

FES Z

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

**Determinación de las actividades
antiinflamatoria y citotóxica de extractos
orgánicos de *Stenocereus pruinosus* (Otto)
Buxbaum**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:
ALEJANDRA GIOVANA GAMA RIOS

DIRECTOR: Dr. Mariano Martínez Vázquez

ASESORA: Dra. Hortensia Rosas Acevedo

MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A las profesoras Bárbara Susana Luna Rosales y María de Jesús Sánchez Colín por su valioso tiempo y consejos que me han dedicado para la mejora de ésta tesis.

Al Dr. Mariano Martínez, le agradezco haberme permitido integrarme a su laboratorio, durante este tiempo he aprendido mucho gracias a sus conocimientos, los cuales me han permitido poder concluir esta tesis, así como su valioso apoyo y tiempo.

A la Doctora Hortensia Rosas: Muchas gracias por apoyarme, por ser más que mi asesora. En usted veo a una gran amiga y persona, gracias por compartir sus conocimientos conmigo, así como sus experiencias, usted ha marcado mi vida y definitivamente ha sido un ejemplo a seguir en mi vida profesional. Soy muy afortunada de encontrar gente como usted, gracias.

A la Doctora Catalina: Gracias por siempre apoyarme, por su confianza, por escucharme y aconsejarme en todo momento. Sus conocimientos, su paciencia, perseverancia y constancia generan en mí una gran admiración hacia usted. Es una persona a la cual estimo mucho y doy gracias por haberla conocido, gracias por siempre apoyarme.

A Antonio Nieto y Teresa Ramírez Apan por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas y a los técnicos de RMN, EM, IR y Rayos X.

DEDICATORIAS

Dedico con mucho amor esta tesis a toda mi familia, gracias por estar siempre a mi lado. Lo quiero mucho.

Alfonso y Alejandra, mis padres: gracias por amarme tanto y por haberme educado. Estoy infinitamente agradecida con Dios y la vida de poder tenerlos a mi lado, realmente he sido bendecida con ustedes como padres, gracias a sus esfuerzos, sacrificios, a su apoyo en todo momento y cariño hoy he podido concluir esta etapa de mi vida. Estoy muy contenta y orgullosa de poder ser su hija. Los amo y son lo más importante para mí en este Mundo.

Anaid y Jazmín. Porque con ustedes he pasado los mejores momentos de mi vida, recibiendo siempre todo su amor y apoyo en cada cosa que me propongo, así como también hacerme ver la vida más feliz y sencilla a su lado. Las amo hermanitas.

A mis Tíos: que desde pequeña han estado siempre a mi lado, en los momentos mas felices pero también en los mas tristes, gracias por tratarme como una hija, expresándome su cariño en todo momento y apoyándome para poder alcanzar mis metas. Soy realmente feliz al poder tenernos a mi lado y poder decir que soy su sobrina.

A mis primos: son una parte muy importante en mi vida y estoy muy contenta de poder considerarlos como hermanos, por todo lo que hemos vivido juntos y estar siempre a mi lado.

A mis abuelos: Ustedes han sido personas muy importantes que han dejado marcada mi vida para siempre, sus experiencias han influido decisivamente en mi vida. Se que tengo dos ángeles que desde el cielo me cuidan: Raquel y Ángela, y les doy las gracias por quererme tanto y haberme apoyado en su momento.

A mis amigos, gracias por su amistad, su confianza y su cariño, con ustedes he tenido momentos inolvidables los cuales siempre estarán presentes en mi corazón y se que tengo amigos para toda la vida

Gracias a todas aquellas personas que han estado en algún momento de mi vida cerca de mi, y me han apoyado.

ÍNDICE

1. RESUMÉN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. MARCO TEÓRICO	13
4.1. FAMILIA CACTACEAE	13
4.2. GÉNERO <i>Stenocereus</i>	14
4.3 CLASIFICACIONES ANTERIORES DE <i>S. pruinosus</i>	15
4.4. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	15
4.5. METABOLITOS SECUNDARIOS	17
4.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS CACTÁCEAS	18
4.7. TRITERPENOS	19
4.8. ESTEROLES	20
4.9. ALCALOIDES	20
4.10. TRITERPENOS EN EL GÉNERO <i>Stenocereus</i>	21
4.11. TERPENOS CON POSIBLE ACCIÓN TERAPÉUTICA	22
4.12. CÁNCER	24
4.13. INFLAMACIÓN	28
4.14. RÉLACION CÁNCER INFLAMACIÓN	30
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	32
7. MÉTODO	34
7.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO	34
7.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA	36
7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.	40
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES	62
10. REFERENCIAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según el sexo en México en el año 2006	12
FIGURA 2. <i>Stenocereus pruinosus</i> .	15
FIGURA 3. <i>Stenocereus pruinosus</i>	15
FIGURA 4. Mapa de la distribución geográfica de <i>Stenocereus pruinosus</i>	16
FIGURA 5. Ejemplos de algunos metabolitos secundarios	18
FIGURA 6. Estructura de un triterpeno	19
FIGURA 7. Esqueleto de un esteroide	20
FIGURA 8. Algunos factores extrínsecos e intrínsecos que influyen en la división celular	24
FIGURA 9. Modelo clásico del desarrollo tumoral	26
FIGURA 10. Parte aérea de <i>Stenocereus pruinosus</i> .	35
FIGURA 11. Estructura química de Hederagenina	52
FIGURA 12. Estructura química de 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol	53
FIGURA 13. Estructura del tipo 5 α -colestano	47
FIGURA 14. Estructura parcial propuesta	47
FIGURA 15. Primera fragmentación propuesta para el compuesto 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol	49
FIGURA 16. Posible fragmentación del carbono 16-17 y el residuo del carbono 20 del compuesto aislado	50
FIGURA 17. Última fragmentación propuesta del compuesto, obteniendo el ion molecular de 112 (m/z) y 232 (m/z)	50
FIGURA 18. Estructura química del Peniocerol	54
FIGURA 19. Estructura química del Ácido oleanólico	55

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Especies del género <i>Stenocereus</i>	14
CUADRO 2. Triterpenos aislados del género <i>Stenocereus</i>	21
CUADRO 3. Elementos que intervienen en la reacción inflamatoria	28
CUADRO 4. Inflamaciones asociadas a neoplasias	31
CUADRO 5. Características de las líneas celulares	38
CUADRO 6. Fraccionamiento del extracto de raíz de CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH (1:1) por cromatografía en columna	44
CUADRO 7. Fraccionamiento del extracto de partes aéreas de CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH (1:1) por cromatografía en columna	44
CUADRO 8. Propiedades físicas de Hederagenina	52
CUADRO 9. Propiedades físicas de 3-hidroxi-hexanoato de 5 α - colest-8-en-3 β -ol	53
CUADRO 10. Formula parcial deducida a partir del espectro de DEPT	46
CUADRO 11. Desplazamientos químicos en C ¹³ para el compuesto (2)	48
CUADRO 12. Propiedades físicas de Peniocerol	54
CUADRO 13. Propiedades físicas del Ácido oleanólico	55
CUADRO 14. Rendimiento total de los extractos de <i>Stenocereus</i> <i>pruinus</i>	56
CUADRO 15. Rendimiento de los compuestos aislados y purificados de la raíz y partes aéreas de <i>S.pruinosus</i>	57
CUADRO 16. Actividad citotóxica del extracto diclorometano- metanol de raíz	57

CUADRO 17. Actividad citotóxica del extracto diclorometano- metanol de partes aéreas	58
CUADRO 18. Actividad citotóxica para los compuestos aislados del extracto de raíz y partes aéreas	59
CUADRO 19. Porcentaje de inhibición del edema inducido por TPA de los extractos orgánicos	60
CUADRO 20. Porcentaje de inhibición del edema por carragenina de los extractos orgánicos	60
CUADRO 21. Porcentaje de inhibición del edema por TPA de los compuestos químicos aislados	61

ABREVIATURAS

AA:	Ácido araquidónico
AcOEt	Acetato de etilo
CH₂Cl₂	Diclorometano
COX:	Ciclooxigenasa
CCF:	Cromatografía capa fina
DMSO:	Dimetilsulfoxido
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Etilen-diamin-treta acético
EM:	Espectrometría de masas
INEGI:	Instituto Nacional de Información Geográfica y Estadística
IR:	Espectrometría de Infrarrojo
LPMN:	Leucocitos polimorfonucleados
MeOH:	Metanol
PLA₂:	Fosfolipasa 2
RMN ¹³C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H:	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SFB:	Suero Fetal Bovino
SRB:	Sulforrodamina B
TCA:	Ácido tricloroacético
TPA:	13-acetato de 12-O-tetradecailforbol

1. RESUMEN

Stenocereus pruinosus es una cactácea comúnmente conocida como pitaya, la cual crece en zonas áridas y semiáridas de la parte central de México. Aunque el fruto comestible, de ésta especie, es lo más utilizado, también es utilizada como forraje y cercas vivas.

Estudios fitoquímicos previos han señalado la presencia de derivados del ácido oleanólico, pero hasta el momento no se conocen estudios acerca de su actividad biológica.

En la presente tesis se da a conocer los resultados de la composición química de la raíz y partes aéreas de *S. pruinosus*. De igual forma se informa de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos orgánicos y metabolitos secundarios provenientes de ésta especie.

La cromatografía del extracto de la raíz, obtenido con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, permitió el aislamiento de la hederagenina, el 3-hidroxi-hexanoato de 5α -colest-8-en- 3β -ol y el peniocerol. Mientras que del extracto de las partes aéreas solo se aisló el ácido oleanólico.

Éste es el primer informe acerca de la presencia de la hederagenina y el peniocerol en *S. pruinosus*. Mientras que el 3-hidroxi hexanoato de 5α -colest-8-en- 3β -ol es un nuevo producto en la literatura.

El extracto de raíz fue mostró una inhibición del 50 % de crecimiento celular para la línea de cáncer de mama, siendo la más susceptible a la presencia del extracto de todas las líneas evaluadas. Por otro lado, el extracto de las partes aéreas inhibió el crecimiento celular de las líneas de leucemia y mama con 55% y 53.63% de actividad.

Los resultados de la actividad citotóxica mostraron que el 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest -8-en-3 β -ol inhibió el 100% de crecimiento celular en las líneas de cáncer de sistema nervioso central y de cáncer de próstata, mientras que el ácido oleanólico inhibió el 100% del crecimiento celular en las líneas de cáncer de sistema nervioso central, próstata, mama y colon. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo a una concentración de 50 μ g/mL.

Por otro lado, los resultados, obtenidos en el modelo de edema inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecailforbol (TPA) en oreja de ratón, mostraron que el extracto de raíz inhibió la inflamación en 56.96%, mientras que el extracto de partes aéreas inhibió la inflamación en 69.62%. Ambas determinaciones se realizaron a una dosis de 1mg/oreja.

En el modelo de edema inducido por carragenina, los extractos de raíz y de las partes aéreas, inhibieron la inflamación en 20.28% y 24.71%, respectivamente. Ambas evaluaciones se realizaron con una dosis de 31mg/kg.

2. INTRODUCCIÓN

Una de las familias que ha sido utilizada en la medicina tradicional desde épocas prehispánicas, ha sido la Cactaceae. Hoy en día, estudios de algunas especies de esta familia han permitido la obtención de extractos orgánicos con actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano, así como, con propiedades antiinflamatorias probados en modelos de inflamación. Como ejemplos, tenemos al garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) cuyos extractos poseen una elevada actividad antiinflamatoria (Céspedes *et al.*, 2005), y el palo de puercoespín (*Pereskia spp*), cuyos extractos mostraron efecto citotóxico sobre algunas líneas celulares de cáncer humano (Tan *et al.*, 2005).

Así mismo, se ha informado que algunas cactáceas sintetizan varios metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los triterpenos y glicósidos de triterpenos (Delgado *et al.*, 2006), los cuales poseen una variada gama de acciones biológicas, entre las que se encuentran la inhibición de tumores, la inhibición del crecimiento celular en ciertas células tumorales, así como la inducción de apoptosis. Convirtiendo a este tipo de metabolitos en agentes potenciales anticancerígenos (Arroyo *et al.*, 2005; Haridas *et al.*, 2001; Ze *et al.*, 2006).

El cáncer es una de los mayores problemas de salud en México y otros países como Estados Unidos, Canadá, Francia, Japón, en donde cada año se registran nuevos casos de esta enfermedad. Sin embargo, en cada región del planeta varía el tipo de cáncer, así como también la edad y el sexo en el que se presenta esta enfermedad (American Cancer Society, 2006). Tan solo en el año 2002 se estimó la defunción de 6.7 millones de personas en el mundo y se estima que para el año 2020 aumente 10.3 millones de nuevos casos de cáncer en el planeta (Jemal *et al.*, 2006; Jermal *et al.*, 2007).

Durante el año 2006 la tercera causa de muerte en México fue ocasionada por el cáncer, provocando la muerte del 12.9% de la población registrada en ese año. En la figura 1, se muestran las principales causas de defunción por tumores malignos en México de acuerdo al sexo en el año 2006 (INEGI, 2006).

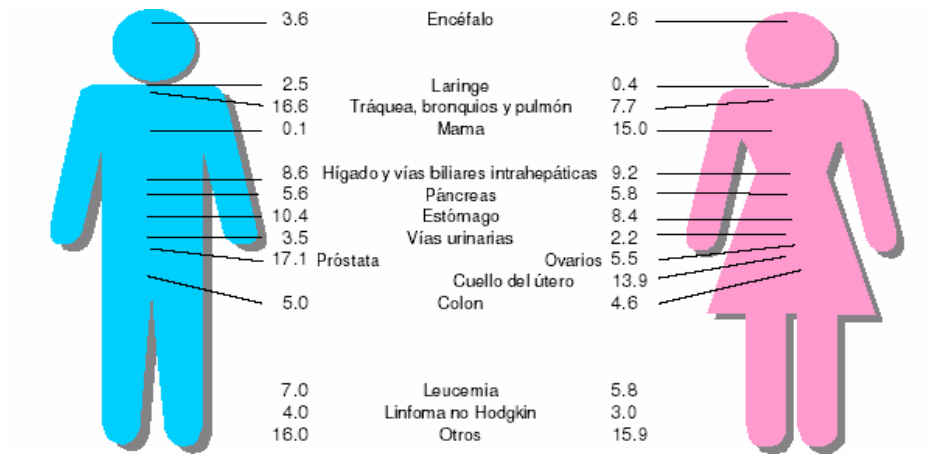


Fig. 1 Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según sexo en el año 2006 en México (INEGI, 2006)

3. JUSTIFICACIÓN.

Desde los inicios de la humanidad el hombre ha tenido como aliadas a las plantas. Un ejemplo claro es la familia Cactaceae, pues en México, desde la época prehispánica diversas especies de esta familia eran utilizadas con fines medicinales, alimenticios, mágico-religiosos y ornamentales (Mandujano *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2001).

