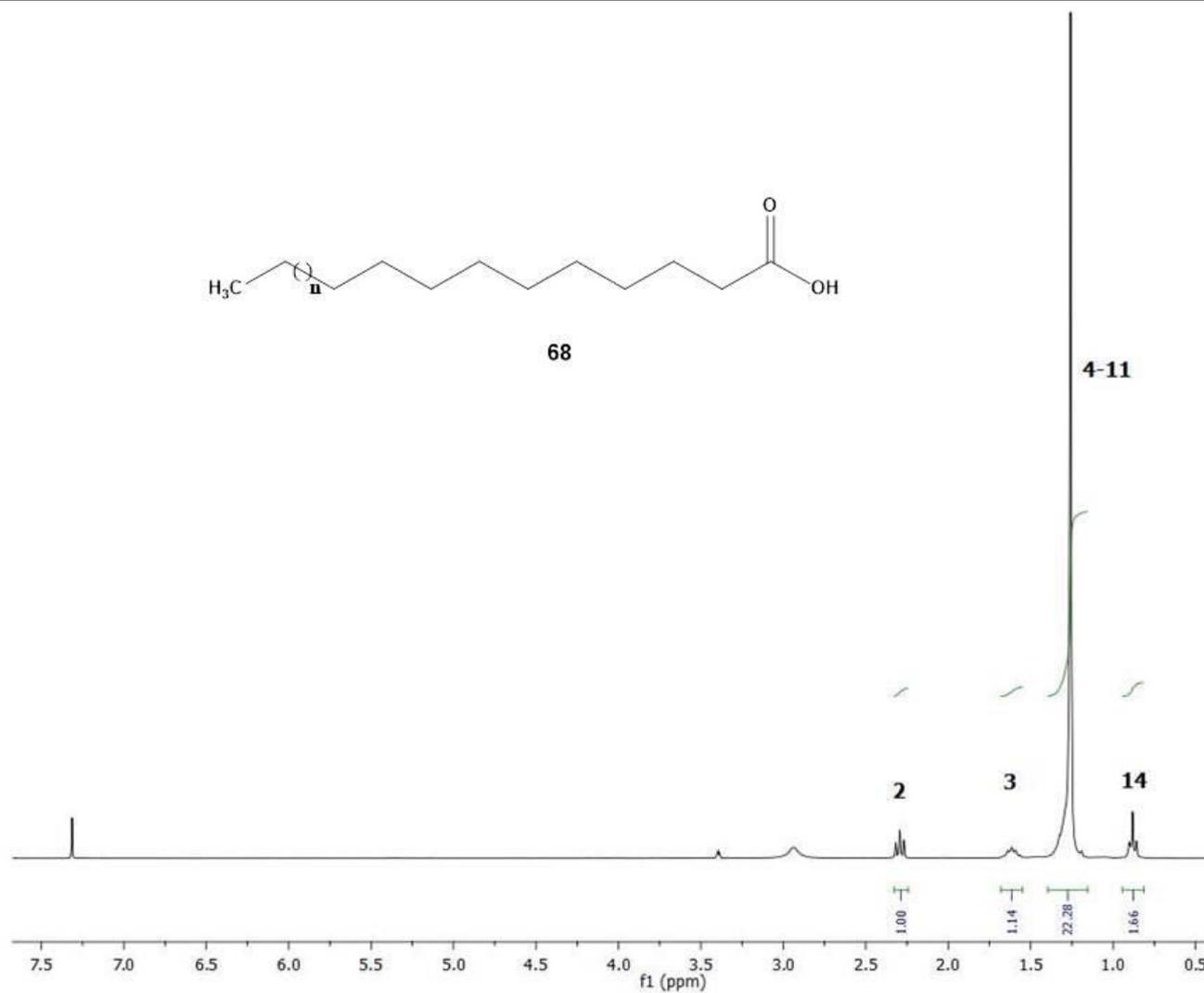
Espectro 19. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 67



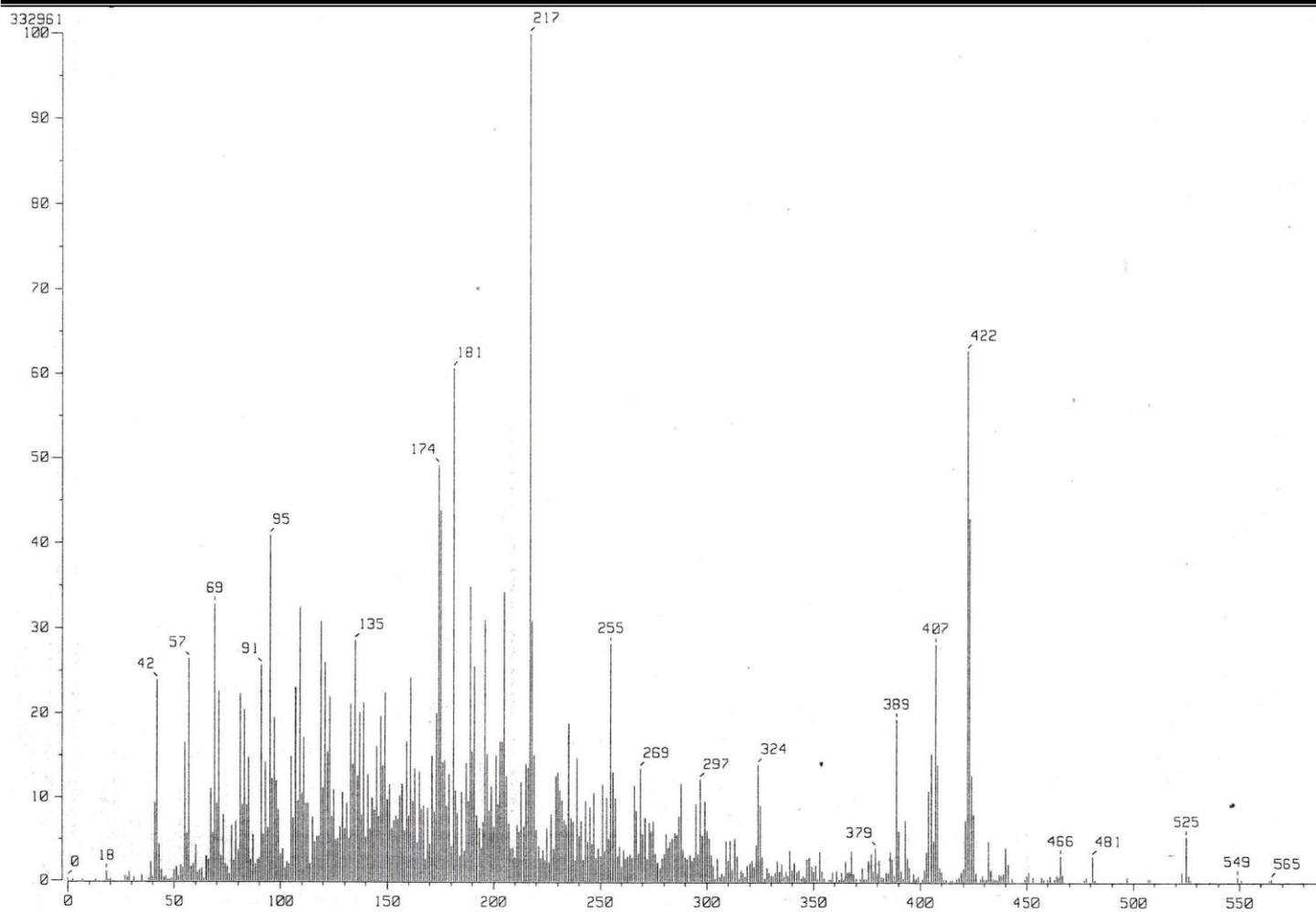