Sin embargo, varias de estas cactáceas carecen de estudios químicos y de su actividad biológica, entre ellas podemos citar a las especies del género *Stenocereus*, del cual poco se sabe de sus propiedades biológicas y de los escasos estudios realizados se conoce que los extractos de *Stenocereus eruca* así como *S. stellatus* tienen efectos analgésicos y antitumorales (Imai *et al.*, 2006; Okazaki *et al.*, 2007). Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto se propone determinar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos orgánicos y metabolitos secundarios de raíz y partes aéreas provenientes de *S. pruinosus*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 FAMILIA CACTACEAE.

Las cactáceas constituyen una de las familias botánicas más numerosas, con una gran cantidad de géneros y especies, distribuidas en regiones áridas y semiáridas del continente americano (Anderson *et al.*, 2001).

Estas especies se caracterizan por tener una gran diversidad de formas, colores y espinas que exhiben, así como la estructura de su aparato vegetativo, su fisiología, su ecología y a la variedad de medios en los que se desarrollan, entre otros aspectos (Anderson *et al.*, 2001).

Sus tallos son crasos, espinosos y con frecuencia de dimensiones gigantescas, y carentes de hojas. Presentan formas muy diversas, entre las que resaltan, la columnar, la cilíndrica, la esférica y la candelabriforme. Otra característica particular que hace destacar a la familia Cactaceae es su longevidad, ya que la mayoría de los individuos crecen muy lentamente, existiendo así, ejemplares que llegan a vivir más de 2 000 años (Anderson *et al.*, 2001; Bravo, 1937; Bravo 1978).

Se ha propuesto que la familia de las cactáceas es originaria del continente Americano. Específicamente, en México poseemos cerca de 45% de las especies de la familia y un alto porcentaje es endémico. La mayoría de las especies de esta familia se ubican en las zonas áridas y semiáridas del país. En nuestro país, las cactáceas ocupan el quinto lugar en diversidad con alrededor de 55 géneros y 850 especies (Mandujano *et al.*, 2002).

El país, también, se caracteriza por ser el centro de diversificación de cactáceas más importante, con un elevado número de endemismos. A este respecto, diversos autores han estimado el grado de endemismos, el cual varía de un 35% a 78% a nivel de géneros

endémicos. Aunque las cifras difieren, los autores coinciden en que el porcentaje de endemismos en México es muy alto (Hernández y Godínez, 1994).

Uno de los géneros más interesantes que posee la familia Cactaceae, es sin duda, el género *Stenocereus*, ya que desde el punto de vista morfológico, éste contiene algunas de las especies columnares más importantes (Terrazas y Loza, 2003).

4.2 GÉNERO *Stenocereus*.

Stenocereus es el género de más amplia distribución de la tribu Pachycereeae de la familia Cactaceae, incluye 23 especies (Cuadro 1) de las cuales la mayoría son endémicas de México. A este taxa pertenecen las plantas conocidas como pitayas, las cuales habitan en bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo del país (Anderson *et al.*, 2001; Terrazas y Loza, 2003).

A través de los años, este género ha sufrido diversos cambios en su clasificación taxonómica, a principios de 1900 era considerado como un subgénero, y hasta el año de 1909 se elevó a nivel de género, pero con el nombre de *Lemaireocereus*, y no fue, sino hasta el año de 1961 cuando Franz Buxman estableció a *Stenocereus* como un género (Bravo, 1978).

Cuadro 1. Especies del género *Stenocereus*

Especies del género <i>Stenocereus</i>				
<i>Stenocereus alamosensis</i>	<i>Stenocereus eichlamii</i>	<i>Stenocereus gummosus</i>	<i>Stenocereus pruinosus</i>	<i>Stenocereus thurberi</i>
<i>Stenocereus aragonii</i>	<i>Stenocereus eruca</i>	<i>Stenocereus kerberi</i>	<i>Stenocereus queretaroensis</i>	<i>Stenocereus treleasei</i>
<i>Stenocereus beneckeii</i>	<i>Stenocereus fimbriatus</i>	<i>Stenocereus laevigatus</i>	<i>Stenocereus quevedonis</i>	<i>Stenocereus yunkerii</i>
<i>Stenocereus chacalapensis</i>	<i>Stenocereus fricci</i>	<i>Stenocereus martinezii</i>	<i>Stenocereus standleyi</i>	
<i>Stenocereus chysocarpus</i>	<i>Stenocereus griseus</i>	<i>Stenocereus montanus</i>	<i>Stenocereus stellatus</i>	

4.3 CLASIFICACIONES ANTERIORES DE *S.* *pruinus*

Stenocereus pruinosus (Otto) Buxbaum 1961

Nombres comunes: Pitaya, Pitayo, Pitayo de Octubre.

Esta especie ha sido clasificada con diversos nombres, entre ellos tenemos a (Bravo, 1978; Anderson *et al.*, 2001):

Echinocactus pruinosus Otto 1837

Cactus pruinosus (Otto) Monville 1840

Cereus pruinosus (Otto) Otto 1846

Lemaireocereus pruinosus (Otto) Britton et Rose 1920

Ritterocereus pruinosus (Otto) Backeberg 1951



Fig. 2 *Stenocereus pruinosus*

4.4 TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Clasificación taxonómica de *Stenocereus pruinosus* (Arreola y Terrazas, 2003):



Fig. 3 *Stenocereus pruinosus*

Reino: Plantae

División: Angiosperma

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Tribu: Pachycereae

Género: *Stenocereus*

Especie: *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum 1961

Descripción botánica de *Stenocereus pruinosus*

Posee un estrato arborescente, con tronco bien definido, de 4 a 5 metros de alto, sus ramas son de 8 a 10 centímetros de diámetro, de color verde oscuro (Figura 3). Posee de 5 a 7 espinas radiales de 1 a 2 centímetros de largo, radiadas, subuladas, al principio amarillentas, después grises con la punta oscura. De 1 a 4 espinas centrales, grises, de 2 a 3 centímetros de longitud. Flores infundibuliformes, de 9 centímetros de longitud con tubo receptacular largo; fruto ovoide, de 5 a 8 centímetros de largo, de color variable, rojo púrpura, anaranjado verdoso, con pulpa carnosa,; las aréolas grandes. Semillas pequeñas, de 2 a 2.5 milímetros de largo y 1.8 milímetros de ancho; testa negra con gruesas puntuaciones. Se distribuye en Tamaulipas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Estado de México (Figura 4) (Arreola y Terrazas, 2003; Bravo, 1978).



Fig. 4 Mapa de la distribución geográfica de *Stenocereus pruinosus*.

4.5 METABOLITOS SECUNDARIOS.

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: los básicos y los secundarios. En 1891 Kössel Stahls trabajo sobre la bioquímica de las plantas y sugirió una distinción entre el metabolismo básico y secundario. El metabolismo básico se refiere a los procesos anabólicos y catabólicos requeridos para la respiración, la asimilación de nutrientes y el desarrollo o crecimiento. En contraste el metabolismo secundario se refiere a los componentes presentes en células especializadas que aparentemente no son necesarias para la supervivencia de la célula pero son requeridos para la supervivencia de las plantas en su ambiente (Kliebensteins, 2004).

Las funciones más relevantes que puedan desempeñar los metabolitos secundarios son (Kliebensteins, 2004; Anaya, 2003):

1. Prevenir los ataques de insectos herbívoros así como también de patógenos.
2. Atracción de polinizadores por medio de las coloraciones de las flores o también por su aroma floral.

Actualmente se conocen cientos de miles de metabolitos secundarios, pero tal vez existan millones, y lo que es importante recalcar, es que se siguen biosintetizando nuevos esqueletos hidrocarbonados, los cuales originaran varios metabolitos novedosos. Esta dinámica se establece gracias a las interacciones bióticas dentro y entre especies y a la continua evolución de los organismos (Kliebensteins, 2004; Anaya, 2003).

Los metabolitos secundarios se caracterizan a grandes rasgos, por (Anaya, 2003):

1. Una gran heterogeneidad de su estructura química.
2. Una distribución restringida.
3. El control estricto de su biosíntesis, por medio de la regulación de la cantidad de enzimas involucradas y de la actividad de estas.

4.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS CACTÁCEAS.

La familia Cactaceae produce una gama importante de metabolitos secundarios. Dentro de estos metabolitos encontramos a los alcaloides, esteroides, triterpenos, lactonas, (Figura 5) y muchos otros (Bravo, 1937).

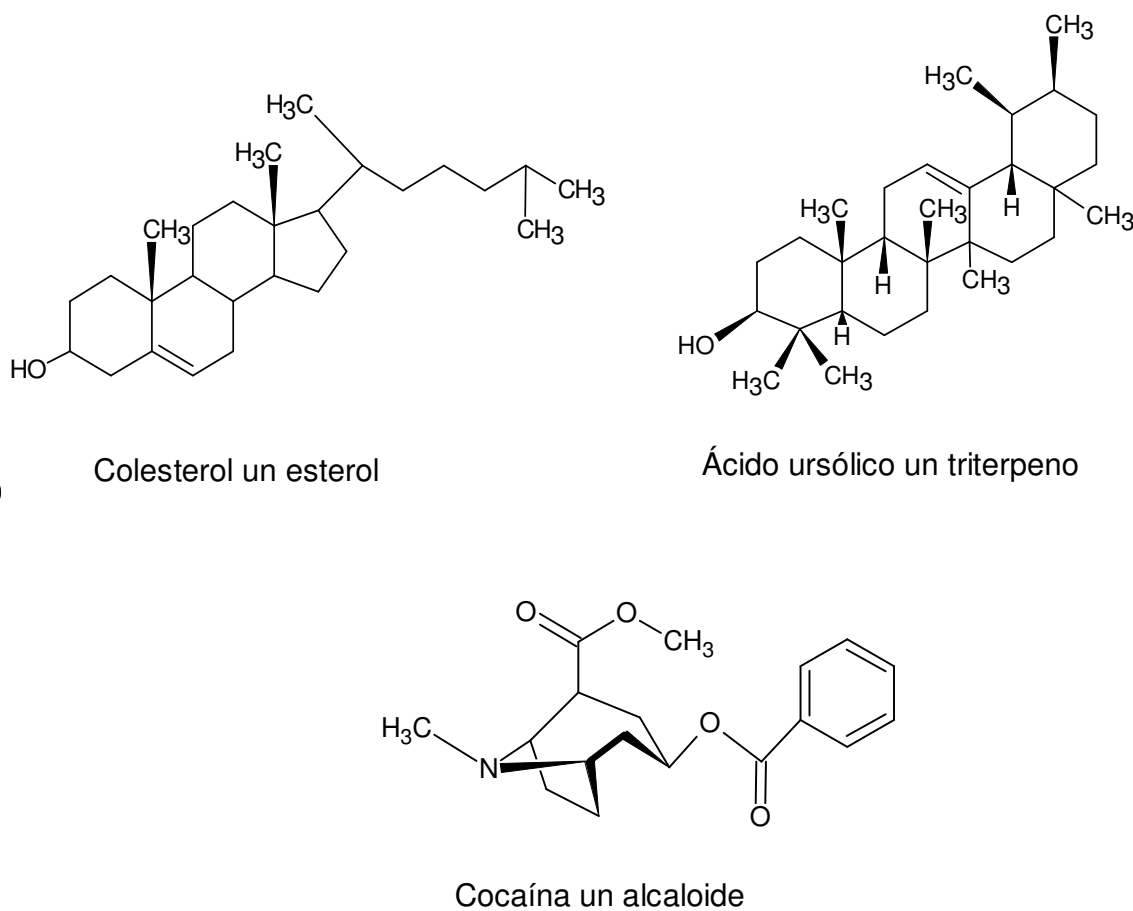


Fig. 5 Ejemplos de algunos metabolitos secundarios

4.7 TRITERPENOS.

Los triterpenos constituyen un numeroso y diverso grupo de metabolitos secundarios, los cuales poseen un esqueleto base de 30 átomos de carbono (seis unidades isopropénicas, Figura. 6). Este grupo de metabolitos secundarios muestra más de 100 esqueletos distintos (Ran *et al.*, 2004).

Los triterpenos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales se encuentran ya sea libres o formando glicósidos (Delgado *et al*, 2006). Se han propuesto diversos métodos de clasificación, de estos, destaca el que los divide tomando en cuenta el número de anillos que los conforman (acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos). Hoy en día se conocen más de 40 esqueletos triterpénicos básicos que pueden ser agrupados en esta clasificación y cada año se informan de aislamiento de nuevos triterpenos (Anaya, 2003).

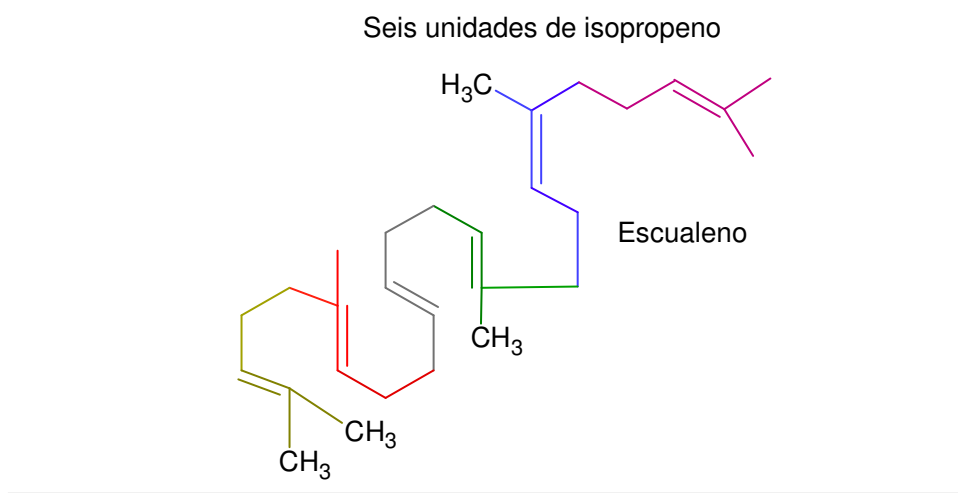


Fig. 6 Estructura de un triterpeno.

-2, 6, 10, 15, 19,23- hexamethyltetracos-2, 6, 10, 14,18,22-hexaene

4.8 ESTEROLES.

Los esteroides son metabolitos derivados de isoprenoides cíclicos formados por 17 carbonos dispuestos en tres anillos hexagonales y uno pentagonal (Figura 7) (Teijón *et al.*, 2006; Anaya., 2003).

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas esteroides), como ésteres o como glicósidos (Teijón *et al.*, 2006; Anaya., 2003).

En los animales superiores (Incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (hormonas, ácidos biliares, vitamina D, etc.). En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides: β -Sitosterol, campesterol y estigmasterol (Teijón *et al.*, 2006;).

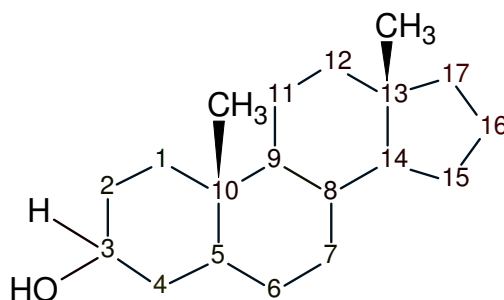


Fig. 7 Esqueleto de un esteroide

4.9 ALCALOIDES.

Los alcaloides son extremadamente difíciles de definir porque no representan un grupo homogéneo de compuestos, sea desde el punto de vista químico, bioquímico, ecológico o fisiológico (Gisbert y Villanueva, 2005). Por lo tanto, toda definición general debe formularse con reservas. En lo único que coinciden es que son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, generalmente cíclico y por lo común, de gran toxicidad. La

mayoría de ellos son insolubles o muy poco solubles en agua, pero se disuelven bien en alcohol, éter y cloroformo. Los alcaloides reaccionan con los ácidos para formar sales, las cuales son bastante solubles en agua, fáciles de cristalizar e insolubles en los disolventes orgánicos (Anaya, 2003; Gisbert y Villanueva, 2005). Actualmente se conocen más de 8 000 compuestos representativos de este grupo de metabolitos secundarios (Anaya, 2003).

4.10 TRITERPENOS EN EL GÉNERO *Stenocereus*

Para el género *Stenocereus* existen pocos trabajos fitoquímicos, entre ellos podemos mencionar los de Djerasi y su grupo de colaboradores, los cuales fueron recopilados en el libro de las Cactáceas de México de Helia Bravo (1978), sin embargo, recientemente las cactáceas *S. eruca* y *S. stellatus* han sido estudiadas por Imai y colaboradores (2006) y Okazaki y colaboradores (2007).

Los compuestos aislados en el género se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Triterpenos aislados del género *Stenocereus* (Bravo., 1978; Imai *et al.*, 2006; Okazaki *et al.*, 2007).

Triterpenos	Especies
Ácido oleanólico Ácido queretaroico	<i>Stenocereus queretaroensis</i>
Ácido oleanólico Ácido queretaroico	<i>S. montanus</i>
Ácido oleanólico Turberogenina	<i>S. thurberi</i>
Ácido oleanólico	<i>S. longispinus</i>

<p> Acido oleanolico Turberogenina Ácido queretaroico Machaerogenina Stellatogenina Acido betulinico Eurocasaponina A, Stellatosido B Ácido treleasegenico Ácido morolico Ácido machaerocerico Ácido 21-ketobetulinico 22 β-hidroxistellatogenina Desoxifilirigenina Ácido 16β-hidroxifilirigenina </p>	<p><i>S. eruca</i></p>
<p> Ácido oleanolico Ácido betulinico Lungispinogenina </p>	<p><i>S. histrix</i></p>
<p> Ácido oleanolico Lungispinogenina </p>	<p><i>S. griseus</i></p>
<p>Ácido oleanolico</p>	<p><i>S. pruinosus</i></p>
<p> Ácido queretaroico Ácido oleanolico 16-b-hidroxistellatogenina Machaerogenina stellatosida A </p>	<p><i>S. stellatus</i></p>
<p> Ácido oleanolico Ácido treleasogenico Estelatogenina Turberogenina </p>	<p><i>S. treleasei</i></p>
<p> Ácido oleanolico Ácido queretaroico </p>	<p><i>S. beneckeii</i></p>
<p> Ácido oleanolico Lungispinogenina </p>	<p><i>S. quevedonis</i></p>
<p>Durmortierigenina</p>	<p><i>S. dumortieri</i></p>

4.11 TERPENOIDES CON POSIBLE ACCIÓN TERAPÉUTICA

Los metabolitos secundarios de origen vegetal juegan un rol muy importante en la terapia y prevención de enfermedades humanas. Más del 60% y 75% de los fármacos anticancerosos y para tratar enfermedades infecciosas, son de origen natural. Con más de 23 000 compuestos conocidos, los terpenoides son extensamente aplicados en varios sectores de la industria: como condimentos fragancias, aditivos de productos cosméticos y de alimentos (Zhang y Demon., 2005; Dzubak *et al.*, 2006).

Muchos triterpenos tienen diversas acciones biológicas y son usados con fines terapéuticos, tan solo en el año 2002 las ventas mundiales de fármacos basados en terpenos fueron aproximadamente de 12 mil millones de dólares (Sun *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1998).

Adicionalmente, algunos triterpenos, son usados con propósitos medicinales en muchos países asiáticos, y algunos como el ácido ursólico o el ácido oleanólico, son ampliamente conocidos como anticancerosos y antiinflamatorios (Dzubak *et al.*, 2006). Además se sabe que derivados de los ácidos ursólico y oleanólico inhiben la producción de óxido nítrico y de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), los cuales están estrechamente relacionados con tumores cancerosos, también se sabe que algunos derivados de estos ácidos inducen a las células tumorales a procesos apoptóticos, posiblemente por la inhibición de las topoisomerasas I y II, cuya actividad es crítica para la proliferación de células de cáncer (Zhang y Demon., 2005; Dzubak *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2006).

Por lo tanto los triterpenos, por sus efectos antiinflamatorios, antitumorales, hepatoprotectores, analgésico, antimicrobiano y antimicótico constituyen un grupo de metabolitos secundarios con potencial uso en la clínica (Zhang y Demon., 2005).

4.12 CÁNCER.

En organismos multicelulares, el crecimiento celular por división se encuentra bajo control. Las células se dividen cuando son estimuladas a través de señales externas e internas (Figura 8). El control estricto de la división celular, asegura que este proceso ocurra a una velocidad apropiada para el tejido o el órgano. En algunos tejidos, como por ejemplo la médula ósea, la piel y el endotelio gastrointestinal (GIT), las células se dividen constantemente, sustituyendo a las que han muerto. Sin embargo, en otros tejidos como el nervioso, la mitosis es rara. En otros tejidos, las células todavía pueden comenzar a dividirse cuando lo requieren, por ejemplo, en la regeneración del hígado o durante la curación de heridas en la piel (Thompson *et al.*, 2004; Rubin y Williams., 2003; Page *et al.*, 1998).

El término cáncer, cubre un número de enfermedades, en las cuales el crecimiento de células es descontrolado (Lewis *et al.*, 2004).

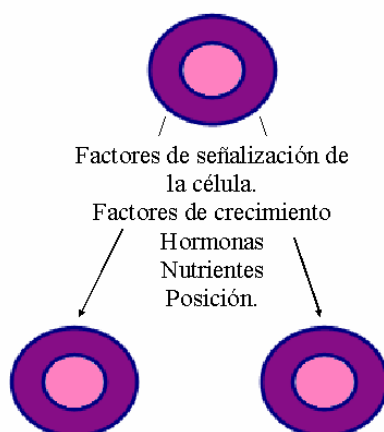


Fig. 8 Algunos factores extrínsecos e intrínsecos que influyen en la división celular.

El cáncer es un proceso patológico que se caracteriza por una proliferación celular incontrolada que provoca la formación de una masa o tumor (neoplasma), la cual puede surgir en cualquier célula del cuerpo y es capaz de evadir los controles reguladores de la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, para que un neoplasma sea considerado un cáncer, debe ser también maligno, que significa que su crecimiento ya no está bajo

control y el tumor es capaz de invadir tejidos vecinos y/o diseminarse (metástasis) a lugares más lejanos (Thompson *et al.*, 2004; Rubin y Williams., 2003).

Se afirma a menudo que el cáncer son muchas enfermedades diferentes, lo que suele significar que existen grandes diferencias entre los cánceres de los distintos órganos. Sin embargo, también es cierto que hay una variabilidad significativa entre los tumores que asientan el mismo órgano de diferentes pacientes y que existe una importante heterogeneidad fenotípica entre las células de un mismo cáncer (Cadavid y Estupiñán., 2006; Rubin y Williams., 2003).

Es esta heterogeneidad la que hace del cáncer una enfermedad tan difícil de tratar con éxito y la que hace que sea un reto en comprender sus causas (Cadavid y Estupiñán., 2006).

Clasificación del tipo de cáncer.

El cáncer es a menudo clasificado de acuerdo al tejido de origen. Existen tres formas principales de cáncer: *sarcomas*, en los que el tumor surge del tejido mesenquimático, como el hueso, el músculo o el tejido conectivo; *carcinomas*, que se originan en el tejido epitelial, como las células que recubren el intestino, los bronquios o los conductos mamarios, y los cánceres *hematopoyéticos* y *linfoides*, como las leucemias y los linfomas, que se diseminan por la médula ósea, el sistema linfático y la sangre periférica (Cadavid y Estupiñán., 2006).

Dentro de cada grupo, los tumores se clasifican por el lugar, el tipo de tejido, la apariencia histológica y el grado de malignidad (Cadavid y Estupiñán., 2006).

Biología del cáncer

El modelo clásico de desarrollo tumoral divide el proceso en tres fases: iniciación, promoción y progresión (Figura 9). La iniciación es el proceso por el cual un daño crítico del ADN se hace permanente en la célula, debido a que ésta se divide antes de que se repare, o bien por un fallo en el proceso de reparación. La promoción se define como el proceso mediante el cual se cree que determinados sucesos epigenéticos que influyen de forma selectiva en la proliferación de las células iniciadas, mientras que la progresión implica la producción de cambios hereditarios más profundos que aparecen a medida que la población se divide y se desarrolla el cáncer (Herrera y Granados., 2003).

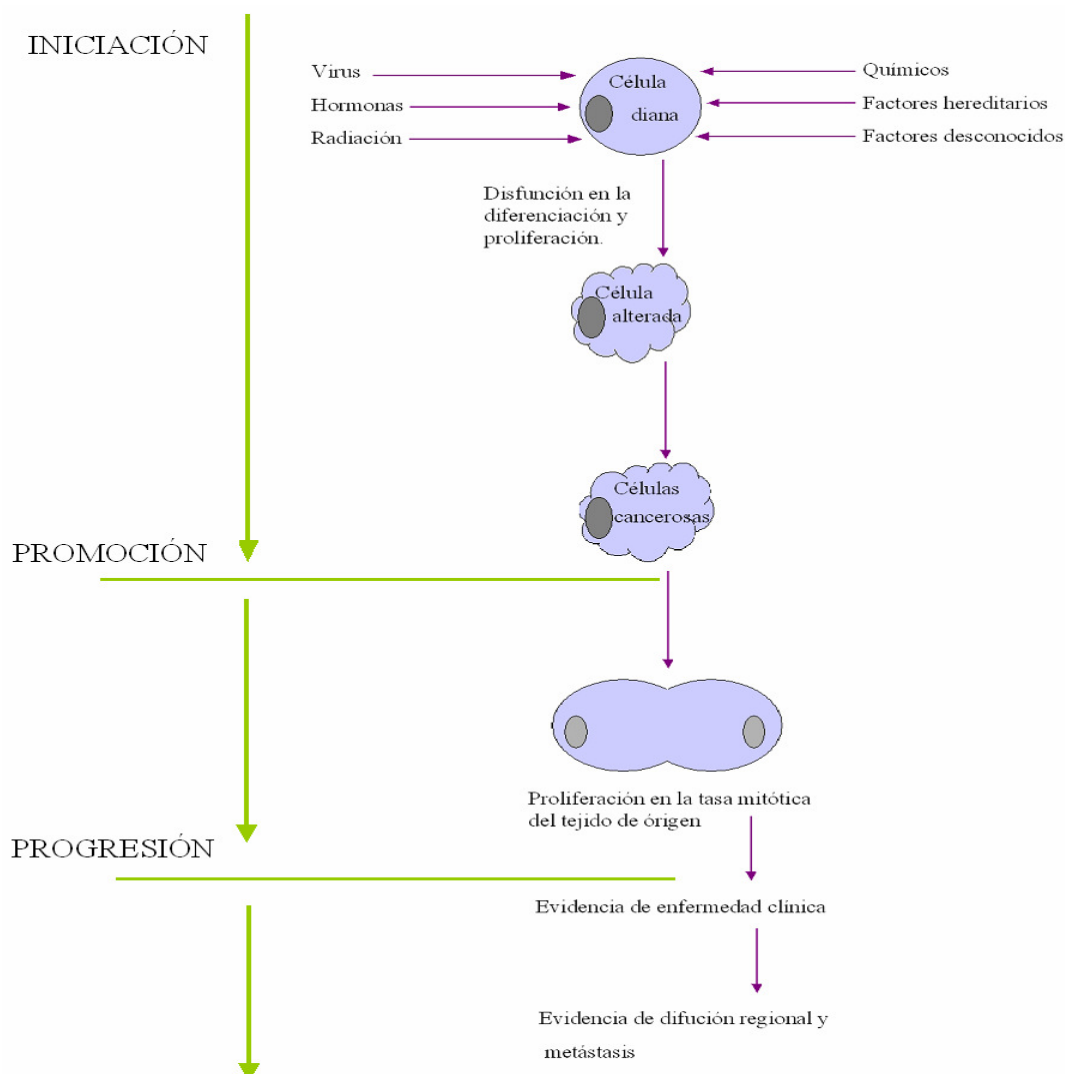


FIG 9. Modelo clásico de desarrollo tumoral (tomado y modificado de (Lewis et al., 2004)

Oncogenes y Genes supresores tumorales.

Existen genes que se encuentran asociados con el cáncer, incluyendo aquellos que controlan el ciclo celular, la división celular y moléculas involucradas en la transducción de señales y asociadas a factores de crecimiento, así como los que controlan el proceso de muerte celular programada que resulta en apoptosis. La mutación en algunos de estos genes puede dar lugar al incremento en la proliferación celular y el fracaso en la apoptosis. Los dos mayores grupos de genes vinculados con el cáncer son los oncogenes y los genes supresores tumorales, los cuales pueden verse afectados por una mutación (Herrera y Granados., 2003; Lewis et al., 2004; Marchal *et al.*, 2006).

Los oncogenes son formas mutadas de genes normales, llamados protooncogenes los cuales promueven el incremento en la proliferación de células anormales, codificando diversos factores, incluyendo factores de crecimiento y receptores, como lo son las proteínas involucradas en la transducción de señales (Herrera y Granados., 2003; Marchal *et al.*, 2006).