Espectro 20. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 67



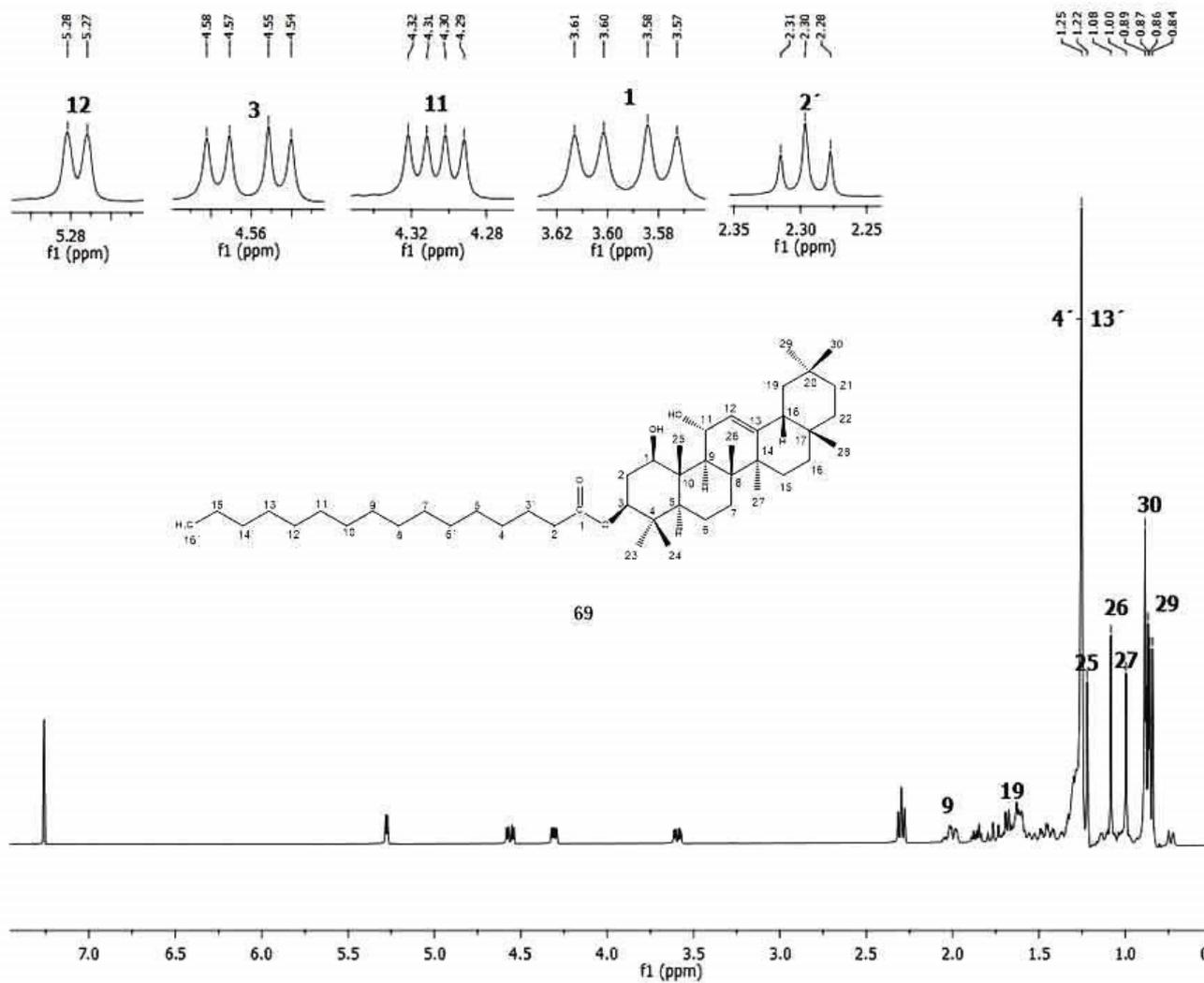