Los genes supresores tumorales, en contraste a los protooncogenes, codifican proteínas que inhiben la proliferación de células que contienen mutaciones, un ejemplo es el p53, el cual suprime el crecimiento celular. Las mutaciones que alteran a los genes supresores tumorales los vuelve inactivos, resultando así con la pérdida de sus acciones tumorales supresoras (Rubin y Williams., 2003).

4.13 INFLAMACIÓN.

La inflamación es una reacción morfológica y bioquímica de los tejidos vivos, de carácter predominantemente vascular, desencadenada por distintos agentes patógenos de acción local. La inflamación se produce en respuesta a una lesión o agresión a un tejido y es un proceso que habitualmente se desarrolla en tres fases (Pardo., 1998; Kumar et al., 2003):

- 1) Respuesta inflamatoria inmediata, relacionada con la causa.
- 2) Amplificación de la respuesta inicial por la acción de mediadores químicos que potencian la reacción vascular.
- 3) Cronificación de la inflamación y/o reparo de los tejidos.

Los elementos que intervienen en la inflamación son mediadores químicos, células de la sangre y de los tejidos y otros elementos del plasma y de los espacios extracelulares (Cuadro 3) (Pardo, 1998).

Cuadro 3. Elementos que intervienen en la reacción inflamatoria (Pardo, 1998)

Elementos que intervienen en la reacción inflamatoria.		
Mediadores químicos	Células de la sangre	Células de los tejidos
Aminas vasoactivas		
Proteasas	LPMN	
Metabolitos del ácido araquidónico	Linfocitos	Fibroblastos
Citocinas	Monocitos	Endotelio
Óxido nítrico	Células plasmáticas	Histocitos
Radicales libres	Plaquetas basófilos	
Otros		

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por la salida de líquidos y proteínas plasmáticas y el infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (LPMN), neutrófilos y macrófagos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos y con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo ¹⁷. La inflamación crónica puede producirse por tres mecanismos: a) persistencia de una inflamación aguda; b) persistencia de una causa; c) reacción de tipo inmune y autoinmune (Mark et al., 2008).

Lo que caracteriza morfológicamente a una inflamación es la presencia en el tejido dañado de células de la sangre, especialmente leucocitos polimorfonucleares, monolitos y linfocitos, y de otras células como células plasmáticas, fibroblastos y células endoteliales (Nathan., 2002).

Una de las fases claves del proceso inflamatorio la constituye el conjunto de eventos bioquímicos que conducen a la secreción-liberación de unas sustancias biológicamente activas, denominadas mediadores químicos de la inflamación, que son responsables de los cambios metabólicos, vasculares y celulares que caracterizan propiamente a la inflamación (Etienne-Decant et al., 2001)

Metabolitos del ácido araquidónico (AA): prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas. Los productos derivados del metabolismo del AA influyen en varios procesos biológicos, tales como la inflamación. Se pueden denominar hormonas de corto alcance que actúan localmente en el lugar donde se generan y después se degradan espontáneamente con rapidez y son destruidos por enzimas (Etienne-Decant et al., 2001).

El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos (con 4 enlaces dobles) y esta presente en el cuerpo principalmente en su forma esterificada como un componente de los fosfolípidos de la membrana celular. Se libera a partir de estos fosfolípidos por acción de las fosfolipasas celulares activadas por estímulos mecánicos, químicos o físicos o por

mediadores inflamatorios. El metabolismo del AA solo tiene lugar en una de dos vías principales: vía de la ciclooxigenasa, en que se sintetiza prostaglandinas y tromboxanos y la vía de la lipooxigenasa, en la que se generan leucotrienos y lipoxinas. Los metabolitos del AA (también denominados eicosanoides) pueden medir la practica totalidad de los pasos de la inflamación; sus síntesis aumenta los focos de respuesta inflamatoria y los factores que inhiben su síntesis también reducen la inflamación (Kumar et al., 2003).

4.14 RELACIÓN CÁNCER INFLAMACIÓN

De los varios factores de riesgo que pueden iniciar un proceso canceroso se ubica la inflamación. La relación funcional entre la inflamación y cáncer no es nueva. En 1863 Virchow propuso que el origen del cáncer estaba en sitios de inflamación crónica, su hipótesis, en parte se baso en que algunas clases de irritantes, junto con una lesión de tejido y el proceso de inflamación que sobreviene, aumentan la proliferación celular (Nathan, 2002; Coussens y Werb., 2002).

Datos recientes indican que los procesos inflamatorios son componentes críticos en la progresión tumoral. Muchos canceres se presentan en sitios de infección, irritación crónica e inflamación. En la actualidad, es claro que el microambiente de los tumores está dirigido en gran parte por células inflamatorias y el desarrollo inflamatorio es indispensable en el proceso neoplásico, fomentando la proliferación, la sobrevivencia y la migración. Adicionalmente, las células tumorales han copiado algunas de las señales moleculares del sistema inmune innato, como son las quimioquinas, la invasión por receptores, la migración y la metástasis (Nathan, 2002; Coussens y Werb., 2002; Missailidis., 2007).

Aunque la proliferación, por si misma no causa el cáncer, la proliferación sostenida de la célula en ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, activación del estroma, y agentes promotores del daño a DNA, refuerza y/o promueve riesgos neoplásicos (Nathan, 2002; Coussens y Werb., 2002).

En el cuadro 4 se muestran algunas inflamaciones asociadas a neoplasias (Coussens y Werb., 2002).

Cuadro 4. Inflamaciones asociadas a neoplasias (Coussens y Werb., 2002).

Condiciones asociadas de la inflamación crónica con las neoplasias.		
Condiciones patológicas	Neoplasias asociadas	Posibles Agentes
Inflamación de piel	Melanoma	Irradiación solar
Bronquitis	Carcinoma de pulmón	Silica, asbestos,
Cistitis, Inflamación de vejiga	Carcinoma de vejiga	
Gingivitis	Carcinoma de células escamosas orales	
Enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis crónica	Carcinoma colorectal	
Pancreatitis crónica, Pancreatitis hereditaria	Carcinoma del páncreas	Alcoholismo
Reflujo esófago	Carcinoma de esófago	Ácidos gástricos
Sialadenitis, inflamación de la glándula salival	Carcinoma de la glándula salival	

4. HIPÓTESIS.

De acuerdo con la literatura, existen metabolitos secundarios provenientes de *Stenocereus eruca* y *S. stellatus* con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas, por lo tanto es factible suponer, que los extractos orgánicos así como los metabolitos secundarios de *S. pruinosus* presenten actividad antiinflamatoria y citotóxica.

6. OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Evaluar las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de extractos orgánicos y metabolitos secundarios mayoritarios provenientes de *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum.

Objetivos particulares.

- Obtener el extracto metanol-diclorometano (MeOH- CH₂Cl₂) de la raíz y partes aéreas de *Stenocereus pruinosus*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto MeOH-CH₂Cl₂ de raíz y partes aéreas de *S. pruinosus* a través en los modelos edema inducido por TPA y carragenina.
- Evaluar la actividad citotóxica a través del ensayo de sulforrodamida B del extracto MeOH- CH₂Cl₂ de raíz y partes aéreas de *S. pruinosus*.
- Extraer, purificar e identificar de los metabolitos secundarios mayoritarios de la raíz y partes aéreas de *S. pruinosus*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria a través del modelo de TPA de los metabolitos secundarios mayoritarios aislado de la raíz y partes aéreas de *S. pruinosus*.
- Evaluar la actividad citotóxica a través del modelo de sulforrodamida B de los metabolitos secundarios mayoritarios aislado de la raíz y partes aéreas de *S. pruinosus*.

7. MÉTODO

Para lograr los objetivos planteados en el presente trabajo, éste se dividió en dos etapas, la primera de ellas fue el estudio fitoquímico de *Stenocereus pruinosus*, el cual incluyó la obtención de los extractos, así como también la extracción, aislamiento, purificación e identificación de los compuestos mayoritarios contenidos en la raíz y partes aéreas de la especie. En la segunda etapa se determinó la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los extractos así como a los metabolitos aislados purificados e identificados.

7.1 *Estudio fitoquímico.*

- Material vegetal de *Stenocereus pruinosus*

La raíz y partes aéreas colectadas de *Stenocereus pruinosus*, se llevaron a cabo el 10 de marzo de 2007 en el cañón del Zopilote en el estado de Guerrero, México. Se colectó también un ejemplar para el herbario, el cual fue depositado en el Herbario Nacional MEXU de la Universidad Nacional Autónoma de México. El material vegetal se colocó en papel periódico para su transporte al laboratorio.

- Extractos orgánicos.

Una vez el material vegetal en el laboratorio, la raíz fue molida en una licuadora industrial marca Internacional, modelo LI-5, mientras que las partes

aéreas fueron cortadas en rodajas (Figura 10). Tanto la raíz y las partes aéreas fueron deshidratados a temperatura ambiente.

El material vegetal (raíz y partes aéreas) se maceró exhaustivamente durante 20 días con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1), a temperatura ambiente, posteriormente el macerado se filtró y éste se evaporó a presión reducida. Obteniéndose de esta manera los extractos orgánicos: de raíz y partes aéreas, los cuales fueron guardados en frascos de vidrio ámbar, previamente pesados, y por diferencia de peso se determinó la cantidad de muestra presente en cada extracto.



FIG. 10 Parte aérea de *Stenocereus pruinosus*.

- Extracción, aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios de *S. pruinosus*

Una vez obtenidos los extractos su separación se llevó a cabo mediante el método de cromatografía en columna, la cual se llevó a cabo en una columna abierta a presión reducida, empleado como fase estacionaria gel de sílice marca MN- Kieselgel G, en una proporción de 1: 3 con respecto al

peso del extracto y utilizando como eluyentes mezclas de hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en polaridad ascendente.

Todas las fracciones obtenidas fueron cromatografiadas y aquellas que mostraban un patrón cromatografico similar se reunieron.

Posteriormente la purificación de los compuestos se realizó por cristalizaciones sucesivas, hidrólisis y cromatografía en placa preparativa. Para verificar su pureza se realizó cromatografía en capa fina.

7.2 Determinación de la actividad citotóxica

La determinación de la actividad citotóxica se realizó mediante el método de Sulforodamina B, propuesta por Monks y colaboradores (1991).

El principio del método de Sulforodamina B (SRB) depende en la habilidad de este a unirse con los componentes proteicos de la célula que han sido fijados en cultivos celulares por el acido tricloroacetico (TCA). La SRB es un colorante rosa brillante, el cual tiene dos grupos sulfonicos que se unen a los residuos básicos de los aminoácidos bajo ligeras condiciones acidas, y son disociadas bajo condiciones básicas. La Sulforodamina B es fuertemente detectada con un rayo de luz a 488 nanómetros y se puede medir cuantitativamente a través de citometría de flujo.

Cultivos celulares. Se emplearon seis líneas celulares de cáncer humano: colón HCT-15, mama MCF-7, sistema nervioso central U251, leucemia K-562 y próstata PC-3 y pulmon SKUL., las cuales fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SFB, 2 μ M glutamina. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37 °C y un ambiente saturado de humedad.

Preparación e inoculación de las células. Las células adheridas a los frascos de cultivo fueron removidos con 2 ó 3 mL de solución tripsina-EDTA (Etilen-diamin-treta acético) al 0.05%. Posteriormente la tripsina fue inactivada adicionando 10 mL de medio RPMI-1640 con 5% de SFB, las células se disociaron con un pipeteo suave, la densidad y viabilidad de las líneas celulares fueron contadas en un hemocitómetro y evaluadas por exclusión con azul de tripano. Después de contar las células se procedió a hacer una dilución para obtener una densidad adecuada para cada línea (cuadro 5). La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos. Una vez hecho lo anterior, todas las líneas celulares fueron incubadas por un período de 24 h a 37°C antes de adicionar los compuestos a evaluar.

Dilución de los compuestos a evaluar. Los extractos orgánicos de raíz y partes aéreas, así como los compuestos purificados de *S. pruinosus* fueron solubilizados en dimetilsulfoxil DMSO (40 µM) para ser evaluados en una concentración de 50 µg/mL. Esta concentración se utilizó debido a recomendaciones del INC (Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos) para este modelo. Inmediatamente después de la preparación de las soluciones a evaluar, se agregó 100 µL de la solución a cada uno de los pozos en la placa de fondo plano de 96 pozos, obteniendo un volumen total de 200 µL. Se usó como control negativo diferentes concentraciones de DMSO. Los cultivos se incubaron por un período de 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. El crecimiento celular se evaluó mediante la técnica de Sulfurodamina B (SRB).

Ensayo sulfurodamina B. Transcurridas 48 horas, los cultivos celulares se fijaron *in situ* adicionado 50 µL ácido tricloroacético (TCA) frío (50% p/v), los cultivos se incubaron por 60 minutos a 4 °C. Cumplido ese tiempo se desechó

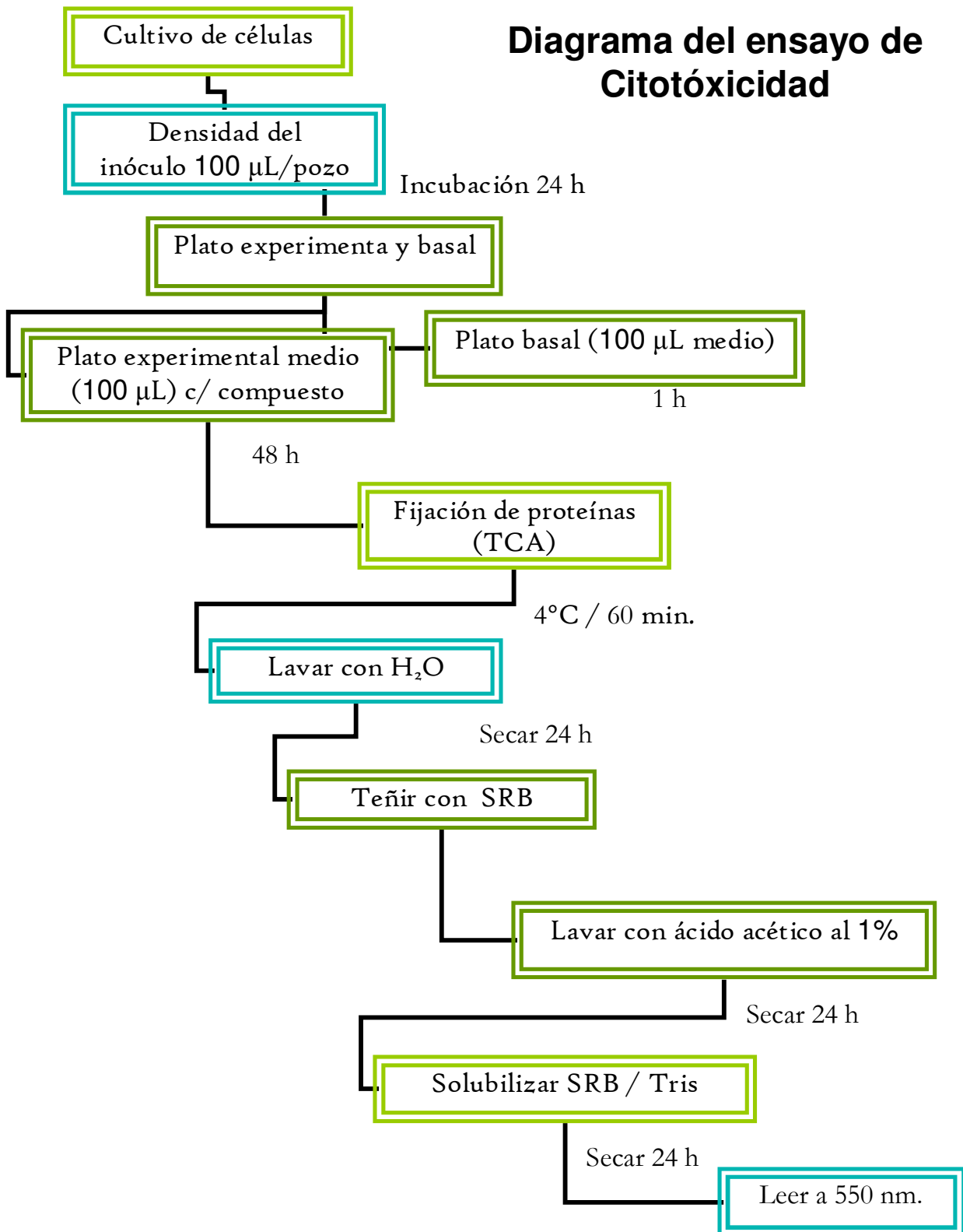
el sobrenadante y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se adiciono a los pozos 100 µL de SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%), el cual se incubo durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el exceso de SRB se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1%, se dejo secar por 24h. Finalmente, las células que se tiñeron con el colorante fueron solubilizadas con buffer Tris y la densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. La densidad óptica es proporcional a la cantidad proteica celular total e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad del compuesto a prueba. La citotoxicidad fue reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determino de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - \left(\frac{\text{DOr (muestra)}}{\text{DOr (vehículo)}} \right) * 100$$

Cuadro 5. Características de las líneas celulares.

Línea celular	Tejido de origen	Tiempo de duplicación (h)	Densidad del inoculo (Cel-mL)	Cel/pozo (100µL)
U-251	Sistema nervioso central	25.4	7.5 X10 ⁴	7 500
PC-3	Próstata	28.7	7.5 X10 ⁴	7 500
HCT-15	Colón	18.1	10 X10 ⁴	10 000
K-562	Leucemia mioblástica crónica	19.0	5 x10 ⁴	5 000
MCF-7	Mama	20.1	5 x10 ⁴	5 000

Diagrama del ensayo de Citotóxicidad



7.3 *Determinación de la actividad antiinflamatoria*

Ensayo de edema en oreja de ratón por TPA.

Uno de los métodos utilizados para la evaluación de la actividad antiinflamatoria fue el ensayo de edema inducido en oreja de ratón por 13-acetato de 12-O-tetradecaiforbol (TPA), siguiendo la metodología propuesta por Della y colaboradores (1985). Este método no ha sido completamente elucidado, pero se sabe que la respuesta inflamatoria es local y consiste en eritema, edema e infiltración de LPMN (leucocito polimorfonuclear); además de liberarse mediadores de tipo eicosanoide e induce la degradación de mastocitos, además de estimular la activación de la fosfolipasa 2 (PLA₂) y con ello, la consecutiva liberación del ácido araquidónico

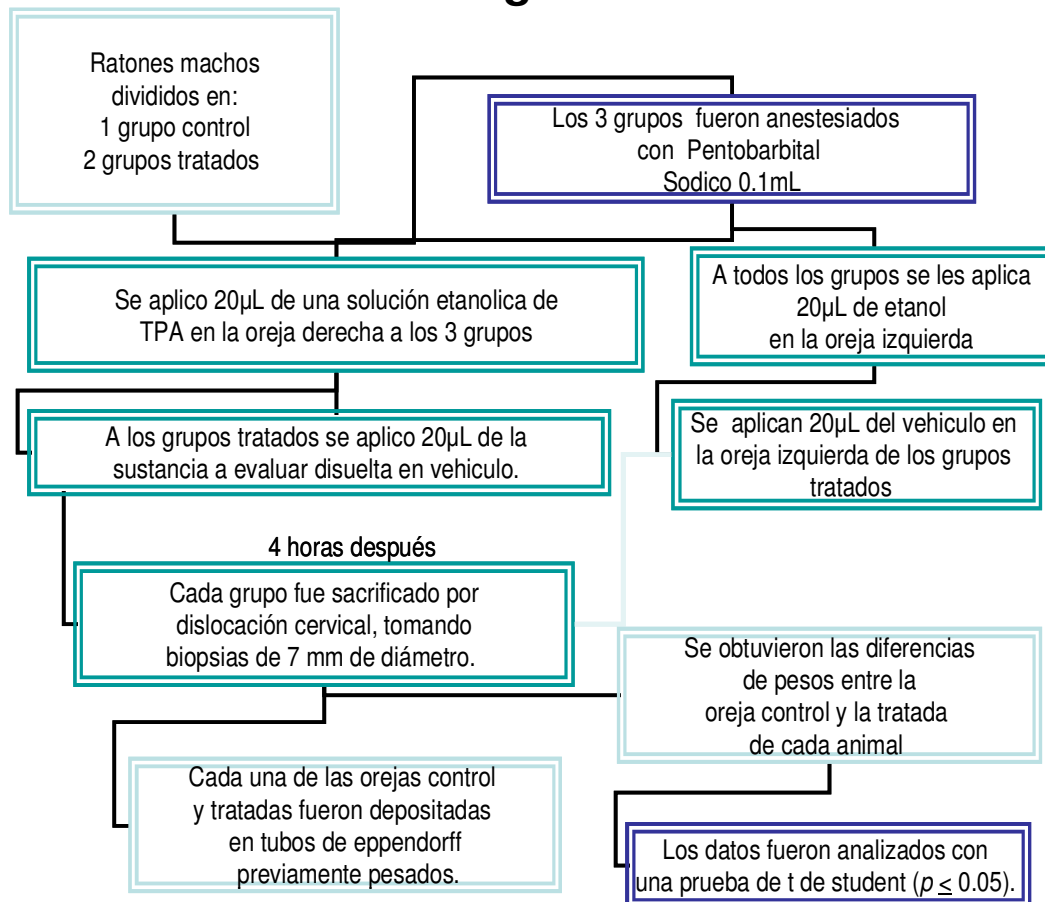
Ensayo de TPA. Se emplearon ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25 g) los cuales fueron pesados y separados al azar en grupos de tres: un grupo control y dos grupos tratados. Cada grupo (n=3) fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 0.1mL de pentobarbital x cada 10g de peso del ratón. La anestesia fue vía intraperitoneal. En los tres grupos la solución etanólica de TPA (25 µg/mL) fue aplicada tópicamente sobre la superficie posterior e inferior de la oreja derecha del ratón (10 µL x cada lado) para inducir la inflamación. Posteriormente a los tres grupos se les aplico 10 µL de etanol en la superficie posterior e inferior de la oreja izquierda, diez minutos después de la aplicación del TPA, a los grupos tratados se les aplico 20 µL de la sustancia en estudio disueltas en el vehiculo (disolvente en el cual se solubilizaban las sustancias en estudio) a una dosis de 1.0 µmol/oreja para los extractos, mientras que para los compuestos purificados la dosis fue de 0.31 µmol/oreja) en ambas caras de la oreja derecha, y en la oreja izquierda solo se aplicaron

20 µL del vehículo. Transcurridas 4h de post-aplicación cada grupo fue sacrificado por dislocación cervical, tomando biopsias de cada oreja con un sacabocados de 7 mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas fueron depositadas en tubos de eppendorff previamente pesados. Se obtuvieron las diferencias de pesos entre la oreja control y la tratada de cada animal. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(x \bar{\text{tratado}} / x \bar{\text{control}}) 100]$$

Análisis estadístico: los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de student y una prueba de Dunnet, utilizando el programa Sigma-stat (2.0). El nivel de significancia en todos los análisis fue de $p < 0.05$.

Diagrama del modelo de TPA



Ensayo de edema en pata de rata inducido por Carragenina.

Un segundo método utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria fue el ensayo de edema inducido por carragenina en la pata de la rata propuesto por Winter y colaboradores (1962).

En este ensayo se provoca una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, prostaglandinas), generando únicamente una reacción inflamatoria local, que no es modificada por factores externos. Este ensayo es reproducible y su respuesta biológica alcanza la plenitud en un tiempo de 3 a 6 horas.

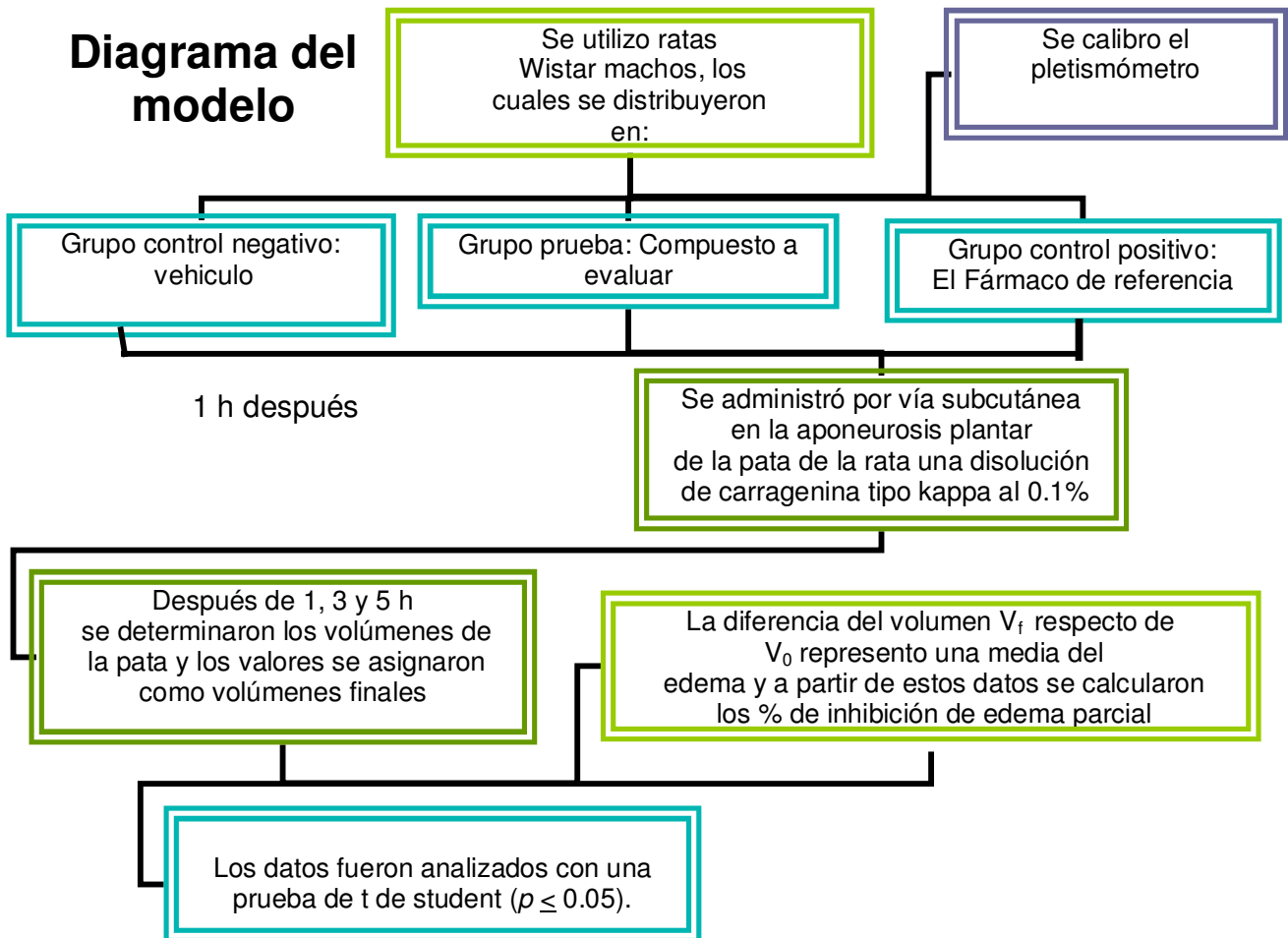
En la primera hora del ensayo, la histamina, serotonina, bradicina y 5-hidroxitriptamina tienen un papel principal como mediadores de la inflamación, aproximadamente de 1 ½ a 2 ½ horas después de la inyección de la carragenina, intervienen las cininas como mediadoras y la última fase, comprendida hasta la sexta hora, está mediada por prostaglandinas PGE₁, PGE₂ y PGF_{2α} producidas por la acción de la ciclooxygenasa 2 (COX-2). La salida de proteínas plasmáticas sucede durante todo el periodo. La migración celular, principalmente de LPMN (leucocitos polimorfonucleados), se produce en la segunda hora. Otro mediador importante en la respuesta por carragenina es el óxido nítrico (NO), el cual incrementa la permeabilidad vascular y modifica el flujo sanguíneo local, en consecuencia induce el edema.

Ensayo de carragenina. Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso comprendido entre 150-200 g y se distribuyeron al azar (n= 3) en los siguientes grupos: control (recibió carragenina y el vehículo correspondiente), de prueba (recibió carragenina y los extractos a evaluar), y de referencia (recibieron carragenina y el fármaco de referencia: indometacina).

Una vez que se efectuó la calibración del pletismómetro se determinó el volumen inicial (V_0 en mL) mediante la medición del volumen de agua que se desplaza tras la introducción de la pata posterior derecha hasta el nivel del callo. Se realizaron de 3 a 4 mediciones que no diferían del 4%. Enseguida por vía intraperitoneal se administraron los extractos y los fármacos de referencia, el grupo control recibió el vehículo correspondiente, una hora después, una disolución de carragenina tipo kappa al 0.1% (0.1 mL) en disolución salina fisiológica (SSF) se administró por vía subcutánea en la aponeurosis plantar de la pata en cuestión. Después de 1, 3 y 5 h se determinaron los volúmenes de la pata y los valores se asignaron como volúmenes finales (V_f), la diferencia del volumen V_f respecto de V_0 representa una media del edema y a partir de estos datos se calcularon los porcentajes de inhibición de edema parcial (% IEP) en los tres tiempos de exploración, tomando en cuenta los valores de cada grupo de ensayo con respecto al control.