Espectro 21. IR (KBr) de 68



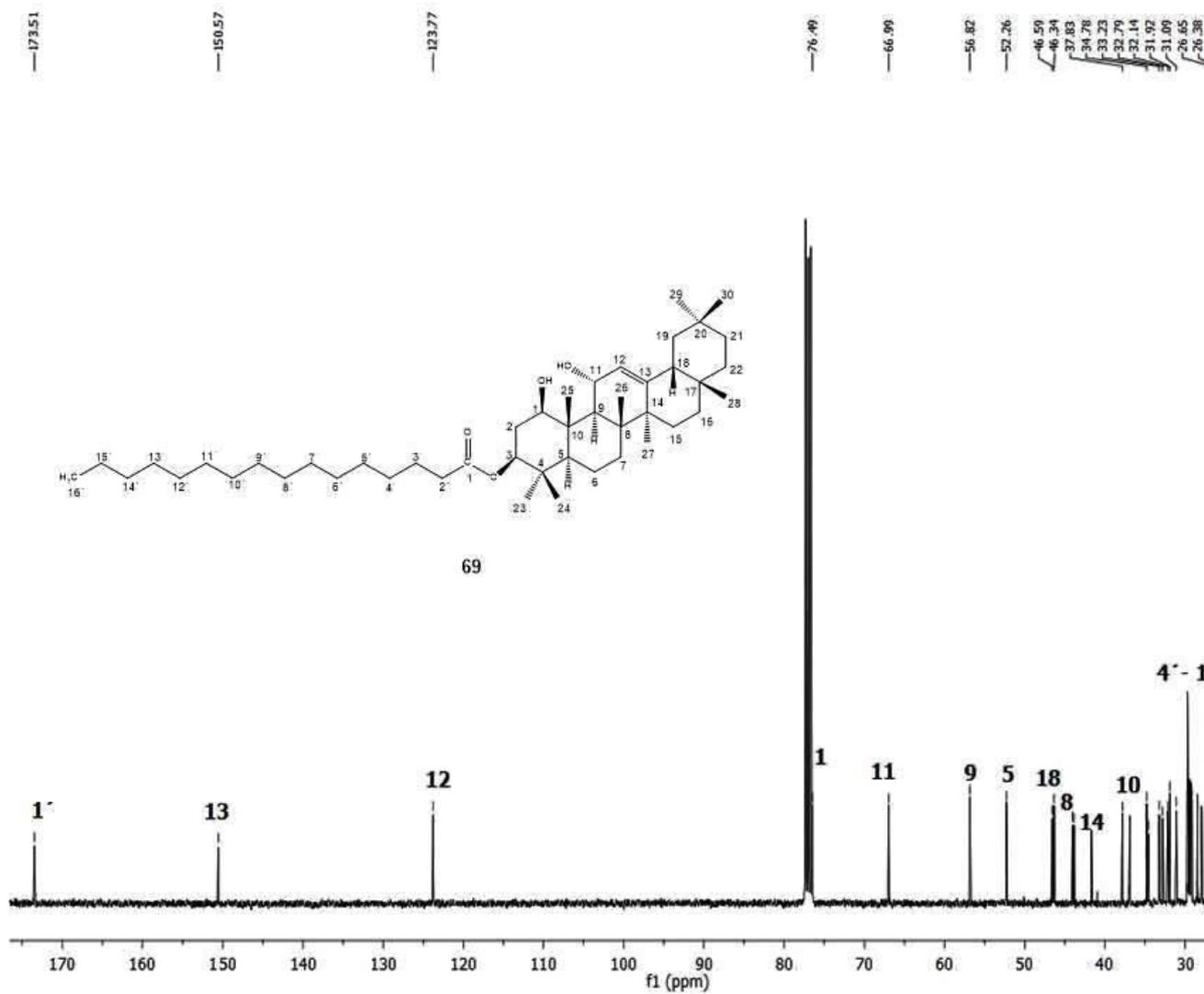
Espectro 22. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de **68**