Análisis estadístico. Los resultados de volumen de edema se multiplicaron por 100 y se integraron en una curva, la cual representa el desarrollo del efecto antiinflamatorio observado. El área bajo la (ABC) se calculó a partir de la regla trapezoidal descrita por Tallarida y Murray (1981). Los valores de ABC permitieron determinar los porcentajes de inhibición del edema total (% IET).

Diagrama del modelo



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Separación de compuestos

Se separó 1/3 del total del extracto de CH₂Cl₂ - MeOH (1:1) de raíz y partes aéreas de *Stenocereus pruinosus*, colectando así un total de 354 fracciones de 250 mL para la columna de extracto de raíz (Cuadro 6) y 230 fracciones de 250 mL para la columna de partes aéreas (Cuadro 7).

Cuadro 6. Fraccionamiento del extracto de raíz de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1) por cromatografía en columna

Fracciones	Eluyente
1-20	Hexano
21-49	Hexano-AcOEt 95:5
50-84	Hexano-AcOEt 9:1
85-126	Hexano-AcOEt 85:15
127- 161	Hexano-AcOEt 8:2
162-185	Hexano-AcOEt 7:3
186-196	Hexano-AcOEt 6:4
197-213	Hexano-AcOEt 1:1
214-232	AcOEt- Hexano 7:3
233-238	AcOEt
239-259	AcOEt- MeOH 7:3
260-270	AcOEt- MeOH 6:4
308-343	AcOEt- MeOH 1:1
344-348	AcOEt- MeOH 7:3
349-354	MeOH

Cuadro 7. Fraccionamiento del extracto de partes aéreas de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1) por cromatografía en columna

Fracciones	Eluyente
1-20	Hexano
21-40	Hexano-AcOEt 95:5
41-54	Hexano-AcOEt 9:1
55-71	Hexano-AcOEt 8:2
72-80	Hexano-AcOEt 7:3
81-100	Hexano-AcOEt 6:4
101-105	Hexano-AcOEt 1:1
106-111	AcOEt
112-118	AcOEt-MeOH 9:1
119-130	AcOEt-MeOH 8:2
131-186	AcOEt-MeOH 7:3
187-195	AcOEt- MeOH 6:4
196-212	AcOEt- MeOH 1:1
212-224	AcOEt- MeOH 7:3
225-230	MeOH

8.2 *Compuestos aislados*

Hederagenina (1)

La fracción 22 eluida con Hexano: Acetato de etilo (AcOEt) (95:5) mostró ser una mezcla binaria, la cual fue resuelta mediante una cromatografía en placa preparativa (20x20cm) eluida con 9:1 Hexano:AcOEt.

Obteniéndose 195 mg del un sólido blanco brillante (**1**) con un punto de fusión de 121-122°C. De acuerdo a sus propiedades físicas (Cuadro 8) y la comparación de los datos espectrales de (**1**) con aquellas publicadas en la literatura, permitieron identificar a (**1**) como hederagenina (Figura 11).

RMN ¹H 300 MHz (CDCl₃): 3.51 (H-3), 4.49 (H-26)

RMN ¹³C 75.4 MHz (CDCl₃): 27.47 (C-1), 25.30 (C-2), 79.99 (C-3), 37.15 (C-4), 54.69 (C-5), 17.65 (C-6), 32.61 (C-7), 39.5 (C-8), 54.69 (C-9), 41.15 (C-10), 24.96 (C-11), 121.51 (C-12), 143.83 (C-13), 41.82 (C-14), 28.54 (C-15), 22.93 (C-16), 46.94 (C-17), 40.05 (C-18), 45.93 (C-19), 30.54 (C-20), 33.58 (C-21), 31.94 (C-22), 28.63 (C-23), 34.24 (C-24), 14.96 (C-25), 68.68 (C-26), 28.79 (C-27), 173.06 (C-28), 31.26 (C-29), 16,163 (C-30).

3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol (2)

Las fracciones 25-27, eluidas con Hexano-AcOEt 95:5, se reunieron ya que presentaron una similitud cromatográfica en CPF, obteniéndose un residuo semi sólido. Cristalizaciones sucesivas de este residuo permitió el aislamiento del 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol (**2**) (Figura 12, Cuadro 9).

P. de f. 88-90 °C.

IR ν cm⁻¹ (KBr): 2990, 1710, 1460 y 1380.

RMN ^1H 300 MHz (CDCl_3): 4.72 (1H, hx, H-3), 3.71 (1H, cd, H-4'), 0.99 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, J =6 Hz, H-21), 0.90 (3H, t, J= 6Hz, H-6'), 0.88 (3H, d, J =3 Hz, H-26), 0.86 (3H, J= 3Hz, H-27).

RMN ^{13}C 75.4 MHz (CDCl_3): 35.27 (C-1), 31.30 (C-2), 73.14 (C-3), 38.09 (C-4), 39,50 (C-5), 24.76 (C-6), 27.35 (C-7), 126.64 (C-8), 134.90 (C-9), 34.69 (C-10), 22,79 (C-11), 36.70 (C-12), 42.06 (C-13), 51.46 (C-14), 23.91 (C-15), 28.70 (C-16), 54,85 (C-17), 11.24 (C-18), 18,72 (C-19), 36.23 (C-20), 18.86 (C-21), 36.12 (C-22), 23.81 (C-23), 37.74 (C-24), 27.99 (C-25), 22.53 (C-26), 22.67 (C-27), 173.36 (C-1'), 47.67 (C-2'), 28.21 (C-3'), 67.54 (C-4'), 22.29 (C-4'), 13.87 (C-5').

EM-IE (70eV) m/z (%): 500 (28), 485 (23), 384 (70), 229 (56), 112 (100).

En el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H RMN) de **(2)** se observó una señal a 4.72 ppm asignada a un protón unido a un átomo de carbono que soporta un éster. También se observó una señal a 3.7 ppm asignada a un átomo de carbono unido a un grupo alcohol. Estas asignaciones fueron confirmadas en el espectro de resonancia magnética de carbono trece (^{13}C RMN) de **(2)**, donde se observaron el carbono del carbonilo del éster a 173.36 ppm, así como dos señales a 73.14 y 67.54 ppm asignadas a los átomos de carbono unido a un éster y un grupo alcohol respectivamente. Adicionalmente, estas señales mostraron correlación, en el espectro DEPT, con las señales en el ^1H RMN a 4.72 y 3.7 ppm, respectivamente.

En el espectro DEPT, se contabilizaron 6 metilos, 15 metilenos, 7 metinos y 5 átomos de carbono sin unión a hidrógenos, que en conjunto representan una fórmula parcial de $\text{C}_{33}\text{H}_{55}$ (cuadro 10).

Cuadro 10. Fórmula parcial deducida a partir del espectro DEPT.

6 CH_3	C_6H_{18}
15 CH_2	$\text{C}_{15}\text{H}_{30}$
7 CH	C_7H_7
5 C	C_5
Fórmula parcial	$\text{C}_{33}\text{H}_{55}$

Al sumar los tres átomos de oxígeno y un átomo de hidrógeno de los grupos funcionales del éster y del alcohol a la fórmula parcial $C_{33}H_{55}$ se obtiene la fórmula $C_{33}H_{56}O_3$, la cual fue determinada para **(2)** por espectrometría de masas.

Por otro lado, en el espectro de masas de **(2)**, se observan los fragmentos a 369, 253 y 112 m/z típicos de estructuras del tipo 5α -colestano lo que indica que **(2)** está relacionado a esta estructura (Figura 13):

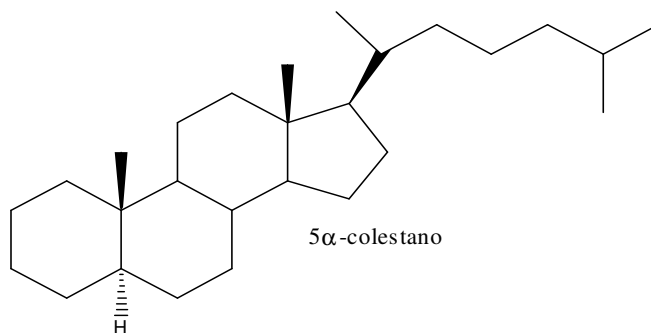


FIG 13. Estructura del tipo 5α -colestano

Adicionalmente, en el espectro de ^{13}C RMN de **(2)**, se observan dos señales a 126.64 y 134.90 asignadas a dos átomos de carbono de una doble ligadura tetra sustituida, por lo que se propone que **2**, tiene una doble ligadura entre C-8 y C-9, en una estructura de colestano.

Tomando en cuenta lo anterior se propone la siguiente estructural parcial para **(2)** (Figura 14).

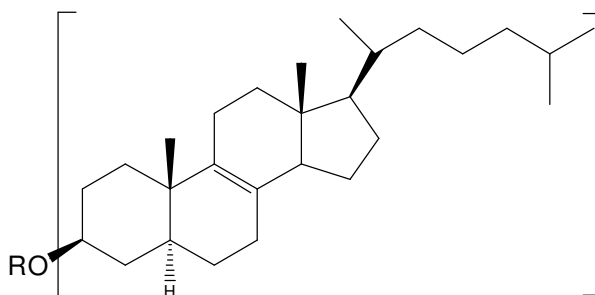


Fig. 14 Estructura parcial propuesta

Los datos obtenidos a partir de Ruan y colaboradores (2000) revelaron que cuando R es hidrógeno, esta estructura corresponde al zymostenol, la cual fue inequívocamente comprobada al comparar los datos de ^{13}C RMN del compuesto (2) con los publicados para el zymostenol en dicho estudio (Cuadro 11).

Cuadro 11. Desplazamientos químicos en C^{13} para el compuesto (2)

Carbono	Desplazamiento químico de (2) (ppm)	Literatura: zymosterol (ppm) (Ruan <i>et al.</i>, 2000)
1	35,278	35,1
2	31,301	31,5
3	73,14	70,9
4	38,09	38,2
5	39,503	40,7
6	24,76	25,4
7	27,353	27,1
8	126,647	128
9	134,907	134,8
10	34,695	35,6
11	22,793	22,7
12	36,706	36,9
13	42,067	42
14	51,463	51,8
15	23,915	23,9
16	28,708	28,7
17	54,857	54,8
18	11,241	11,2
19	18,729	17,8
20	36,239	36,2
21	18,86	18,7
22	36,123	36,1
23	23,813	23,7
24	37,74	39,4
25	27,994	27,9
26	22,531	22,4
27	22,677	22,7
28	173,366	
29	47,675	
30	28,213	
31	67,546	

32	22,298
33	13,878

Sin embargo, en el espectro de **(2)** adicionalmente se observan señales asignadas a tres metilenos a 22.29, 28.21 y 34.69 ppm, un metino unido a un grupo hidroxilo a 67.54 ppm y un grupo metilo a 13.89 ppm. Una búsqueda bibliográfica reveló que estas señales se pueden asignar a un residuo de 3-hidroxi caproico, el cual está unido al oxígeno en C-3 del zymostenol.

El espectro de masas de **(2)** mostró un ión molecular de 500 (m/z) para una fórmula de $C_{33}H_{56}O_3$.

De acuerdo al espectro de masas, se observa que el compuesto sufre varias fragmentaciones, una de ellas es cuando el residuo de 3-hidroxi caproico (el cual se encuentra unido al oxígeno en el carbono 3) se desprende del compuesto **(2)** (Figura 15).

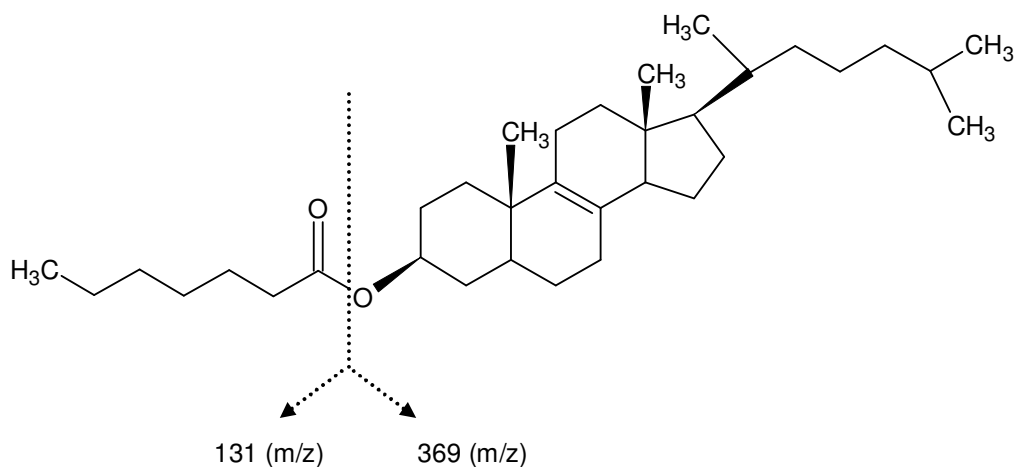


FIG. 15 Primera fragmentación propuesta para el compuesto 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol

Por lo

cual el ión molecular que es de 500 (m/z) sufre una fragmentación de 131 (m/z) del 3-hidroxi caproico, quedando así solo el compuesto relacionado con el zymostenol con una masa de 369 (m/z).

A su vez el carbono 16-17 y el residuo que se encuentra ubicado en el carbono 20 se desprenden de la estructura relacionada con el zymosterol. Resultando un fragmento de 229 (m/z) el cual puede ser observado en el espectro de masas (Figura 16).

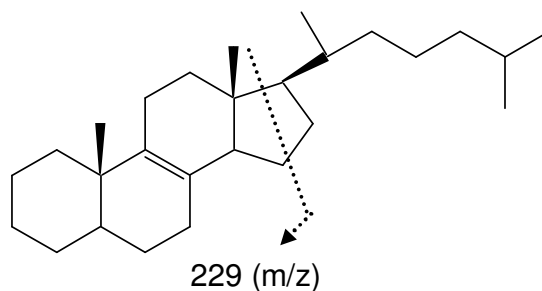


FIG 16. Posible fragmentación del carbono 16-17 y el residuo del carbono 20 del compuesto aislado

Finalmente el compuesto se fragmenta en dos partes, dando como resultado un fracción de 112 (m/z), mientras que el otro fragmento del compuesto es de de 123 (m/z) (Figura 17). Estos fragmentos se pueden observar en el espectro de masas del compuesto **(2)**.