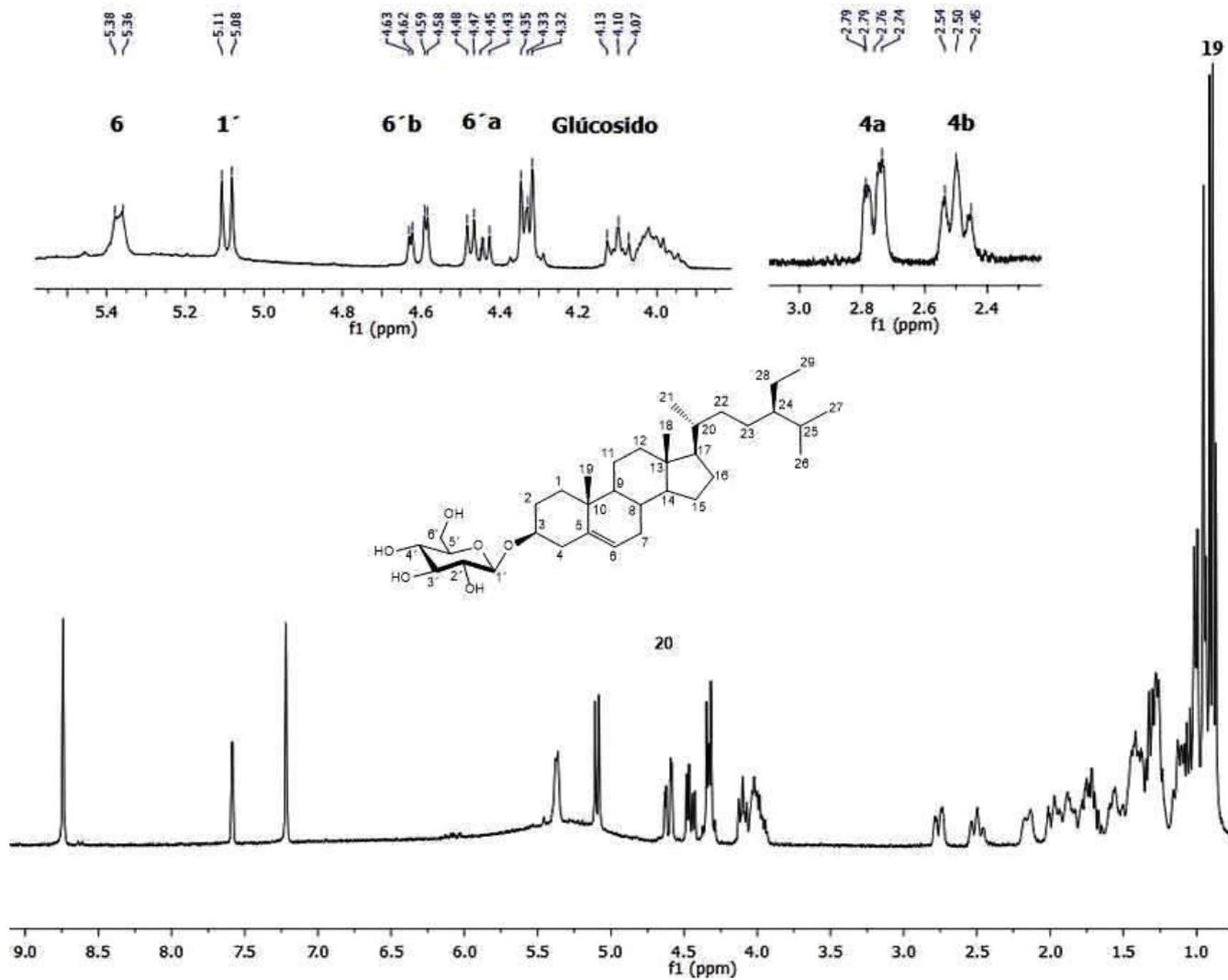
Espectro 23. EM-IE de 69



Espectro 24. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 69



Espectro 25. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **69**



Espectro 26. RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **20**