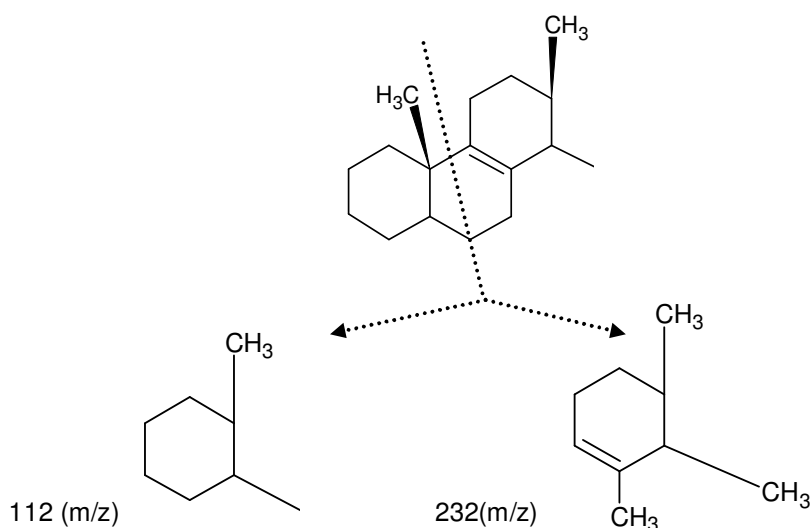


FIG 17. Ultima fragmentación propuesta del compuesto, obteniendo el ion molecular de 112 (m/z) y 232 (m/z)

Peniocerol (3)

De la fracción 169 eluida con 7:3 Hexano-AcOEt, se logró aislar 57.2 mg de un sólido color beige con un de p. f. 170-173°C (Cuadro 12). Este compuesto presentaba propiedades físicas idénticas al peniocerol (**3**), la comparación con sus datos físicos y espectroscópicos de este compuesto con lo informado en la literatura (Djerassi *et al.*, 1965), así como su comparación en CCP con muestra original, permitieron su identificación como peniocerol (Figura 18).

Ácido oleanólico (4)

De la cromatografía de partes aéreas, la fracción 133 eluida con AcOEt-MeOH 7:3 se sometió a una reacción de hidrólisis obteniéndose 57.2 mg de ácido oleanólico (**4**). La identidad de este compuesto se logro por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos de muestra autentica (Figura 19, Cuadro 13).

P. de f. °C. 183-190°C

IR ν cm^{-1} (KBr): 3380.36 cm^{-1} (OH), 1730.27 cm^{-1} (COOH), 1607.60 cm^{-1} (presencia de una doble ligadura)

RMN ^1H 300 MHz (CDCl_3): 3.4 (3), 5.248 (C-12)

RMN ^{13}C 75.4 MHz (CDCl_3): 38.94 (C-1), 27.04 (C-2), 77.74 (C-3), 39.5 (C-4), 54.66 (C-5), 17.73 (C-6), 32.55 (C-7), 39.77 (C-8), 40.33 (C-9), 37.89 (C-10), 22.71 (C-11), 121.41 (C-12), 143.45 (C-13), 41.08 (C-14), 27.68 (C-15), 22.42 (C-16), 46.95 (C-17), 40.53 (C-18), 45.45 (C-19), 31.86 (C-20), 36.39 (C-21), 33.29 (C-22), 28.93 (C-23), 15.27 (C-24), 14.73 (C-25), 16.48 (C-26), 26.60 (C-27), 179.19 (C-28), 32.14 (C-29), 23.03 (C-30)

Propiedades físicas y estructura de los Compuestos aislados

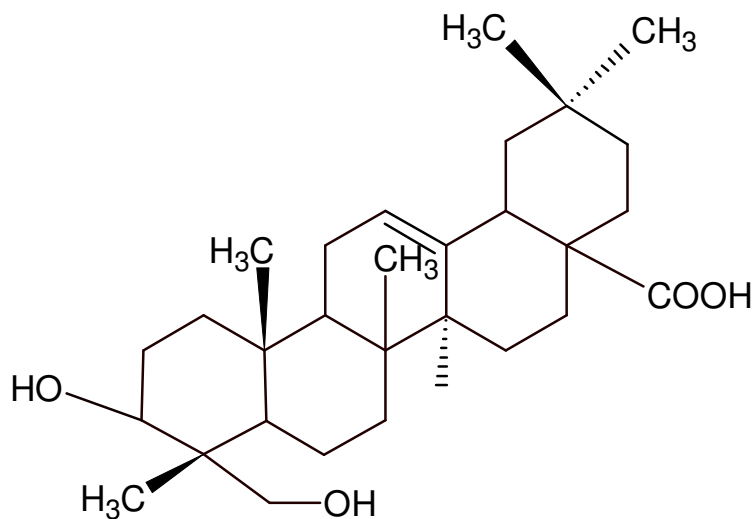


FIG 11. Estructura química de Hederagenina.

Cuadro 8. Propiedades físicas de Hederagenina

(1) Hederagenina	
Punto de fusión	122°C
Formula molecular	C ₃₀ H ₄₇ O ₃
Peso molecular	455 g/mol
Color	Blanco brillante
Obtenido en la polaridad	Hexano – Acetato de etilo 95:5

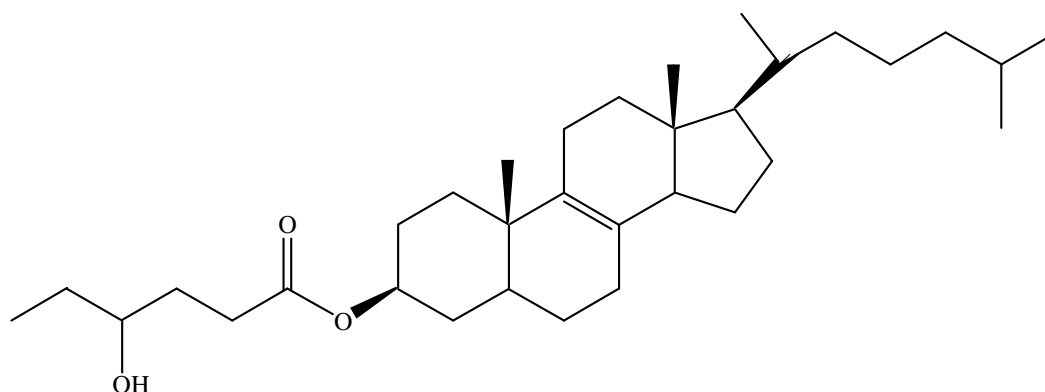


FIG 12. Estructura química de 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol

Cuadro 9. Propiedades físicas de 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol

(2) 3-hidroxi- hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol

Punto de fusión	85-90°C
Formula molecular	C ₃₃ H ₅₆ O ₃
Peso molecular	500 g/mol
Color	Blanco
Obtenido en la polaridad	Hexano - Acetato de etilo 95:5

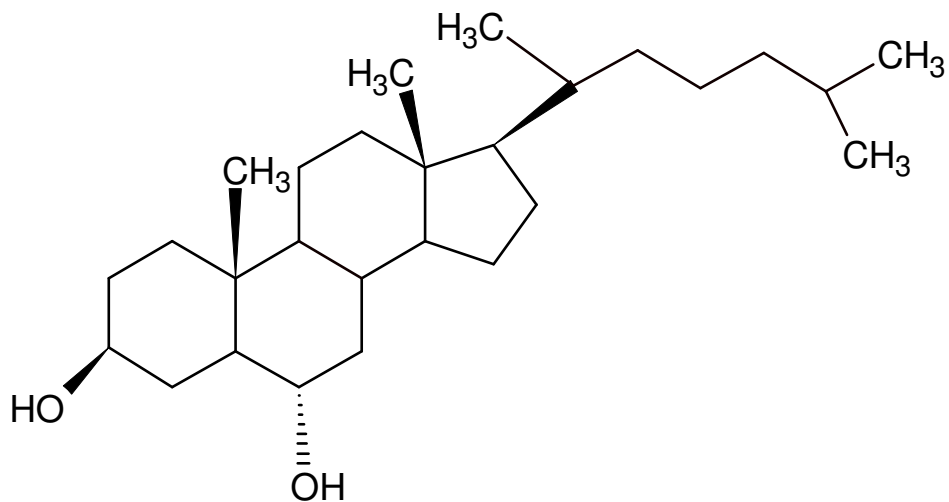


FIG 18. Estructura química del Peniocerol

Cuadro 12. Propiedades físicas de Peniocerol

(3) PENIOCEROL	
Punto de fusión	160-165°C
Formula molecular	$C_{27}H_{49}O_2$
Peso molecular	405 g/mol
Color	Beige
Obtenido en la polaridad	Hexano - Acetato de etilo 7:3

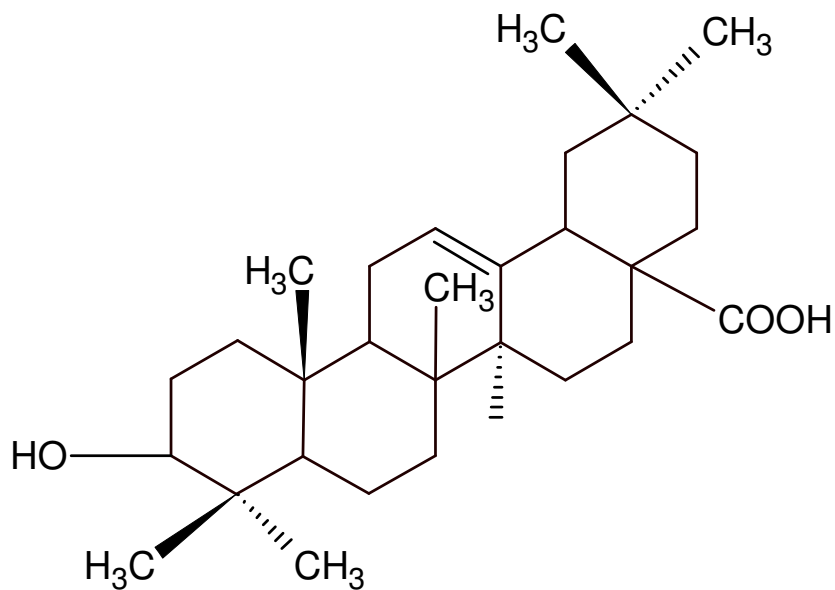


FIG 19. Estructura química del Ácido oleanólico

Cuadro 13. Propiedades físicas del Ácido oleanólico

(4) Ácido Oleanólico	
Punto de fusión	183-190°C
Formula molecular	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
Peso molecular	456 g/mol
Color	Blanco opaco
Obtenido en la polaridad	Acetato de etilo-metanol 7:3

Rendimiento.

El peso seco obtenido de la raíz de *S. pruinosus* fue 61.5g, mientras que para las partes aéreas fue de 745.48g. Estas cantidades fueron las que se maceraron en diclorometano-metanol 1:1 para obtener los extractos.

Obteniendo un total de 20.47g de extracto de diclorometano-metanol para la raíz y 134.67g de extracto de diclorometano-metanol para las partes aéreas. A pesar de tener una menor cantidad de raíz, ésta tuvo un mayor rendimiento en comparación a partes aéreas de *S. pruinosus* (cuadro 14). El rendimiento de los extractos se calculó como un porcentaje del total del material vegetal inicial.

Cuadro 14. Rendimiento total de los extractos de *Stenocereus pruinosus*.

Extracto	Rendimiento en (%)	Peso en gramos
Extracto de raíz de <i>Stenocereus pruinosus</i>	33.28	20.47g
Extracto de partes aéreas de <i>Stenocereus pruinosus</i>	18.06	136.67g

A partir de la raíz de *S. pruinosus* se lograron aislar, purificar y caracterizar el peniocerol, la hederagenina y el 3-hidroxi hexanoato de 5α -colest-8-en- 3β -ol (esterol). Del mismo modo, de las partes aéreas de *S. pruinosus* se aisló, caracterizó y purificó el ácido oleanólico. El rendimiento de estos metabolitos secundarios, tanto de raíz como de partes aéreas de *S. pruinosus*, se expresó como un porcentaje del total de cantidad obtenida de cada compuesto sobre el total del extracto cromatografiado (cuadro 15).

Cuadro 15. Rendimiento de los compuestos aislados y purificados de la raíz y partes aéreas de *S.pruinosus*

Compuesto de la raíz de <i>S.pruinosus</i>	Rendimiento en (%)	Peso en gramos
Hederagenina	0.572%	0.195 g
Peniocerol	1.95	0.0572 g
3-hidroxi hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol	1.697	0.1697 g
Compuesto de partes aéreas de <i>S.pruinosus</i>		
Ácido oleanólico	4.11	5.619 g

- Determinación de la actividad citotóxica.

Una vez obtenido el extracto de raíz se determino su actividad citotóxica en seis líneas de cáncer humano (Cuadro 16).

Cuadro 16. Actividad citotóxica del extracto diclorometano-metanol de raíz.

Línea celular	Inhibición del crecimiento celular (%)
Cáncer de SNC (U251)	31.67
Cáncer de próstata (PC-3)	10.41
Leucemia (K-562)	39.28
Cáncer de colon (HCT-15)	25.37
Cáncer de mama (MCF-7)	50.93
Cáncer de pulmón (SKUL)	35.49

Se observó que la inhibición del crecimiento celular varía de una línea celular a otra, causando diferente porcentaje de inhibición entre ellas, resultando con mayor

actividad hacia la línea celular de mama, provocando un 50% de inhibición, mientras que para las líneas celulares de leucemia y pulmón el extracto tuvo una menor actividad provocando una inhibición de entre el 35 y 40.

Al igual que en el extracto de raíz, para el extracto de partes aéreas se determinó su actividad citotóxica (Cuadro 17), encontrándose que la actividad de este extracto es mayor en las líneas celulares de leucemia y mama, inhibiendo más del 50% del crecimiento celular.

Cuadro 17. Actividad citotóxica del extracto diclorometano-metanol de partes aéreas.

Línea celular	Inhibición del crecimiento celular (%)
Cáncer de SNC (U251)	44.18
Cáncer de próstata (PC-3)	14.94
Leucemia (K-562)	55.1
Cáncer de colon (HCT-15)	30.61
Cáncer de mama (MCF-7)	53.61
Cáncer de pulmón (SKUL)	35.17

Cabe señalar que en la actividad citotóxica de ambos extractos, la línea celular de próstata resultó con poca actividad, mientras que para la línea celular de mama su inhibición fue mayor del 50%.

Los compuestos purificados del extracto de raíz y partes aéreas fueron evaluados para su actividad citotóxica (Cuadro 18).

La hederagenina resultó activa en 4 líneas celulares, inhibiendo así más del 50% del crecimiento de células cancerígenas, sin embargo, en las líneas celulares del sistema nervioso central y colon su actividad fue baja, esto se debe a que no son

las mismas líneas celulares y su sensibilidad es diferente, variando así la actividad de un mismo compuesto sobre las líneas celulares.

El 3-hidroxi hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol resulto con una elevada actividad citotóxica para casi todas las líneas celulares excepto leucemia (K-562), obteniendo mas de un 70% en la inhibición del crecimiento celular.

El ácido oleanólico mostró una alta inhibición del crecimiento celular en todas las líneas celulares, lo que con cuerda con lo informado en la literatura sobre su acción biológica contra algunas de las líneas celulares de cáncer (Dzubak *et al.*, 2006; Haridas *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

Cuadro 18. Actividad citotóxica para los compuestos aislados del extracto de raíz y partes aéreas.

Inhibición del crecimiento celular (%)			
Línea celular	Hederagenina	3-hidroxi	Ácido oleanólico.
Compuesto		hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol	
Cáncer de SNC (U251)	30.39	100	100
Cáncer de próstata (PC-3)	73.91	100	100
Leucemia (K-562)	58.13	41.40	88.5
Cáncer de colon (HCT-15)	34.11	71.53	100
Cáncer de mama (MCF-7)	54.35	93.49	100
Cáncer de pulmón (SKUL)	56.8		100

- **Determinación de la actividad antiinflamatoria.**

En cuanto a la actividad antiinflamatoria para los extractos, se observó que el más activo fue el de partes aéreas (Cuadro 19).

Cuadro 19. Inhibición del edema (%) inducido por TPA de los extractos orgánicos

Extractos	Inhibición del edema (%)
Raíz	56.96
Partes aéreas.	69.62

El segundo modelo evaluado fue el edema inducido por carragenina en la pata de la rata, con una dosis de 100 mg/kg. El cual mostró una baja actividad para los extractos (cuadro 20).

Cuadro 20. Inhibición del edema (%) por carragenina de los extractos orgánicos

	Inhibición del Edema a las diferentes horas (%)			ABC
	1h	2h	3h	
Vehículo	0.68± 0.24	1.24±0.01	1.14± 0.06	0%
Raíz	29.41%	18.54%	20.18%	20.28%
	0.48 ±0.05	1.01 ±0.01	0.91 ±0.02	3.42±0.03
Partes aéreas	26.47%	25.00%*	23.68%*	24.71% *
	0.50± 0.04	0.93± 0.16	0.87± 0.14	3.23± 0.47

Los datos con* son estadísticamente diferentes con respecto al vehículo.

La diferencia de la actividad de los extractos en ambos modelos, se deba quizá a que el mecanismo de acción es diferente, ya que en el modelo de TPA este estimula a la fosfolipasa 2 liberando el ácido araquidónico, mientras que en el modelo de carragenina este actúa en la COX-1 Y COX-2, así como las prostaglandinas.

Sin embargo, las actividades de los extractos en el modelo de TPA quizás se pueda deber a los metabolitos secundarios encontrados en ellos, en caso del extracto de raíz su actividad posiblemente se deba a la presencia del peniocerol, el cual ha sido reportado con una elevada una actividad antiinflamatoria (Céspedes *et al.*, 2005) y en el caso del extracto de partes aéreas su actividad quizás se deba probablemente al ácido oleanólico (Dzubak *et al.*, 2006; Zhang y Demon., 2005).

Por otra parte, se determino también la actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados del extracto de raíz, con una dosis de 0.31mg/oreja (Cuadro 21). Mostrando en el caso de la hederagenina una baja actividad, mientras que, para 3-hidroxi hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol su inhibición del edema en la oreja del ratón fue de 40.57%. En el caso del ácido oleanólico y el peniocerol, sus actividades antiinflamatorias han sido previamente informadas, por lo que se decido no evaluar en nuestros ensayos.

Cuadro 21. Porcentaje de inhibición del edema por TPA de los compuestos químicos aislados

Inhibición del edema en oreja de ratón (%)	
Hederagenina	17.63
3-hidroxi hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol	40.57

9. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- *Stenocereus pruinosus* sintetiza triterpenos y esteroides.
- Este es el primer informe acerca de la presencia del triterpeno hederagenina y el esteroide peniocerol en *S. pruinosus*.
- Los extractos de raíz y partes aéreas presentan actividad antiinflamatoria en los modelos de TPA y carragenina
- El extracto de raíz mostró una inhibición del 50 % de crecimiento celular para la línea de cáncer de mama. Mientras que el extracto de las partes aéreas inhibió el crecimiento celular de las líneas de leucemia y mama con 55% y 53.63% de actividad. Todas las evaluaciones se llevaron a una concentración de 50 µg/mL
- La cromatografía del extracto de la raíz, permitió el aislamiento de la hederagenina, el 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol y el peniocerol. Mientras que del extracto de las partes aéreas solo se aisló el ácido oleanólico.
- Éste es el primer informe acerca de la presencia de la hederagenina y el peniocerol en *S. pruinosus*
- El esteroide 3-hidroxi hexanoato de 5 α -colest-8-en-3 β -ol es un nuevo producto en la literatura.
- Los resultados de la actividad citotóxica mostraron que el 3-hidroxi-hexanoato de 5 α -colest -8-en-3 β -ol inhibió el 100% de crecimiento celular en las líneas de cáncer de sistema nervioso central y de cáncer de próstata, mientras que el ácido oleanólico inhibió el 100% del crecimiento celular en las líneas de cáncer de sistema nervioso central, próstata, mama y colon. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo a una concentración de 50 µg/mL.

10. REFERENCIAS.

- 1) American Cancer Society. 2006. Cancer Facts & Figures 2006. Referencia electrónica (<http://www.cancer.org>)
- 2) Anaya L. 2003. Ecología química. Editorial Plaza y Valdes. México. pp 48-57
- 3) Anderson. F. E., Barthlott. W., Brown. R. 2001. The Cactus Family, Editorial Timber Press. pp 43,641-649.
- 4) Arreola N.H y Terrazas T. 2003. Especies de *Stenocereus* con aréolas morenas: clave y descripciones. Acta botánica Mexicana 64: 1-18
- 5) Arroyo, A.J., Prashad, G.M., Vásquez, B.Y., Li, P.E., Tomás, C.G., 2005. Actividad Citotóxica In Vitro de la Mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* Sobre Células Cancerosas de Glándula Mamaria, Pulmón y Sistema Nervioso Central. J. Peru Med Exp Salud Publica 22(4): 247-253
- 6) Bravo H. H. 1937. Las cactáceas de México. Editado por el Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. pp 3-9, 20-26.
- 7) Bravo H. H. 1978. Las cactáceas de México. Editado por la Universidad Nacional Autónoma de México. pp 69-70, 584.
- 8) Cadavid M. A., Estupiñán R. J., Vargas J. J. 2006. Fundamentos de medicina: Dolor y cuidados paliativos. Publicado por Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín Colombia. pp 60-64
- 9) Casas A. 2002. uso y manejo de las cactáceas columnares mesoamericanas. Biodiversitas 6 (40): 18-22

-
-
- 10) Céspedes, C.L., Salazar, R.J., Martínez, M., Aranda, E., 2005. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *J. Phytochemistry* 66: 2481-2493
 - 11) Coussens L.M., Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867
 - 12) Delgado L.G., Jiménez E.M., Saad V.I., Sanchez C.A., Reyes C.R., Céspedes A.C., Salazar J.R., Fontana U.B., Collera Z.O., Garcia Jimenez F., Romo V.A., Perez C.A., Arciniegas A.A. 2006. *Química de la Flora de Mexicana: Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM*. Publicado por UNAM. pp 89-90, 141-145.
 - 13) Djerassi C., Murria R.D.H., Villotti R. 1965. The structure of the cactus sterol, peniocerol (cholest-8-cholest-8-ene-3 β ,6 α -diol). *Journal of the chemical society*: 160-165.
 - 14) Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J. 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural product reports* 23: 394-411.
 - 15) Etienne-Decant J., Millot F., Alhaja P.E, Del Pozo R. 2001. *Bioquímica genética, biología celular*. Editorial Elsevier. España. pp 251-254
 - 16) Gisbert C. J., Villanueva E. 2005. *Medicina legal y toxicología*. Editorial Elsevier, Sexta edición. España. pp 896
 - 17) Haridas V., Charles J.A., Jordan U.G., 2001. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear

-
- factor-kB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. J. Medical Sciences 98(20): 11557–11562.
- 18) Herrera G. A., Granados G. M. 2003. Manual de oncología: Procedimientos Medicoquirúrgicos. Editorial MCGraw-Hill Interamericana, 2^{da} edición, México. pp 23-30, 35-41
- 19) Hernández H.M., Godínez A.H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta botánica mexicana 26:33-52
- 20) Imai T., Okazaki S., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Yuasa H. 2006. Triterpenoid saponins from cultural plants of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae), J Nat Med 60: 49–53.
- 21) INEGI, 2006 “estadística a propósito del día mundial contra el cáncer” datos nacionales. Referencia electrónica:
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf> consultada 23-01-08.
- 22) Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., Thun M.J. 2006. Cancer Statistics, CA. Cancer J Clin; 56: 106–130.
- 23) Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., Thun M.J. 2007. Cancer Statistics, CA. Cancer J Clin; 57: 43-66.
- 24) Kliebenstein D.J. 2004. Secondary Metabolites and Plant/Environment Interactions: A View Through Arabidopsis thaliana Tinged Glasses. J. Plant, Cell and Environment (27): 675–684
- 25) Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L. 2003. Patología humana. Editorial Elsevier, España. pp 44-54

-
-
- 26) Lewis S.L., Heitkemper M., Durksen S.R. 2004. Enfermería medicoquirúrgica: Valoración y cuidados de problemas clínicos. Editorial Elsevier, España. pp 297-310
- 27) Mandujano, M.C., Goluvov, J., Reyes J., 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. Biodiversitas 6 (40): 12-17.
- 28) Marchal C. J.A., Gaforio M. J.J., Aránega J. A. 2006. Avances en oncológica básica y aplicada. Editorial Universidad de Granada, España. pp 19-32
- 29) Mark B.J., Stiger L., Tymoczko J., Macarulla J.M. 2008. Bioquímica. Editorial Reverte, 2ª Edición. España. 644-646
- 30) Missailidis S. 2007. The Cancer Clock. Editorial John Wiley and Sons. pp 100-109
- 31) Monks A., Scudeiro D., Skehan P., Schoemaker R., Paul K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise A., Vaigro W. A., Gray G. M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. 1991. J. National Cancer Institute 33: 757
- 32) Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. J Nature 420: 846-852
- 33) Okazaki S., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Yuasa H. 2007. New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae), J Nat Med 61:24–29
- 34) Page C.V., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J., Hoffman B.B. 1998. Farmacología integrada. Editorial Elsevier, España. pp 500-505, 521
- 35) Pardo M. F. 1998. Compendio de anatomía patológica. Editorial Elsevier, España. pp 200-211

-
-
- 36) Pouchert C.J., Behnke J. 1993. The aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra. Aldrich Chemical Company, Inc. Vol. 2. USA.
- 37) Ramírez. R., Berrocal. T., González E. M., Aguirre. J.L. 1999. Biodiversidad. Editado por la Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca: Centro de Educación y Capacitación para el Desarrollo Sustentable. Primera edición.
- 38) Ran Xu, Gia C. Fazio, Seiichi P.T. Matsuda. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *J Phytochemistry* 65: 261–291
- 39) Ruan B., Wilson W. K., Pang J., Schroepfer G.J. 2000. Synthesis of [3 α -³H] cholesta-5,8-dien-3 β -ol and tritium-labeled forms of other sterols of potential importance in the Smith-Lemli-Optiz syndrome. *Steroids* 65: 29–39
- 40) Rubin P., Williams J.P. 2003. *Oncología clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Editorial Elsevier, España. pp 48-55
- 41) Suh N., Honda T., Finlay H.J., Barchowsky A., Williams C., Benoit N.E., Xie Q., Nathan C., Gribble G.W., Sporn M.B. 1998. Novel Triterpenoids Suppress Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages. *Cancer research* 58:717-723.
- 42) Suh N., Wang Y., Honda T., Gribble, W., Dmitrovsky E., Hickey W., Maue R., Place A., Porter D.M., Spinella M.J., Williams C., Wu G., Dannenberg A.J., Flanders K.C., Letterio J.J., Mangelsdorf D.J., Nathan C.F., Nguyen L., Porter W.W., Ren R.F., Roberts A., Roche N.S, Subbaramaiah N., Sporn, M.B. 1999. A Novel Synthetic Oleanane Triterpenoid, 2-Cyano-3, 12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid, with Potent Differentiating,

-
-
- Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity. *Cancer research* 59: 336–341
- 43) Tan. M. L., Sulaiman. S. F., Najimuddin. N., Samian. M.R., Tengku Muhammad. T. S. 2005. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Ethnopharmacology J* 96: 287–294.
- 44) Teijón R.J, Teijón J.M., Garrido P.A. 2006. *Fundamentos de Bioquímica estructural*. Editorial Tebar. México. pp 385
- 45) Terrazas T., Loza C. S. 2003. Anatomía de la madera y alometría de veinte especies de *Stenocereus* (Cactaceae). *Anales del instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botanica* 74 (2):195-208.
- 46) Thompson W.M., Nussbaum R.L., McInnes R.R., Thompson J.S., Willard H.F., Peral J.S., Fernández M.S. 2004. *Genética en Medicina*. Editorial Elsevier, España. pp 329-349
- 47) Tian Z., Liu Y., Chen S., Yang J., Xiao P., Wang L., Wu E. 2006. Cytotoxicity of Two Triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *Molecules* 11: 693-699
- 48) Tubaro A., Dri P., Delbello G., Zilli C., Della L.R. 1985. The cortón oil ear test revisited. *Agents Actions* 17: 347-349.
- 49) Winter C. A., Risley E. A., Nuss G.W. 1962. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceeding of the society for experimental biology and medicine* 111: 544-547.
- 50) Ze T., Yu-Ming L., Si-Bao C., Jun-Shan Y., Pei-Gen X., Liao W., Erxi W. 2006. Cytotoxicity of Two Triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *J. Molecules* 11: 693-699

51)Zhang L., Demon L. A. 2005. Natural products, drug discovery and therapeutic medicine. Editorial Humana press. Pp197-198, 200, 210-214